

Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Institut für Neuropathologie

Prof. Dr. Markus Glatzel

**Charakterisierung der Rolle von Retroviren und Exosomen am
Transport des Prionproteins**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von:

Juliane Grashorn aus Berlin

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 14.02.2014

**Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg:
Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. M. Glatzel**

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD Dr. C. Bernreuther

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: PD Dr. H.-J. Kreienkamp

Inhaltsverzeichnis

1. Zielsetzung.....	3
2. Einleitung	4
2.1 Transmissible spongiforme Enzephalopathie	4
2.2 Das Prionprotein	4
2.3 Neuroinvasion von Prionen.....	5
2.4 Prionprotein und Exosomen.....	6
2.5 Prionprotein und Retroviren.....	8
2.6 Prionprotein und Tiermodelle	8
3. Material	10
3.1 Arbeitsgeräte	10
3.2 Chemikalien und Zubehör.....	11
3.3 Antikörper	12
3.4 Zellkultur.....	12
3.4.1 Zellkulturmaterial.....	12
3.4.2 Verwendete Zelllinien.....	13
3.4.3 Verwendete Retroviren	13
3.5 Immunhistochemische Färbung	13
4. Methode	14
4.1 Zellkultur.....	14
4.2 Exosomenisolierung.....	15
4.3 Elektrophorese und Westernblot.....	16
4.4 Immunhistochemische Färbung	20
4.5 NaPTA-Präzipitation.....	21
5. Ergebnisse.....	23
5.1 Auswirkung einer Doppelinfektion mit Prionen und Retroviren auf die Milz	23
5.1.1 Erhöhte PrP ^{Sc} -Mengen in der Milz zu frühen Zeitpunkten der Doppelinfektion.....	23
5.1.2 Retrovirusinfektion führt qualitativ zu erhöhter FDC-Aktivierung in der Milz	23
5.1.3 Etablierung einer semiquantitativen Methode zur Bestimmung der FDC-	
Aktivierung	25
5.1.4 Retrovirusinfektion führt quantitativ zu erhöhter FDC-Aktivierung in der Milz	27
5.1.5 Erhöhte PrP ^{Sc} -Mengen korrelieren mit vermehrter FDC-Aktivität	28
5.2 Charakterisierung und Interaktion von PrP ^C auf kleinen Vesikeln.....	29
5.2.1 Etablierung einer Methode zur Isolierung von Exosomen.....	29

5.2.2 Vesikuläres PrP ^C trägt einen GPI-Anker.....	32
5.2.3 Etablierung einer Methode zur Lokalisationsbestimmung von exosomalem PrP ^C ..	34
5.2.4 Exosomales PrP ^C ist größtenteils oder ausschließlich auf der Membranaußenseite lokalisiert.....	37
5.2.5 Nachweis von Prionerkrankung relevanter Proteinase ADAM10 auf Exosomen ...	38
6. Diskussion.....	41
7. Zusammenfassung	46
8. Literaturverzeichnis	47
9. Anhang.....	53
9.1 Abkürzungsverzeichnis.....	53
9.2 Tabellen zur: semiquantitativen Bestimmung der FDC-Aktivierung	55
10. Danksagung.....	59
11. Lebenslauf	60
12. Eidesstattliche Erklärung	61

1. Zielsetzung

Prionerkrankungen, wie z. B. die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit beim Menschen oder die Bovine Spongiforme Enzephalopathie beim Rind, sind neurodegenerative Erkrankungen, welche innerhalb kurzer Zeit tödlich enden. Ein Teil dieser Erkrankungen wird von Mensch zu Mensch oder von Tier zu Tier übertragen. Bei der Übertragung wurde „das Prion“ als infektiöses Agens ermittelt. Ein wesentlicher Teil von Prionen stellt eine fehlgefaltete Form (PrP^{Sc}) des physiologischen Prionproteins (PrP^{C}) dar.

Über die Ausbreitung von Prionen im Körper von infizierten Organismen ist bis heute nur wenig bekannt. So ist beschrieben, dass in einer Frühphase der Erkrankung hohe Spiegel an PrP^{Sc} in lymphatischen Organen nachweisbar sind, während in der Spätphase der Erkrankung hohe Spiegel an PrP^{Sc} im Gehirn gefunden werden. Weiterhin ist bekannt, dass Exosomen, Membranvesikel, die von Zellen sezerniert werden, und Retroviruspartikel PrP^{Sc} transportieren können.

Ziel dieser Arbeit ist es, zu untersuchen, welche Rolle eine Koinfektion mit Retroviren und Prionen bei der Ausbreitung von Prionen innerhalb infizierter Organismen spielt. Darüber hinaus soll untersucht werden, wie PrP^{C} auf Exosomen verankert ist und ob die Proteinase, welche PrP^{C} von der Zellmembran ablöst und in den Extrazellulärraum entlässt (ADAM 10), ebenfalls auf Exosomen lokalisiert ist.

Hierfür wurde ein Tiermodell zur Koinfektion von Retroviren und Prionen etabliert. Des Weiteren wurden Untersuchungen an retrovirusinfizierten Zelllinien durchgeführt. Diese Untersuchungen sollen helfen, die Ausbreitung von PrP^{Sc} im Körper von prioninfizierten Organismen besser zu verstehen, um mögliche Zielstrukturen für eine therapeutische Intervention zu finden.

2. Einleitung

2.1 Transmissible spongiforme Enzephalopathie

Prionerkrankungen oder Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind infektiöse, neurodegenerative Erkrankungen. Sie kommen beim Menschen und einer Vielzahl von Säugetieren vor und können innerhalb einer Art oder zwischen verschiedenen Arten übertragen werden ¹. Zu den bekanntesten Prionerkrankungen in der Tierwelt gehören Scrapie bei Schafen, Bovine Spongiforme Enzephalopathie ("mad cow" disease; BSE) bei Rindern und die Chronic Wasting Disease (CWD) bei Rotwild und Elchen ^{2,3}.

Zu den humanen TSEs zählen das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS), die Fatale Familiäre Insomnie (FFI), die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) und das durch rituellen Kannibalismus hervorgerufene Kuru ⁴. Die CJD tritt familiär (fCJD), sporadisch (sCJD), iatrogen (iCJD) oder als neue Variante von CJD (vCJD), verursacht durch den Kontakt mit BSE-kontaminiertem Material, auf ⁴⁻⁶.

Die sCJD ist mit 1-2 Fällen pro eine Millionen Einwohner die häufigste Form unter den Prionerkrankungen beim Menschen ⁷. Klinische Symptome sind eine rapide, progressive Demenz und zerebrale Dysfunktionen mit muskulären Koordinations-, Seh-, Sprach- und Gangstörungen. Dabei ist die Demenz das Leitsymptom, gefolgt von spontanen oder induzierten Myoklonien. Im Verlauf können pyramidale und extrapyramidale Störungen wie Tremor, Spastiken, Rigidität und Verhaltensänderungen wie Agitation, Verwirrtheit und Depression auftreten. Im Endstadium gehen viele Patienten in den Zustand eines akinetischen Mutismus über. Die Krankheit endet letal ^{8,9}. Das histologische Bild einer TSE ist gekennzeichnet durch spongiforme Neurodegenerationen des Gehirns, begleitet von aktivierten, krankhaft vermehrten Astrozyten (Astrozytose) und Mikroglia sowie Akkumulationen von Amyloid-Aggregaten bestehend aus einem abnormal gefalteten, körpereigenen Protein: dem Prionprotein ¹⁰.

2.2 Das Prionprotein

Das zelluläre Prionprotein (PrP^C) ist ein 30-35kDa großes Glykoprotein mit zwei potentiellen N-Glykosylierungsstellen. Es kommt di-, mono- oder unglykosyliert vor, wodurch das Dreibandenmuster des Proteins auf einem Westernblot zu erklären ist.

PrP^C wird in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert ^{11,12}. Im Bereich der cholesterinreichen Mikrodomänen (Detergent-Resistant Microdomains (DRM); lipid rafts) ist es durch einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker an der äußeren Seite der Zellmembran befestigt ¹³. Hier erfolgt die Freisetzung in den Extrazellulärraum durch die Zink-Metalloprotease ADAM10 ¹⁴.

Das hochkonservierte PrP^C ist beim Menschen auf Chromosom 20p lokalisiert und besteht aus zwei Exons ^{15,16}. Die physiologische Funktion von PrP^C im Organismus ist noch unklar: Als potentielle Funktionen werden die Beteiligung an Neuroprotektion (antiapoptotisch, antioxidativ), Neuritenwachstum, synaptischer Formation und Myelinisierung diskutiert ¹⁷. Mäuse ohne funktionsfähiges PRNP Gen zeigten in den ersten sieben Lebensmonaten keinerlei Abnormalitäten ¹⁸.

Das zelluläre Prionprotein besteht zu 42% aus α -Helices und zu 3% aus einer β -Faltblattstruktur. Zu Beginn einer Prionerkrankung findet eine Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur in eine bzgl. der β -Faltblattstruktur (43%) reiche Isoform statt ^{19,20}. Diese mit der Erkrankung assoziierte Isoform des körpereigenen Prionproteins, bezeichnet als PrP^{Sc} (Sc steht für Scrapie) ¹⁰, ist im Gegensatz zur körpereigenen Form PrP^C, Proteinase K resistent und unlöslich in milden Detergentien.

Das heute weitestgehend akzeptierte Modell über die Entstehung der TSE ist die Protein-only-Hypothese, bei der davon ausgegangen wird, dass fehlgefaltetes Prionprotein (PrP^{Sc}) selbst, ohne kodierende Nukleinsäure (wie z.B. bei Viren), das infektiöse Agens ist ²¹. Demnach bildet sich neues PrP^{Sc}, indem es mit PrP^C interagiert und dessen Konformationsänderung in das krankheitsverursachende PrP^{Sc} herbeiführt. Zellfreie Konversionsexperimente, die *in vitro* zur Bildung von infektiösem PrP^{Sc} führen, unterstützen dieses Modell ²².

2.3 Neuroinvasion von Prionen

Neuroinvasion nennt man den Transport von Prionen aus der Peripherie in das zentrale Nervensystem. Dabei stellt PrP^{Sc} einen wesentlichen Teil der Prionen dar. Der potentielle Ausbreitungsweg von PrP^{Sc} beginnt, z.B. bei einer Übertragung durch Nahrungsmittel, im Darm. Von hier aus wird PrP^{Sc} durch das intestinale Epithel geschleust, um anschließend von Zellen des Immunsystems (z.B. dendritischen Zellen) zum lymphatischen Gewebe (Milz, darmassoziiertes Immunsystem, Lymphknoten und Tonsillen) transportiert zu werden, wo die Akkumulation erfolgt. Die Akkumulation von PrP^{Sc} tritt an der Membranoberfläche von follikulären dendritischen Zellen (FDCs) auf ²³. FDCs scheinen eine wichtige Rolle in der

Pathogenese von TSE zu spielen, da sich bei ihrer Abwesenheit die Neuroinvasion verlangsamt und damit die Infektanfälligkeit verringert wird²⁴⁻²⁷. FDCs kommen in B-Zell-Follikeln des lymphatischen Gewebes vor. Sie nehmen Antigenkomplexe auf und präsentieren sie anschließend unprozessiert auf ihrer Membranoberfläche (Antigenpräsentierende Zellen). Durch die starke PrP^C-Expression liefern FDCs das Substrat zur Aufrechterhaltung der TSE Infektion²⁸.

Vom lymphatischen Gewebe gelangt PrP^{Sc} über Nervenendigungen zum vegetativen Nervensystem und von dort retrograd mit dem sympathischen Nervensystem zum Seitenhorn (Cornu laterale) des thorakalen Rückenmarks oder mit dem parasympathischen Nervus Vagus zum Nucleus dorsalis nervi vagi des Gehirns^{29,30}.

Damit sind zwar die grundsätzlichen Transportwege bekannt, unklar ist allerdings der genaue Transfer von Zelle zu Zelle, zum Beispiel von FDCs zu Zellen des peripheren Nervensystems. Potentielle Transportsysteme für diese interzellulären PrP^{Sc}-Transfers sind direkter Zell-Zellkontakt, Freisetzung („Shedding“) von PrP^{Sc} in den extrazellulären Raum, kurze Verbindungstunnel zwischen Zellen („Nanotubes“) oder Vesikeltransport („Vesicle-trafficking“), zum Beispiel durch Exosomen³¹.

2.4 Prionprotein und Exosomen

Exosomen sind kleine (~40-120nm), membranöse Vesikel, die von den meisten Zellen in den extrazellulären Raum sezerniert werden. Sie entstehen während des endosomalen Reifeprozesses durch Einstülpung der limitierenden Membran des multivesikulären, späten Endosoms³². Der endosomale Reifeprozess beginnt beim frühen Endosom, das endozytierte Zelloberflächenproteine enthält. Von hier aus werden die Proteine entweder wiederverwertet oder zum späten Endosom weitergeleitet. Während der Passage durchs frühe bzw. späte Endosom werden die zu degradierenden Proteine in intraluminalen Vesikel (ILV) sortiert, sodass die Endosomen die morphologischen Eigenschaften eines multivesikulären Körpers (multivesicular bodies; MVB) annehmen. In vielen Zellen fusionieren die MVB anschließend zur Proteindegradierung mit Lysosomen. Allerdings konnte mit Hilfe der Elektronenmikroskopie in mehreren Zellen gezeigt werden, dass die späten Endosomen auch mit der Zellmembran fusionieren³³⁻³⁶ und dabei die ILV in den extrazellulären Raum freisetzen. Die exocytierten Vesikel nennt man Exosomen³³.

Die Proteinkomposition von Exosomen scheint nicht willkürlich, sondern strukturiert und geordnet zu sein. Exosomen enthalten u.a. Bestandteile des Zytoskeletts wie Tubulin und Aktin sowie Proteine, die am intrazellulären Transport und an der Membranfusion beteiligt sind. Ebenso enthalten sind Signalproteine wie auch metabolische Enzyme und Antigen präsentierende Proteine ³⁶. Die genaue Aufgabe der Proteine in den Exosomen ist bis heute noch unbekannt ³². Die oben genannten Proteinkompositionen gelten vor allem für Exosomen des immunologischen Bereichs ³⁷. Von Exosomen des zentralen Nervensystems (ZNS) ist kaum etwas über die Proteinzusammensetzung bekannt.

Obwohl Exosomen in allen bisher untersuchten Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden konnten, ist ihre physiologische Relevanz noch weitgehend ungeklärt. Wie bereits erwähnt, sind Exosomen von Zellen des Immunsystems am besten untersucht. Sie dienen u.a. zur Entsorgung bestimmter Proteine, zum Beispiel des Transferrin-Rezeptors während der Reifung von roten Blutzellen ³⁸.

Raposo et al. zeigte, dass Exosomen von EBV-transformierten B-Zellen mit Antigenkomplexen beladen werden und in der Lage sind menschliche CD4⁺T-Zellen zu stimulieren ³⁹. Zitvogel et al. und Amigorena konnten nachweisen, dass Exosomen von dendritischen Zellen eine Immunantwort induzieren können ^{35,40}. Auch hier beschränkt sich das Wissen vor allem auf den immunologischen Bereich, die Funktion von Exosomen des neuronalen Systems ist hingegen kaum erforscht.

Aus den Daten geht hervor, dass Exosomen eine Rolle bei der Zellkommunikation spielen. Denkbar sind Interaktionen zwischen Exosom und Zielzelle durch bestimmte Ligandenkombinationen auf der exosomal Oberfläche oder Präsentationen von Antigenen für bestimmte Zielzellen sowie Fusionen mit der Zielzelle zum Austausch von Proteinen, kodierenden (mRNA) und regulierenden (miRNA) Ribonukleinsäuren und Cytosol ^{32,41}. Letzteres kommt als Modellsystem für den Transport von PrP^C von Zelle zu Zelle via Exosomen in Frage. Für den interzellulären Transport ist neben den Exosomen auch ein anderes, den Exosomen sehr ähnliches Transportsystem denkbar, das Retrovirus. Retroviren können Prionproteine auf ihrer Oberfläche transportieren und ähneln in ihrer Struktur dem Aufbau der Exosomen ^{31,33}.

2.5 Prionprotein und Retroviren

Retroviren (RV) sind umhüllte Viren und ähneln den Exosomen im Bezug auf die Membranzusammensetzung (z.B. Hülle aus Zellmembran), den Ort der Entstehung und Freisetzung³³. Bei ihrer Freisetzung an bestimmten Membranbereichen können sie potenziell PrP^C bzw. PrP^{Sc} transportieren. Daher haben auch Retroviren eine mögliche Funktion beim interzellulären Transport von PrP^C und PrP^{Sc}. Ob der Transport von PrP^{Sc} über Retroviren eine Rolle in der Ausbreitung oder Pathogenese der Prionerkrankung spielen könnte, ist noch nicht bekannt. Retroviren haben eine weltweite Ausbreitung, wie zum Beispiel HIV beim Menschen oder das Visna-Maedi-Virus beim Schaf. Eine Koinfektion von Retroviren und PrP^{Sc} mit möglicher Einflussnahme auf die Pathogenese der Erkrankung ist daher denkbar.

Retroviren bestehen aus Ribonukleinsäure (RNA), reversen Transkriptasen (transkribiert RNA in Desoxyribonukleinsäure (DNA)), Proteasen und Integrasen, umhüllt von einem Kapsid Protein, dem Gag-Polyprotein und bedeckt von einer Lipiddoppelschicht mit gebundenen Envelope Glykoproteinen (ENV). Von vielen Retroviren ist bekannt, dass die Freisetzung ihrer Viruspartikel an der Zellmembran infizierter Zellen stattfindet³³. Neuere Daten zeigen, dass die Viruspartikel-Bildung besonders im Bereich der DRMs und in geringem Maße auch in den Endosomen stattfinden kann⁴²⁻⁴⁵. An DRMs bzw. in Endosomen werden auch körpereigene Proteine passiv in die Viruspartikel mitverpackt. Damit beeinflusst der Ort der Viruspartikelentstehung die Protein- und Lipidzusammensetzung der Virushülle^{42,44,46,47}.

2.6 Prionprotein und Tiermodelle

Daten aus *in vitro* Studien basieren stets auf einfachen Modellsystemen. Um komplexere Systeme mit vielseitigen Interaktionen, verschiedenen Zelltypen und multiplen Organen zu untersuchen, bieten sich Tiermodelle an. Mäuse sind auf Grund ihrer Größe (vgl. Schaf, Rind), ihrer relativ kurzen Generationszeit und wegen vergleichbarer Eigenschaften des hoch konservierten Prionproteins zum menschlichen Korrelat für die Prionforschung gut geeignet. Beide unterscheiden sich zwar durch die Anzahl der Exons (Mensch 2 Exons; Maus: 3 Exons), und deren Lage auf den Chromosomen (Mensch: Chromosom 20p; Maus: Chromosom 2), das kodierende, offene Leseraster (Open Reading Frame) ist jedoch, bis auf wenige ausgetauschte Aminosäuren, identisch und befindet sich in einem Stück beim Menschen auf Exon 2 und bei der Maus auf Exon 3.

Da humane Prionerkrankungen nicht oder nur schwer auf normale Mäuse übertragen werden können, werden Mäuse mit prioninfiziertem Maushirnhomogenat inokuliert. Die Prionen stammen ursprünglich von scrapieinfizierten Schafstämmen, die an Nagetiermodelle adaptiert wurden. In diesem Projekt wurde der mausadaptierte Scrapie-Stamm RML5.0 (Rocky Mountain Laboratory Passage 5.0) verwendet. Mäuse haben eine TSE-Inkubationszeit von 150-300 Tagen, die im Verhältnis zur humanen TSE-Inkubationszeit 1,5 bis 30 Jahre ⁴⁸ „kurz“ ist. Im Tiermodell ergibt sich die Möglichkeit die präklinische Phase und die Inkubationszeit bis zum Ausbruch der Erkrankung zu beobachten.

In vorangegangenen Experimenten von Dr. Susanne Krasemann⁴⁹ wurde ein Mausmodell etabliert, mit welchem der Einfluss einer Retroviruskoinfektion auf die Pathophysiologie einer Prionerkrankung am Tiermodell untersucht werden sollte. Dafür wurde die Versuchsgruppe an Tag 5 mit dem Moloney Murine Leukaemia Virus (MoMuLV) infiziert, einem aus Biosicherheitsgründen mausspezifischen Retrovirus. Anschließend wurde ein Teil der Versuchsgruppe an Tag 21 mit prioninfiziertem Maushirnhomogenat (RML5.0) intraperitoneal inokuliert. Als Vergleichsgruppe wurden Mäuse benutzt, die nur mit RML5.0 an Tag 21 infiziert wurden. Die Kontrollgruppe bestand aus nicht infizierten Mäusen. In einem Bioessay, das Serum und Hirnhomogenat auf replikationskompetente Retroviren testet, wurde die Persistenz der Virusinfektion während des Versuchs sichergestellt.

Überraschenderweise konnte keine Veränderung in der Inkubationszeit zwischen der doppelinfizierten Versuchsgruppe und der prioninfizierten Vergleichsgruppe festgestellt werden. Bei der Untersuchung der Milz, die neben dem ZNS den wichtigsten Replikationsort für PrP^{Sc} darstellt ⁵⁰⁻⁵², wurde zu frühen Zeitpunkten (Tag 30, 60 und 90 post Prioninfektion) mehr PrP^{Sc} in der doppelinfizierten Kohorte gefunden, als in der prioninfizierten Kontrollgruppe.

Die Fragestellung dieser Arbeit lautete erstens, welche Auswirkung hat eine retrovirale Superinfektion auf prioninfizierte sekundär lymphatische Organe und zweitens, wie ist der Proteinbesatz von neuronalen Exosomen bezüglich Prionerkrankung relevanter Proteine.

3. Material

3.1 Arbeitsgeräte

Produkte

Drucker P-93D
Inkubator (Zellkultur)
Magnetrührer mit Heizplatte RCT basic IKAMAG®
Mikroskop Axioskop 40
Mikroskop Eclipse TS 100
Mikrowelle Micromat
MyCycler Thermal cycler (PCR)
pH-Meter CG 840
Pipetboy Integra
Pipette Research fix 0.1-2.5 µl
Pipette Research fix 100-1000 µl
Pipette Research fix 10-100 µl
Pipette Research fix 1-10 µl
PowerPac basic
Schüttler, über Kopf rotierbar
Schüttler STR 6
Sterile Bank
Thermostat plus
Ultrazentrifuge L-60
Vortex-Genie
Wasserbad
Zentrifuge 5415 C
Zentrifuge 5417 R, gekühlt
Zentrifuge 5430 R, gekühlt
Zentrifuge 5810 R, gekühlt

Hersteller

Mitsubishi
Heraeus electronic
IKA Werke GmbH & Co. KG
Zeiss
Nikon
AEG
Biorad
Shott
Bioscience
Eppendorf
Eppendorf
Eppendorf
Eppendorf
Biorad
Hartenstein
Stuart Scientific
Herasafe Heraeus electronic
Eppendorf
Beckman Coulter
Scientific industries
P-D Industriegesell. GmbH
Eppendorf
Eppendorf
Eppendorf
Eppendorf

3.2 Chemikalien und Zubehör

Produkt	Hersteller
Acrylamid Mischung (Rotiphorese Gel 30)	Roth
Aceton	Mallinckrodt Baker B.V
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Bromphenol Blau	Sigma
Glycin	Sigma
Hydrogen Peroxid 35 % (w/v)	Sigma
Magnesiumchlorid	Sigma
2-Mercaptoethanol, 99%	Sigma
Methanol	J.T. Baker
N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich
Page Ruler™	Ladder Fermentas
PVDF Membran Immunoblot™ (0.2 µm)	Biorad
Fettarmes, instant Milchpulver „Frema“	Granovita GmbH
Natrium Azid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich
Natrium Chlorid	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natronlauge	Roth
Proteaseinhibitor, Tabletten	Roche
Saccharose	Roth
Salzsäure	Roth
Stripping-Buffer	Thermo Scientific
SuperSignal West Femto	Thermo Scientific
SuperSignal West Pico	Thermo Scientific
SuperSignal West Dura	Thermo Scientific
Trizma Base (Tris Base)	Sigma
Tween 20 (Polyethylene-Sorbitane Monolaurate)	Roth
Whatman® Paper 3MM (Blottingpapier)	Schleicher&Schuell

3.3 Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung
POM2	Polymenidou ⁵³	1:1000
Hsp70	BD Bioscience	1:1000
Hsp90	BD Bioscience	1:1000
ADAM10	Paul Saftig, Institut für Biochemie	1:1000
α β Aktin	Sigma	1:5000
Gag	B. Chesebro	1:250
Sekundäre Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Maus	Promega	1:10000
Anti-Kaninchen	Promega	1:5000
Anti-Ratte	Promega	1:5000

3.4 Zellkultur

3.4.1 Zellkulturmaterial

Produkt	Hersteller
DMEM (Dulbecco Modified Essential Medium)	PAA
Hoher Glukoseanteil (4.5 g/l) mit L-Glutamin	
Dulbecco's PBS (Phosphate Buffered Saline) (1x)	PAA
FBS (Fetal Bovine Sera), Standardqualität	PAA
Opti-MEM® (Minimal Essential Medium)	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA
Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraacetat) (1x)	PAA
Trypsin-EDTA (10x)	Invitrogen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma

3.4.2 Verwendete Zelllinien

Zelllinie

NIH 3T3 balb-Zellen

N₂a-Zellen

HpL3-4-Zellen

Ursprung

Mausfibroblasten

neuronale Mausezellen

hippocampale Mausezellen

3.4.3 Verwendete Retroviren

Virus

Moloney Murine Leukemia Virus:
(MoMuLV); mausspezifisch

Zelltropismus

hauptsächlich

hämatopoetische Zellen

3.5 Immunhistochemische Färbung

Produkt

Deckgläschen

Ethanol, absolute

Mayer's Hämalan

Harri's Hämatoxylin

Methanol

Objekträger Superfrost

Paraformaldehyd

Diaminobenzidine (DAB)

Gewebe Kleber (Tissue Tek)

Hydrogenperoxide

Xylol

Tragant

Hersteller

Glaswarenfabrik K. Hecht,

Pharmacy UKE

Merck,

ROTH

J.T.Baker

Glaswarenfabrik K. Hecht

Sigma

Sigma

Sakura Finetek GmbH

Sigma

Fischer

Sigma

4. Methode

4.1 Zellkultur

Die Zellkultur dient zur Schaffung und Aufrechterhaltung von optimalen Wachstumsbedingungen von Zelllinien, die ausschließlich für *in vitro* Experimente verwendet werden können.

Es wurden aufgetaute adhärenente Zellen verwendet, die sich an den Boden der Zellkulturflaschen haften. Zunächst wurden die Zellen in Zellkulturflaschen gegeben, mit 15ml Nährmedium bedeckt und bei 37 °C inkubiert. Da die Zellkultur optimale Bedingungen für die Ansiedlung und Vermehrung von Bakterien bietet, enthielt das Nährmedium neben High Glucose auch die Antibiotika Streptomycin und Penicillin. Zusätzlich wurde unter möglichst sterilen Bedingungen gearbeitet, d.h. unter einem zuvor desinfizierten Abzug, mit Handschuhen und sterilen Einmalartikeln, sodass die Durchseuchungsgefahr möglichst gering gehalten wurde. Zudem wurde die Kultur regelmäßig lichtmikroskopisch auf Kontamination und mit Hilfe PCR-basierter Nachweistests auf Mykoplasmenverunreinigung untersucht.

Zellkulturmedium:	555ml
90% DMEM hoher Glukoseanteil (4.5 g/l) mit L-Glutamin	500ml
9% FBS, Standardqualität	50ml
1% Penicillin/Streptomycin (100x)	5ml

Versorgung adhärenenter Zellen

Um zu dicht besiedelte Zellkulturen zu entzerren, damit die Kultur gesund bleibt, werden die Zellen regelmäßig gesplittet und auf neue Zellkulturflaschen aufgeteilt (Zellsplitting).

Jeden zweiten Tag wurden die Zellen gesplittet, dazu wurde die Kulturflasche mit den Zellen vorsichtig geschwenkt, um tote Zellen vom Flaschenboden zu lösen. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 10ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen ca. 5min mit 1ml Trypsin-EDTA (1x) inkubiert, um die Zelladhäsionskontakte zu reduzieren und so die Zellen vom Flaschenboden durch unterstützendes Klopfen und Schwenken zu lösen. Nach Zugabe einer passenden Menge Nährmedium, konnten die Zellen im gewünschten Verhältnis gesplittet und auf neue Zellkulturflaschen verteilt werden. Abschließend wurde die Flasche auf 18ml aufgefüllt und in den Inkubator gelegt.

Einfrieren von Zellen

Zur langfristigen Sicherung von Zellbeständen und bedarfsabhängiger Reaktivierung dient das Einfrieren von Zellen.

Zur Vorbereitung wurden die Zellen normal gesplittet, in ein 5ml Falcon überführt und bei 197g 5min pelletiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit Einfriermedium resuspendiert. Zum Abschluss wurden je 1,8ml der Zellsuspension in 2ml Einfrierröhrchen gegeben und bei -80°C weggefroren.

Einfriermedium:

50% DMEM hoher Glukoseanteil (4.5 g/l) mit L-Glutamin

40% FBS

10% DMSO (gegen Kristallbildung)

4.2 Exosomenisolierung

Die Exosomen aus Zellkulturüberstand werden mittels serieller Zentrifugation isoliert.

Da der Zellkulturmediumzusatz FBS eigene Exosomen enthält, wurde Opti-MEM®, ein reduziertes Serum, verwendet. Zur Vorbereitung wurden die Zellkulturflaschen mit PBS gewaschen und dann mit 15ml Opti-MEM® befüllt. Opti-MEM® ist ein synthetisches, exosomenfreies Medium, womit sichergestellt wurde, dass ausschließlich Exosomen der ausgewählten Zelllinie im Überstand vorhanden waren.

Nach zwei Tagen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen. Anschließend wurden die Überstände seriell bei 4°C zentrifugiert und der Überstand jeweils abgenommen, um erneut zentrifugiert zu werden (s. Tabelle 1). Zur Sedimentation der Exosomen wurde der Überstand bei 4°C in der Ultrazentrifuge bei 100.000g für 70min zentrifugiert. Abschließend wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das Exosomenpellet wurde sofort weiterverwendet oder bei -80°C weggefroren.

Tabelle 1 | Zentrifugationsschritte der Exosomenisolation

Schritt	Beschleunigung (g)	Zeit (min)	Ergebnis
1	197	5	Absetzung von apoptotischen Zellen
2	1878	10	Absetzung von Zellüberresten, Zellorganellen, Zellkernen
3	20.000	30	Absetzung von größeren Vesikeln
4	100.000	70	Sedimentation der Exosomen (Pelletbildung)

4.3 Elektrophorese und Westernblot

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. SDS (Sodium Dodecyl Sulfate; Natriumdodecylphosphat) wirkt dabei als anionisches Tensid, das die Eigenladung der Proteine maskiert und durch eine konstante negative Ladungsverteilung ersetzt.

Nach dem Zusammengeben der entsprechenden Chemikalien (s.u.), wurde das Gel in eine Flachbettgelkammer mit 10 Probentaschen von je 45µl Volumen gegossen. Für das Trenngel wurde mit einem Acrylamidanteil von 12% gearbeitet, um eine optimale Auftrennung der etwa 27-3kDa großen Prionproteine zu erreichen. Das Sammelgel hatte einen 5% Anteil an Acrylamid. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer mit Elektrophoresepuffer eingehängt.

Tabelle 2 | CVL-Bestandteile und ihre Funktion

CVL-Bestandteile	Wirkung auf Proteine
SDS	Konformationsänderung; Streckung
β-Mercaptoethanol	Auflösung der Disulfidbrücken
Glycerin	Einheitliche Ladung
Bromphenol Blau	Blaufärbung der Probe

Die Proben wurden jeweils mit RIPA-Puffer bzw PBS und Loading-Puffer (CVL) auf die gewünschte Konzentration verdünnt, 10min bei 95°C aufgekocht und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Nachdem die Proben bei 70-80 Volt 20min in das Sammelgel eingelaufen waren, wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht. Abhängig von der benötigten Auftrennung der Proben betrug die Laufzeit des Gels zwischen einer und drei Stunden.

12% Trenngel**20ml:**

destilliertes Wasser (Aqua dest.)

6,6ml

30% Acrylamid Mischung

8ml

1,5M Tris-HCl pH 8,8

5ml

0,4% SDS

200µl

zur Polymerisation:

10% APS

200µl

Temed (Tertramethylethylenediamine)

20µl

5% Sammelgel:**10ml**

destilliertes Wasser (Aqua dest.)

6,8ml

30% Acrylamid Mischung

1,7ml

1M TrisHCl pH 6,8

1,25ml

0,4% SDS

100µl

zur Polymerisation:

10% APS

100µl

Temed (Tertramethylethylenediamine)

10µl

RIPA-Puffer**100ml**

50mM TrisHCl-base pH 8,0

5ml 1M TrisHCl

150 mM NaCl

3ml

1% NP40

1ml

0,5% Na Deoxycholate

0,5g

0,1% SDS

10ml 10% SDS

Zu 10 ml RIPA-Puffer wird eine Tablette Proteaseinhibitor gegeben

CVL-Puffer**10x**

2g SDS

5ml 1M Tris/HCl (pH 7.4)

0,5ml Mercaptoethanol

3g Sucrose

auf 20ml mit Aqua dest. auffüllen; pH-Wert (6,8) mit HCl einstellen; 1% Bromphenol-blau

Elektrophorese-Puffer**10x**

250mM Tris Base	30g/l
1,92M Glycin	144g/l
0,1% SDS	10g/l
pH 8,3-8,8	

Um einen Liter einfachen Elektrophorese-Puffer zu erhalten, wurden 100ml des 10x Elektrophorese-Puffers zu 900ml destilliertem Wasser gegeben.

Westernblot

Der Westernblot ist eine analytische Technik, um spezifische Proteine aus Proben von Gewebekomponenten oder Extrakten zu detektieren, die zuvor durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) aufgetrennt wurden. Dabei werden die Proteine durch Stromspannung auf eine Membran transferiert und bleiben dort durch hydrophobe Wechselwirkungen haften.

Das Gel aus der SDS-Page wurde mit einer proteinbindenden PVDF-(Polyvinylidenfluorid) Membran und Filterpapieren zwischen zwei Schwämme gelegt und fixiert. Anschließend wurde diese Kombination in eine Blottingkammer mit Wet-Puffer gehängt. Damit der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran stattfinden konnte, wurde für 65min 200mA Strom angelegt. Um eine starke Erwärmung der Proben zu verhindern, wurde die Blottingkammer mit Eis gekühlt. Danach wurde die PVDF-Membran vorsichtig aus ihrer Fixierung befreit und in TBST mit 5% Milchpulver für 1h gewaschen, um die unspezifischen Bindungsstellen der Membran zu blocken. Anschließend wurde mit dem ersten Antikörper, der spezifisch für das zu untersuchende Protein ist, über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit TBST für jeweils 20min gewaschen und anschließend für 1h mit dem zweiten Antikörper inkubiert, der den ersten Antikörper spezifisch bindet. Anschließend wurde dreimal jeweils 20min mit TBST gewaschen.

Zur Detektion der Zielproteine wurden die Proteinbanden mit Hilfe einer Chemolumineszenz sichtbar gemacht. Hierbei wurde abhängig von der Signalintensität mit Super Signal West Pico, Super Signal West Dura oder Super Signal West Femto gearbeitet.

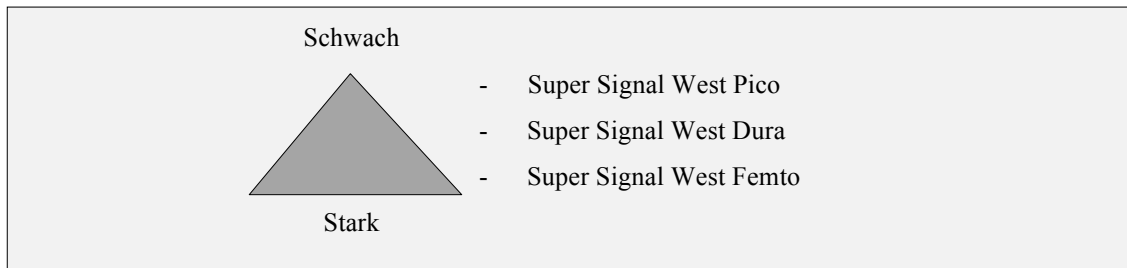
Abbildung 1 | Erwartete Bandenintensität

Abbildung zur Bandenintensität der verschiedenen Chemolumineszenzen: Super Signal West Pico, Super Signal West Dura oder Super Signal West Femto.

TBST (Tris buffered saline und Tween20)

10x

20mM Tris Base pH 7.6	24,22g
150mM NaCl	87,66g
0,05% Tween20	5,00g

Um einen Liter einfaches TBST zu erhalten, wurden 100ml 10xTBST zu 900ml destilliertem Wasser gegeben.

Blotting-Puffer (Wet Puffer)

10x

250mM Tris Base	30,3g/l
1,92M Glycin	144g/l

Um einen Liter einfachen Blotting-Puffer zu erhalten, wurden 100ml des 10-fachen Blotting-Puffers zu 200ml Methanol und 700ml destilliertem Wasser gegeben.

Magermilch

5% Magermilchpulver

95% TBST

Blot-Stripping

Um weitere Zielproteine auf der Membran zu detektieren, wurde mit Hilfe des Blot-Strippings die Verbindung vom ersten Antikörper zu den Proteinen auf der Membran wieder gelöst.

Die Membran wurde kurz mit destilliertem Wasser abgespült und dann 20min mit dem Stripping Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit TBST für jeweils 20min gewaschen und mit einem neuen Antikörper, spezifisch für das zu untersuchende Protein, inkubiert.

4.4 Immunhistochemische Färbung

Mittels immunhistochemischer Färbung werden Proteine mit Hilfe von Antikörpern und einer daran gekoppelten Farbreaktion in Gewebedünnschnitten sichtbar gemacht.

Immunhistochemische Färbung von FDCs (follikuläre dendritische Zellen) auf Kryopräparaten

Bei dieser Art von immunhistochemischer Färbung haben die verwendeten primären Antikörper eine hohe Affinität und Spezifität zu bestimmten Epitopen auf den follikulären dendritischen Zellen, sodass diese durch die anschließende Farbreaktion markiert und so im Lichtmikroskop dokumentiert werden.

Die immunhistochemische Markierung wurde mit Hilfe des BD Pharmingen Anti-Rat Ig HRP Detection Kit und dem dazugehörigen primären Antikörper durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde die Milz aus dem Organismus präpariert und unmittelbar danach mit Hilfe von flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Dabei diente Methylbutanol als Übergangsmedium zur gleichmäßigen Abkühlung des Präparats. Anschließend wurden mit Hilfe eines Kryostaten 8µm dicke Schnitte vom Präparat angefertigt und nach zweiminütiger Fixierung in gekühltem Aceton an der Luft getrocknet.

Nachdem die Schnitte dreimal je 5min in PBS gewaschen wurden, wurden sie für 10min in H₂O₂ (0,3% in PBS) inkubiert und dann erneut dreimal je 2min in PBS gewaschen. Das H₂O₂ diente zum Blocken der endogenen Peroxidaseaktivität, um falsch positive Reaktionen zu vermeiden. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer mit einem FDC spezifischen Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie dreimal für je 2min mit PBS gewaschen und anschließend für 30min mit einem sekundären Antikörper (Anti-

Ratte) bei Raumtemperatur inkubiert. Letzterer bindet den ersten Antikörper und ist mit Biotin gekoppelt.

Nach erneutem dreimaligen Waschen für je 2min mit PBS wurden die Schnitte für 30min mit Streptavidin-HRP (Horseradish Peroxidase) inkubiert. Das Enzym bindet über eine Streptavidin-Biotin Interaktion an den zweiten Antikörper.

Anschließend wurden die Schnitte ein letztes Mal mit PBS dreimal je 2min gewaschen, um sie dann mit gepuffertem DAB Chromogen für 5min zu inkubieren. Dabei wirkt DAB Chromogen als Substrat, das durch die HRP in einer enzymatischen Reaktion zu einem Farbprodukt umgesetzt wird und präzipitiert. Zum Beenden der Reaktion wurden die Schnitte vorsichtig mit Leitungswasser gespült.

Um das umliegende Gewebe darzustellen, wurde eine Gegenfärbung mit Hämalun durchgeführt. Dafür wurden die Schnitte 30sec in Hämalun getaucht und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (80%; 96%; 100%; 100%) gespült, um die Gewebeschnitte zu dehydrieren. Zur Fixierung wurde der gefärbte Schnitt mit einem Deckglas und einem Tropfen lipophilen Xylens eingedeckt.

4.5 NaPTA-Präzipitation

Mit Hilfe der NaPTA (Natrium-Phosphorwolframat) -Präzipitation ist es möglich, aus einer Gewebeprobe PrP^{Sc} anzureichern.

Die Gewebeprobe wurde in 100mg schwere Aliquots geschnitten und mit Hilfe von 900 μl Buffer (25mM HEPES (pH 7,2), 0,3M Sucrose und 53,6 μg Liberase Blendzyme 2 (Roche)) homogenisiert. Anschließend wurde die Probe bei 37°C 30min lang inkubiert und wiederholt homogenisiert (FastPrep FP120). Von diesem Homogenat wurden 500 μl von 10% (w/v) mit 500 μl 4% Sarkosyl-PBS gemischt und für 10min bei konstanter Bewegung und 37°C inkubiert. Im Folgenden wurde zu 1ml der Probe 50U/ml Benzonase und MgCl_2 gegeben und bei 37°C und konstant kräftiger Bewegung für 30min inkubiert.

Dann wurde 81,3 μl vorgewärmte (37°C) 4% (w/v) NaPTA (Natrium Phosphotungstic Acid)/ 170mM MgCl_2 Lösung (pH 7,4) hinzugegeben, gemischt und unter schütteln bei 37°C für 30min inkubiert. Abschließend wurden die Proben bei 25.000g 30min lang zentrifugiert, der Überstand abgenommen, die Pellets in 22,5 μl 0,1% Sarkosyl-PBS resuspendiert.

Damit PrP^{Sc} von residualem PrP^C unterschieden werden konnte, wurde 20 µg/ml Proteinase K zur Probe gegeben. Proteinase K ist eine Protease und degradiert PrP^C vollständig, wohingegen PrP^{Sc} nur partiell verdaut wird. Zurück bleibt ein 27-30kDa schweres Protein, welches gegen den Verdau der Proteinase resistent ist. Um die Enzymreaktion zu stoppen, wird die Probe, nach Zugabe eines 10-fachen Probenpuffers, 10min lang aufgekocht. Anschließend wird das Ergebnis via Westernblot detektiert.

5. Ergebnisse

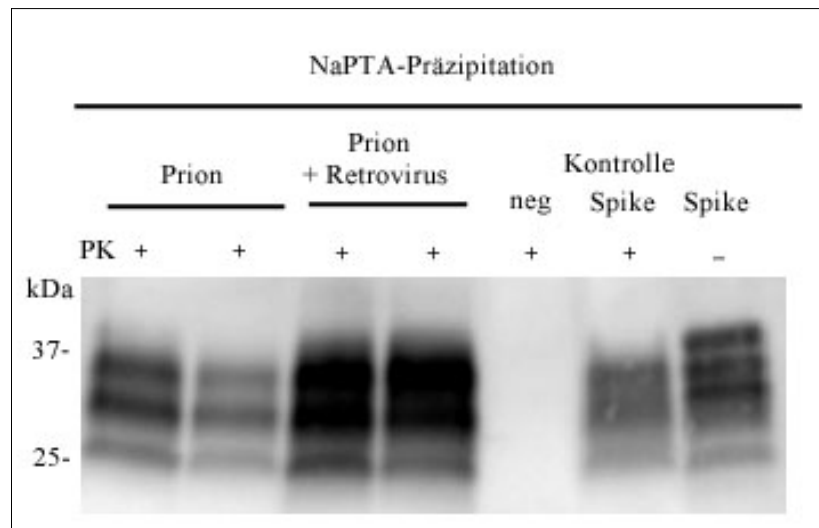
5.1 Auswirkung einer Doppelinfektion mit Prionen und Retroviren auf die Milz

Die Milz ist ein sekundär lymphatisches Organ und für die Pathogenese der Prionerkrankung von besonderem Interesse, da sie einen der wesentlichen Orte für die frühe Prionreplikation darstellt^{24–27,54,55}.

5.1.1 Erhöhte PrP^{Sc}-Mengen in der Milz zu frühen Zeitpunkten der Doppelinfektion

Dr. Susanne Krasemann⁴⁹ konnte in einem Tiermodell für die Koinfektion mit PrP^{Sc} und Retroviren zeigen, dass eine zusätzliche Retrovirusinfektion die Menge an aggregiertem PrP^{Sc} in der Milz zu frühen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufs erhöht.

Abbildung 2 | Deutlicher PrP^{Sc}-Anstieg in Milzen doppelinfizierter Tiere an Tag 60 post Prioninfektion



Westernblotanalyse nach NaPTA-Präzipitation mit anschließendem Proteinase K-Verdau. Abgebildet sind Proben von prioninfizierten Mäusen mit und ohne Retrovirusinfektion. Deutlich ist ein Anstieg der PrP^{Sc}-Menge bei den doppelinfizierten Mäusen zu erkennen.

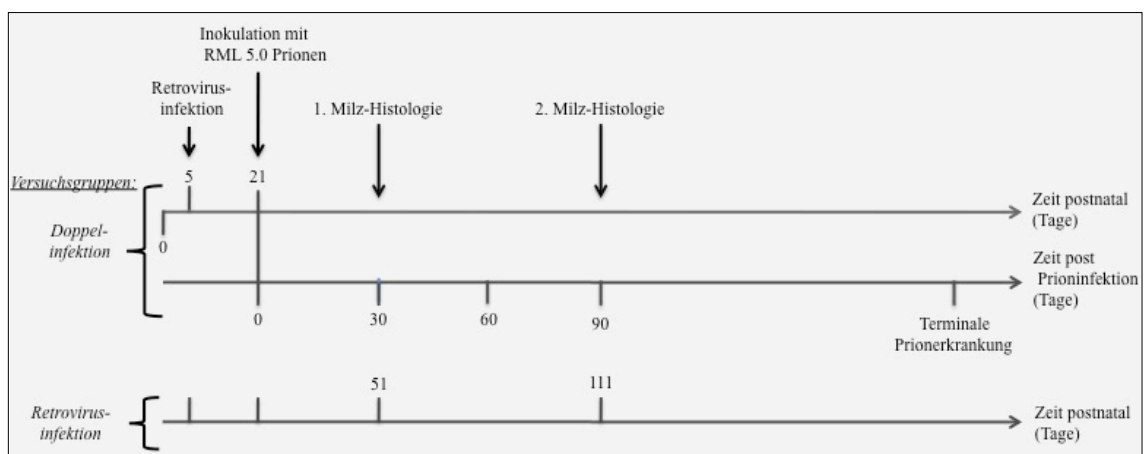
5.1.2 Retrovirusinfektion führt qualitativ zu erhöhter FDC-Aktivierung in der Milz

In Milzen koinfizierter Mäuse (Prion/Retrovirus) konnte eine erhöhte PrP^{Sc}-Menge nachgewiesen werden (s. Abbildung 2). Um diesen Anstieg näher zu charakterisieren, wurde die Aktivierung von Zellen in der Milz durch Retroviren als Möglichkeit in Betracht gezogen und mit der unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Da die Rolle von FDCs für die

Prionreplikation bekannt ist^{24–28} und sie bei einer generellen Aktivierung der Milz (z.B. durch Viren) vermehrt rekrutiert werden, wurden sie als Maß für die Aktivierung von Zellen in der Milz ausgewählt.

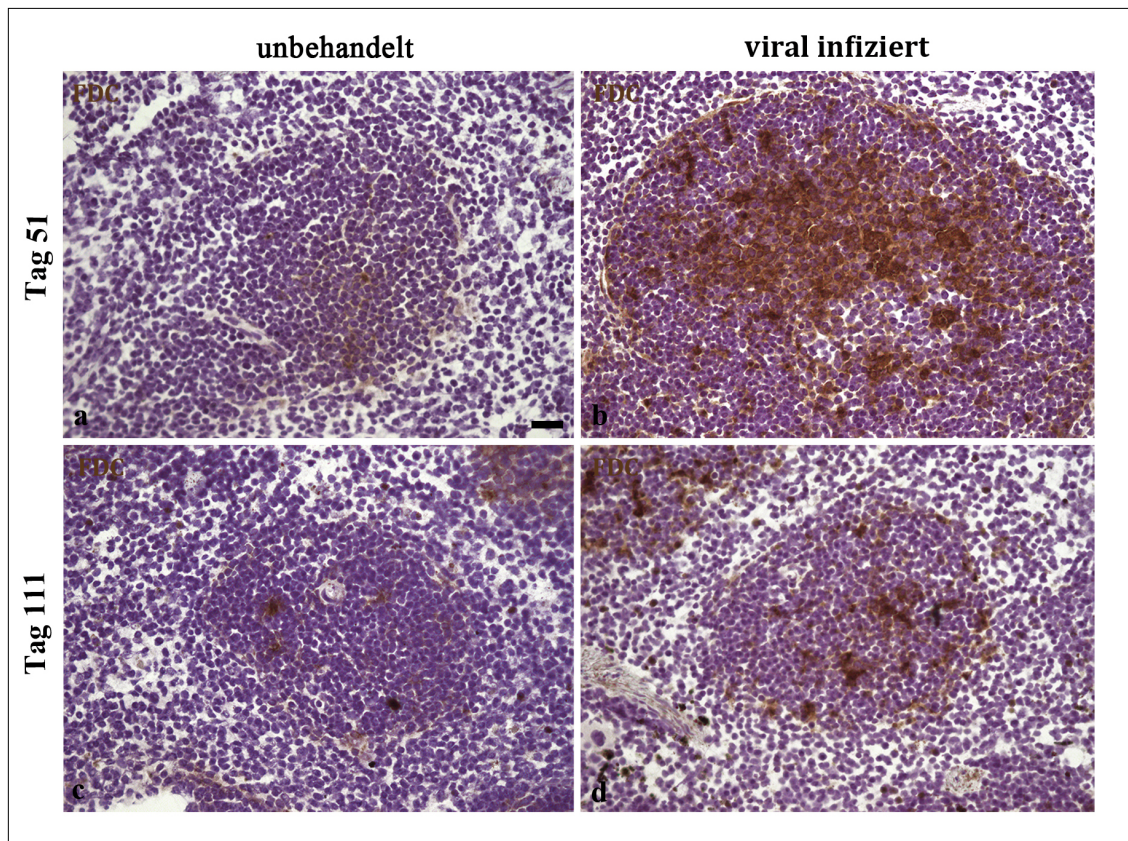
In unserer Studie haben wir mit zwei Kohorten gearbeitet. Unsere Versuchsgruppe waren Mäuse die mit dem Retrovirus MoMuLV an Tag 5 infiziert wurden. Als Kontrollgruppe dienten nicht infizierte Mäuse. Zu den Zeitpunkten Tag 51 postnatal (entspricht Tag 30 post Prioninfektion) und Tag 111 postnatal (entspricht Tag 90 post Prioninfektion) wurde von drei Mäusen jeder Kohorte die Milz entnommen und kryofixiert. Anschließend wurden Histoschnitte dieser Milzen angefertigt und die Menge an FDCs mittels immunhistochemischer Färbung bestimmt.

Abbildung 3 | Inokulationsschema des Mausmodells



Die Abbildung zeigt das Inokulationsschema des Mausmodells. An Tag 5 postnatal wurden die Versuchsgruppen mit MoMuLV infiziert. Die Tiere aus der doppelinfizierten Gruppe (Prion/RV) von Dr. Krasemann⁴⁹ wurden an Tag 21 postnatal mit RML5.0 Prionen inokuliert, dieser Tag entspricht Tag 0 post Prioninfektion. An Tag 30, 60 und 90 post Prioninfektion wurden Proben aus Milz und Gehirn der koinfizierten Tiere gewonnen und u.a. die PrP^{Sc}-Menge in der Milz bestimmt. Zum besseren Vergleich haben wir zu den selben Zeitpunkten, also an Tag 30 und 90 post Prioninfektion (entspricht Tag 51 und 111 postnatal), auch aus der retrovirusinfizierten Versuchsgruppe Milzproben entnommen und untersucht.

Die FDCs waren als bräunlich angefärbte Areale in den Milzfollikeln unter dem Lichtmikroskop erkennbar. An Tag 51 wurden in der RV-infizierten Versuchsgruppe deutlich mehr FDCs beobachtet als in der Kontrollgruppe.

Abbildung 4 | Deutlich erhöhte Zahl von FDCs bei retrovirusinfizierten Mäusen an Tag 51

Die Abbildungen zeigen immunhistochemische FDC-Färbungen von repräsentativen Milzfollikeln retrovirusinfizierter Mäuse, sowie deren Kontrolle zu unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 51; Tag 111). An Tag 51 ist die Menge der FDCs in den retroviralen Follikeln (b) im Vergleich zur Kontrolle (a) deutlich erhöht. Dagegen ist die Zahl der FDCs in den retroviralen Follikeln an Tag 111 (d) wieder in Richtung Kontrollniveau (c) gesunken; Maßstab 200µm.

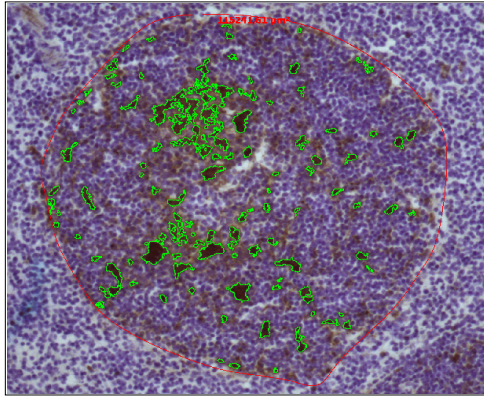
5.1.3 Etablierung einer semiquantitativen Methode zur Bestimmung der FDC-Aktivierung

Um die Beobachtung der vermehrten FDC-Anzahl zu frühen Zeitpunkten in der Milz retrovirusinfizierter Mäuse zu quantifizieren, wurde ein Protokoll zur Bestimmung des prozentualen Anteils der FDCs am gesamten Follikel etabliert. Die Auswertung wurde mittels einer Computer gestützten Morphometrieinheit mit der Software AxioVision Release 4.6 (Carl Zeiss) vorgenommen.

Zu Beginn wurde die Fläche des Milzfollikels mit Hilfe des Programmes berechnet. Anschließend rechnete das Programm die Flächen aller gefärbten Areale einer bestimmten Farbintensität zusammen. Dabei konnte die Stärke der ausgewählten Farbintensität manuell, je

nach Hintergrundintensität der Färbung, angepasst werden. Dadurch war es möglich, die Farbintensität individuell zu bestimmen und Artefakte von der Berechnung auszuschließen.

Abbildung 5 | Semiquantitative Messung mittels einer Computer gestützten Morphometrieinheit



Die Abbildung zeigt die semiquantitative Messung der FDC-positiven Färbung innerhalb eines Milzfollikels. Zuerst wurde der Follikel mit einem Cursor umfahren und die Fläche berechnet. Anschließend wurden vom Programm die gefärbten Areale einer standardisierten Farbintensität markiert und die Flächen addiert. Manuell konnte die Farbintensität an die immunhistochemische Färbung angepasst und Artefakte entfernt werden.

Aus der Follikelgesamtfläche und den summierten, angefärbten Arealen (Maß für die FDC-Anzahl) konnte der prozentuale Anteil der FDCs am Gesamtfollikel berechnet werden.

Abbildung 6 | Formel für die Berechnung des prozentualen Anteils der gefärbten Areale

A	Summe der angefärbten Follikelareale
F	Fläche des Gesamtfollikels
p	Prozentualer Anteil der gefärbten Areale am Gesamtfollikel

$$\frac{A}{F} \times 100 = p$$

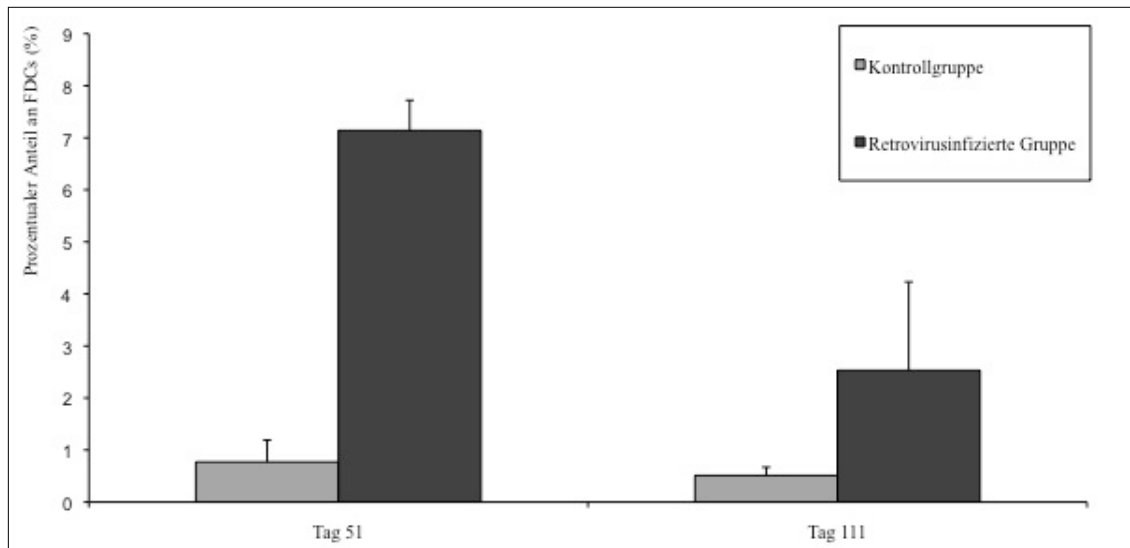
Die Abbildung zeigt die Formel zur Berechnung des prozentualen Anteils der gefärbten Areale am Gesamtfollikel, berechnet mittels der Summe der angefärbten Follikelareale dividiert durch die Fläche des Gesamtfollikels.

Pro Kohorte wurden die Milzen von drei Tieren untersucht. Von jedem Tier wurde von mindestens fünf Follikeln der prozentuale Anteil der gefärbten Areale erhoben. Anschließend wurde von den gewonnenen Daten jeweils die Gesamtaktivierung der einzelnen Mäuse bestimmt (vgl. Tabellen 3-6 im Anhang).

Aus den Gesamtaktivierungen der drei Tiere einer Kohorte wurde der Mittelwert gebildet, der den Anteil der gefärbten Areale am Gesamtfollikel einer Kohorte beschrieb und ein Maß für die mittlere Anzahl von FDCs darstellte. Die Daten wurden in einem Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt.

5.1.4 Retrovirusinfektion führt quantitativ zu erhöhter FDC-Aktivierung in der Milz

Abbildung 7 | Diagramm zur semiquantitativen Bestimmung der FDC-Anzahl in der Milz



	Tag 51 Kontrollgruppe (%)	Tag 51 Retrovirusinfizierte Gruppe (%)	Tag 111 Kontrollgruppe (%)	Tag 111 Retrovirusinfizierte Gruppe (%)
	0,83	6,66	0,40	2,70
	0,32	6,97	0,43	4,14
	1,16	7,78	0,69	0,76
Mittelwert	0,77	7,14	0,51	2,53
Standardabweichung	0,42	0,58	0,16	1,7

Das Diagramm zeigt die FDC-Anzahl der retrovirusinfizierten Gruppe und der Kontrollgruppe. Deutlich ist der Anstieg der FDC-Anzahl bei der retrovirusinfizierten Gruppe an Tag 51 zu erkennen (Tag 51 7,14%), wohingegen die FDC-Anzahl an Tag 111 wieder Richtung Kontrollgruppenlevel sinkt (Tag 111 2,53%). Kontrollgruppe: Tag 51 0,77%; Tag 111 0,51%.

Das Diagramm zeigt eine erhöhte Menge von FDCs in retrovirusinfizierten Milzen an Tag 51 (infiziert 7,14%; unbehandelt 0,77%). Dagegen sinkt an Tag 111 trotz persistierender Retrovirusinfektion die FDC-Anzahl wieder Richtung Kontrolllevel (infiziert 2,53%; unbehandelt 0,51%).

5.1.5 Erhöhte PrP^{Sc}-Mengen korrelieren mit vermehrter FDC-Aktivität

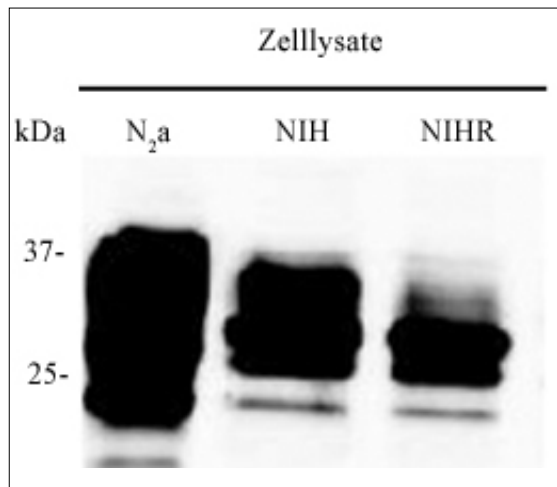
Die Daten passen zu den Ergebnissen von Dr. Susanne Krasemann⁴⁹. Die erhöhte FDC-Anzahl an Tag 51 korreliert mit dem gesteigerten PrP^{Sc}-Vorkommen in der Milz zu frühen Zeitpunkten der Doppelinfektion. Des Weiteren geht die verminderte FDC-Aktivierung an Tag 111 mit einer PrP^{Sc}-Menge einher, die sich kaum mehr von den Kontrollgruppen unterscheidet. Daher ist die Theorie, dass bei einer Doppelinfektion eine erhöhte Zell- bzw. FDC-Aktivierung, verursacht durch Retroviren, zu einer vermehrten PrP^{Sc}-Menge in der Milz führt.

5.2 Charakterisierung und Interaktion von PrP^C auf kleinen Vesikeln

Es ist bekannt, dass PrP^{Sc} sowie PrP^C in Präparationen von Exosomen und Retroviruspartikeln vorhanden sind ³¹. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Exosomen wie auch Retroviruspartikel mit PrP^{Sc} assoziiert sind. Damit sind sie eine potentielle Transportmöglichkeit für PrP^{Sc} während der Pathogenese einer Prionerkrankung *in vivo*. Zum besseren Verständnis dieses potentiellen Mechanismus, wurde zunächst die physiologische Form vom Prionprotein (PrP^C) auf Exosomen näher charakterisiert. Anschließend wurden mögliche Interaktionspartner ausfindig gemacht, um mehr über die Funktion des exosomalen PrP^C zu erfahren.

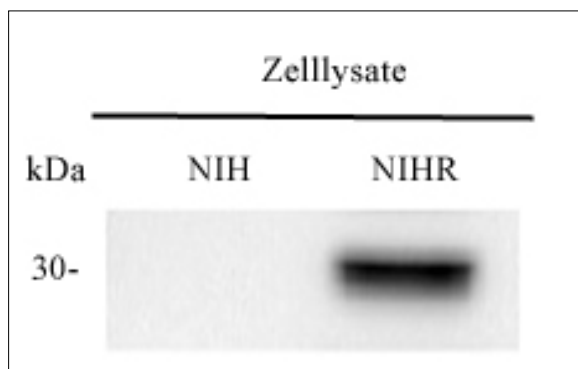
5.2.1 Etablierung einer Methode zur Isolierung von Exosomen

Zunächst wurde eine Methode zur Isolation von Exosomen aus Zellkulturüberstand etabliert. Dafür sollten Exosomen aus verschiedenen Zelllinien isoliert werden. Verwendet wurden neuronale Mauszellen (N₂a-Zellen), die eine sehr hohe PrP^C-Expression haben und für weitere Versuche potentiell mit mausadaptierten PrP^{Sc}-Stämmen infizierbar sind. Als zweite Zelllinie wurden Mausfibroblasten (NIH 3T3-Zellen) verwendet, die ebenfalls mit mausadaptierten PrP^{Sc}-Stämmen infizierbar sind aber deutlich weniger PrP^C exprimieren. Von beiden Zelllinien wurde jeweils ein Teil der Zellpopulation mit MoMuLV infiziert, um den Einfluss von Retroviren auf das Shedding von PrP^C *in vitro* zu untersuchen. Lediglich mit den retrovirusinfizierten NIH-Zellen (NIHR-Zellen) konnte eine stabile Infektion erreicht werden, da die N₂a-Zellen nach MoMuLV-Infektion wiederholt abstarben. Als Kontrolle wurde u.a. eine hippokampale Mauszelllinie (PrP^{0/0}= HpL3-4) ⁵⁶ benutzt, bei der das PrP-Gen ausgeschaltet wurde und die kein Prionprotein produziert, sogenannte PrP^C-Knock-out-Zellen.

Abbildung 8 | Vergleich der PrP^C-Expression unterschiedlicher Zelllinien

Der Westernblot zeigt Lysate von N₂a-Zellen, NIH-Zellen und mit Retroviren infizierte NIH-Zellen (NIHR) auf einem Westernblot. Detektiert wurde mit dem Prionprotein spezifischen Antikörper POM2. Man sieht deutlich die wesentlich stärkere PrP^C-Expression der N₂a-Zellen im Vergleich zu den NIH-Zellen.

Zum Nachweis der MoMuLV-Infektion bei den NIHR-Zellen wurden Lysate der NIH- und NIHR-Zellen auf einen Westernblot aufgetragen und mit einem Antikörper gegen das virusspezifische Capsidprotein Gag, detektiert.

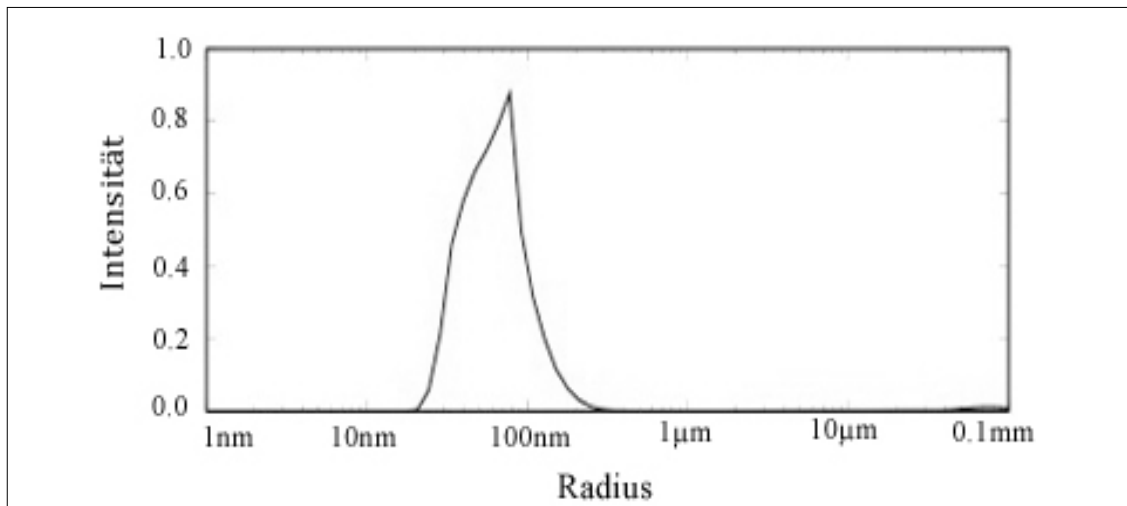
Abbildung 9 | Nachweis der MoMuLV-Infektion

Der Westernblot zeigt Zelllysate von retrovirusinfizierten NIH-Zellen (NIHR) und als Kontrolle unbehandelte NIH-Zellen, detektiert mit einem Anti-Gag-Antikörper.

Um sicher zu stellen, dass die isolierten Exosomen ausschließlich von den kultivierten Zelllinien stammten, wurde ein exosomenfreies Medium benutzt. Dazu wurde das Standardmedium (DMEM mit 50ml FBS), das potentiell Exosomen enthalten kann, depletiert und mit dem synthetischen Vollmedium (Opti-MEM®) verglichen. Da kein quantitativer Unterschied festgestellt werden konnte und die Herstellung eines depletierten Standardmedium ein höheres Kontaminationsrisiko barg, wurde Opti-MEM® für alle weiteren Exosomenisolationen verwendet. Zur Überprüfung der Reinheit der Exosomenisolation wurden Proben mit Hilfe der Photonenkorrelationsspektroskopie (Dynamic-Light-Scattering) untersucht.

Die Auswertung zeigte (s. Abbildung 10), dass die in der Probe befindlichen Vesikel um die 40-120nm groß waren, was dem Radius von Exosomen entspricht. Auch der Durchmesser von RV-Partikeln liegt in diesem Größenbereich (80-100nm)⁵⁷. Wird also Zellkulturüberstand von retrovirusinfizierten Zellen für diese Methode verwendet, erhält man eine gemischte Vesikelpräparation aus Exosomen und RV-Partikeln.

Abbildung 10 | Photonenkorrelationsspektroskopie von Exosomen



Photonenkorrelationsspektroskopie (Dynamic-Light-Scattering) ist eine Technik zur indirekten Bestimmung der Partikelgröße von sehr kleinen Partikeln (3nm-3µm). Dabei wird die Brownsche Molekularbewegung der Partikel genutzt: Eine Suspension mit den zu bestimmenden Partikeln wird mit einem Laser (monochromatisches Licht 660nm) bestrahlt. Je nach Position des Partikels in der Suspension wird das Laserlicht unterschiedlich gestreut. Die gestreuten Lichtintensitäten werden zu verschiedenen Zeitpunkten detektiert, um anschließend die Partikelgeschwindigkeit zu bestimmen. Sie entspricht der Geschwindigkeit der Änderung der gemessenen Streulichtintensitäten. Anschließend wird die Diffusionskonstante berechnet und mit Hilfe der Einstein-Gleichung die Partikelgröße bestimmt. (Zusammenarbeit mit der AG Dr. Lars Redecke; DESY).

Es ist bekannt, dass Zellen glykolytierte und unglykolytierte Formen von PrP^C auf ihrer Oberfläche tragen. Dort ist es durch einen GPI-Anker an der äußeren Schicht der Zellmembran befestigt. Es wird durch bis jetzt noch unbekannte Proteasen prozessiert und durch die Sheddase ADAM10 (s.u.) kurz über dem GPI-Anker geschnitten und in den Extrazellulärraum entlassen. Vor diesem Hintergrund sollte untersucht werden, welche Subtypen von PrP^C in Vesikel verpackt sind, wo sie lokalisiert sind und ob es hier Unterschiede zwischen unbehandelten und retrovirusinfizierten Zellen gibt.

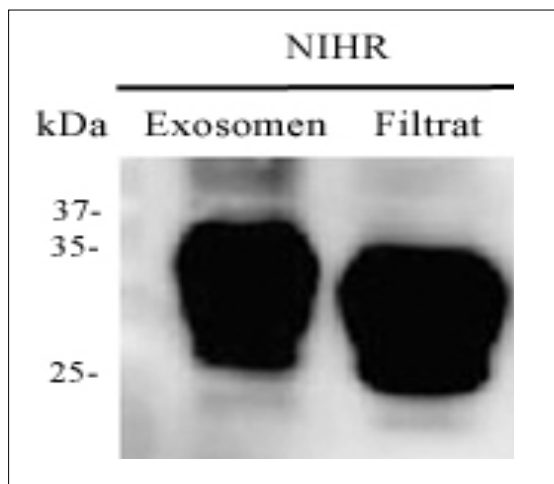
5.2.2 Vesikuläres PrP^C trägt einen GPI-Anker

Zur Charakterisierung der auf Vesikeln vorhandenen PrP^C-Subtypen von gesunden bzw. retrovirusinfizierten Zellen wurde untersucht, welche Variante von PrP^C in Exosomen/RV-Partikeln vorkommt. Gleicht sie dem membranständigen, GPI-verankerten, zellulären PrP^C oder handelt es sich um einen Subtyp?

Dazu wurde vesikuläres PrP^C und zelluläres PrP^C von NIH- bzw. NIHR-Zellen sowie membranankerfreies, prozessiertes PrP^C aus Zellkulturüberstand mittels Westernblot verglichen und untersucht.

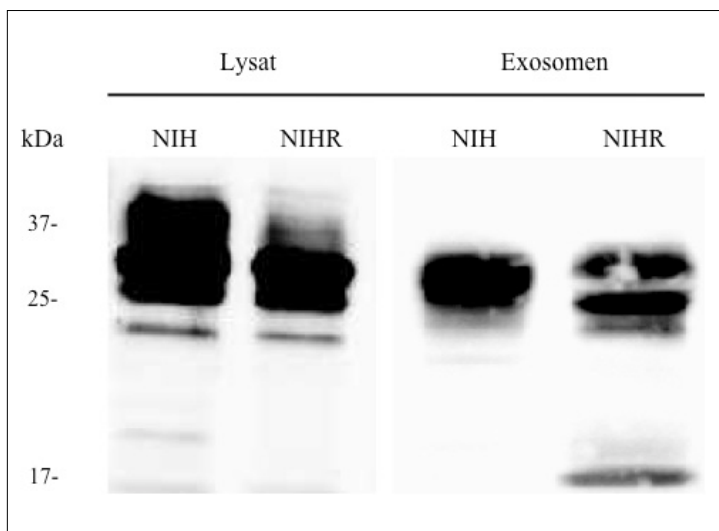
Membranankerfreies PrP^C entsteht bei der Prozessierung des membranständigen PrP^C durch die Metalloproteinase ADAM10 (A Disintegrin and Metalloproteinase)¹⁴, indem das Protein kurz oberhalb des GPI-Ankers geschnitten und in den Extrazellulärraum entlassen wird. Um diese Form von PrP^C zu isolieren, wurde zunächst Zellkulturüberstand von sechs NIHR-Zellkulturflaschen je 15ml genommen, bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen, um ihn erneut zu zentrifugieren (197g 5min; 1878g 10min). Durch diese Methode wurde die Probe von größeren Partikeln, wie apoptotischen Zellen, Zellkernen, -organellen und -membranfragmenten befreit. Anschließend wurde die Probe durch einen Filter mit einer Ausschlussgrenze von Proteinen, die größer als 50kDa sind, filtriert. Übrig blieb das Filtrat mit allen niedrigmolekularen Substanzen, die kleiner als 50kDa waren (z.B. PrP^C). Dieses Filtrat wurde mit Hilfe eines 3kDa Filters auf 500µl einkonzentriert und via Westernblot, im Vergleich zu PrP^C auf Vesikeln, detektiert.

Abbildung 11 | Deutliche Verschiebung der Proteinbanden zwischen membranankerfreiem PrP^C und vesikulärem PrP^C



Der Westernblot zeigt die Detektion von PrP^C in einer Vesikel- und Filtratpräparation mit dem Antikörper POM2. Es ist eine deutliche Verschiebung der Proteinbanden von der Vesikelprobe zur Filtratprobe erkennbar. Die Differenz zwischen den Banden beträgt ca. 2kDa, was der putativen Größe des GPI-Ankers entspricht.

Abbildung 12 | Vesikuläres PrP^C hat die gleiche Proteinbandenhöhe wie zelluläres PrP^C



Der Westernblot zeigt die Detektion von PrP^C in einer Vesikel- und Lysatpräparation mit dem Antikörper POM2. Es ist zu erkennen, dass sich die PrP^C-Banden der unterschiedlichen Präparationen, unabhängig von der Retrovirusinfektion auf gleicher Höhe befinden. Auffällig sind die verschiedenen Bandenmuster, die auf einen Unterschied im Glykosylierungsmuster hindeuten.

Es ist ein deutlicher Größenunterschied (ca. 2kDa) der Proteinbanden zwischen dem membranankerfreien PrP^C und dem vesikulären PrP^C zu erkennen (vgl. Abb. 15). Die deutliche Verschiebung der Proteinbanden legt nahe, dass die vesikuläre Variante von PrP^C, wie die zelluläre Form, noch den 2kDa schweren GPI-Anker trägt. Dafür spricht auch die gleiche Höhe der Proteinbanden von vesikulärem und zellulärem PrP^C, unabhängig von der Retrovirusinfektion, im Vergleichswesternblot (vgl. Abb. 16).

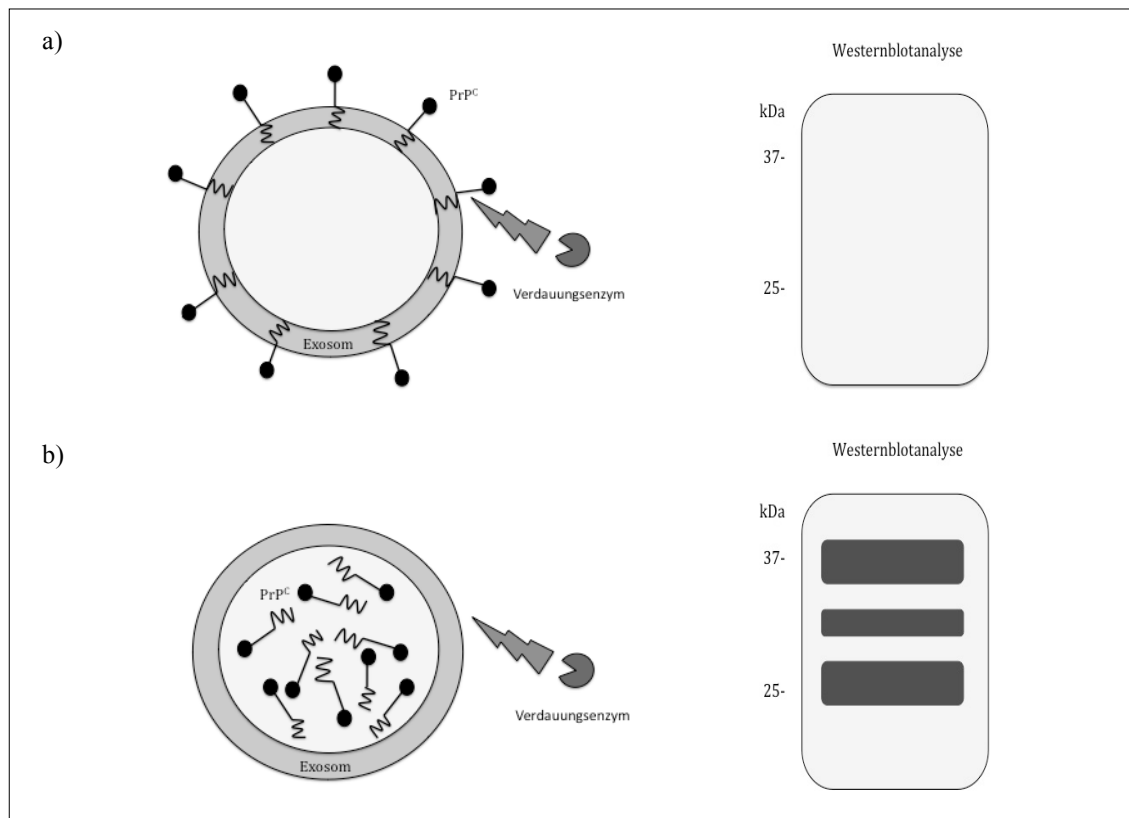
Des Weiteren war auffällig, dass es Unterschiede im PrP^C-Bandenmuster der einzelnen Präparationen gab (vgl. Abb. 15). Ursächlich könnte eine Abweichung im Glykosylierungsmuster, verursacht durch die RV-Infektion, sein. Allerdings wurde dieser Beobachtung im Rahmen unserer Arbeit nicht weiter nachgegangen.

5.2.3 Etablierung einer Methode zur Lokalisationsbestimmung von exosomalem PrP^C

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die exosomale Variante von PrP^C, wie die zelluläre Form, noch einen GPI enthält, sollte untersucht werden, ob sie ebenfalls auf der Membranoberfläche lokalisiert ist oder im Inneren des Exosoms transportiert wird.

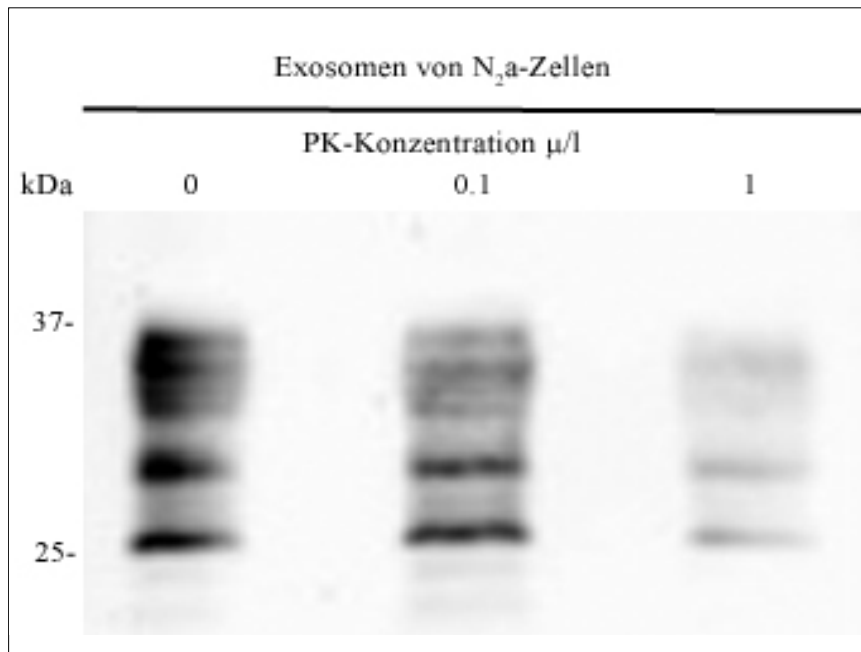
Zur exosomalen Lokalisationsbestimmung von PrP^C, wurde eine Methode entwickelt, bei der die membranständigen Proteine durch Enzyme verdaut wurden, ohne die Membran zu beschädigen. Nach Anwendung dieser Methode, sollten alle membranständigen Proteine entfernt und alle Proteine im Vesikelinneren noch nachweisbar sein.

Zur Überprüfung der Ergebnisse wurden die Proben anschließend mit Hilfe des Westernblots untersucht. Mit POM2, einem PrP^C spezifischen Antikörper, wurde das Vorhandensein von PrP^C überprüft und mit einem für Aktin spezifischen Antikörper wurde die membranöse Unversehrtheit kontrolliert. Aktin ist ein Strukturprotein des Zytoskeletts eukaryotischer Zellen und ist daher ein guter Marker für die Intaktheit der Exosomenmembran. Für die Exosomenisolation wurde Zellüberstand von N₂a-Zellen gewählt. Sie produzieren besonders viel PrP^C, sind neuronalen Ursprungs und daher für die Bedeutung des Prionproteins bei neurodegenerativen Erkrankungen von besonderem Interesse.

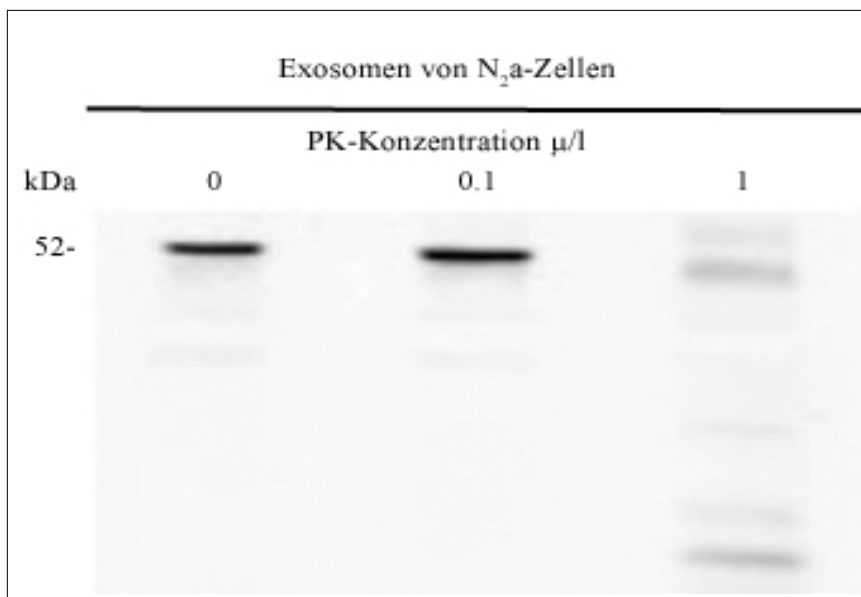
Abbildung 13 | Modell zur Lokalisationsbestimmung von exosomalem PrP^C durch Enzymverdau

Das Schema zeigt die möglichen Lokalisationen von PrP^C und die daraus resultierende Präsentation auf dem Westernblot nach Behandlung mit einem Verdauungsenzym. a) Wenn PrP^C auf der Oberfläche von Exosomen lokalisiert ist, wird es durch die Enzymbehandlung vollständig verdaut; keine Proteinbanden von PrP^C wären auf dem Westernblot nachweisbar. b) Wenn PrP^C im Innern des Exosoms lokalisiert ist, wird es vom Enzym nicht abgebaut und ist via Westernblot detektierbar. Voraussetzung ist die Membranintaktheit, die durch Aktin kontrolliert wird.

Zur Etablierung der vorgestellten Methode wurde beim ersten Versuch Proteinase K (PK), eine wenig spezifische, hochaktive Proteinase, verwendet. Drei Exosomenpellets gleicher Menge wurden mit 20 µl unterschiedlicher Proteinase K Konzentration (0 µl/l; 0,1 µl/l; 1 µl/l gelöst in PBS) resuspendiert und 10 min bei 37°C inkubiert. Um den Verdau zu stoppen wurden die Proben mit 3 µl CVL 10 min bei 95°C aufgeköcht. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Westernblots.

Abbildung 14 | Unvollständiger PK-Verdau von PrP^C

Der Westernblot zeigt Exosomenpräparation von N₂a-Zellen, mit unterschiedlichen PK-Konzentrationen behandelt und mit dem Antikörper POM2 detektiert. Deutlich ist zu sehen, wie die Zunahme der PK-Konzentration mit einer Abnahme der PrP^C-Proteinbanden einhergeht.

Abbildung 15 | Partieller PK-Verdau von Aktin

Westernblot mit Exosomenpräparation von N₂a-Zellen, unterschiedlich lange mit PK behandelt und mit dem Antikörper gegen Aktin detektiert. Deutlich ist das Auftreten von Aktin-Proteinfragmenten bei einer PK-Konzentration von 1 µl/l zu erkennen.

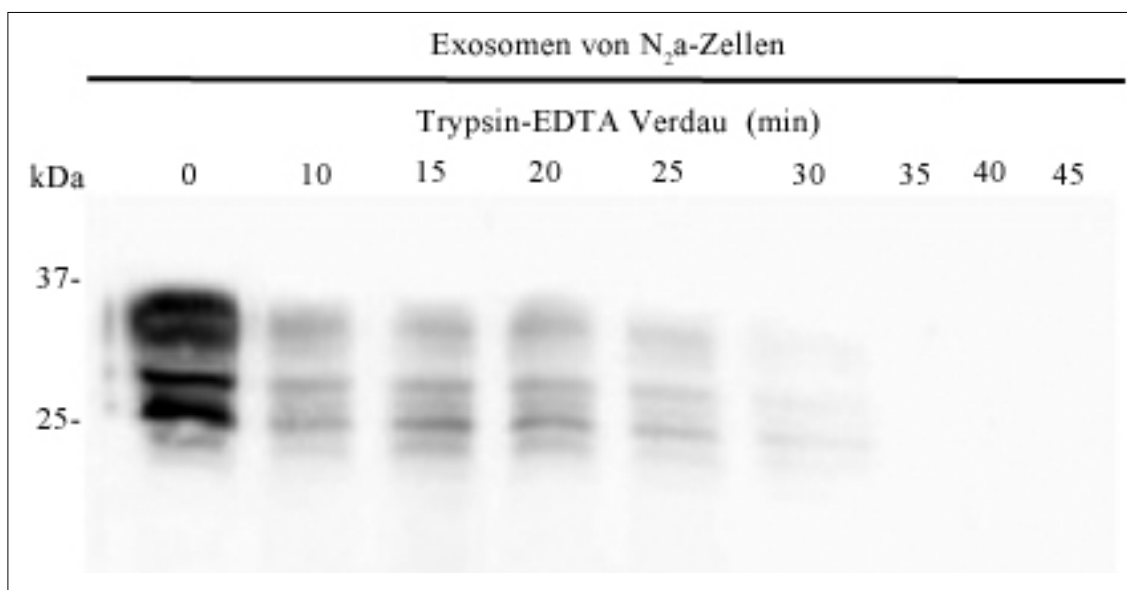
Bei der Detektion mit POM2 konnte der enzymatische Abbau von PrP^C durch Abnahme der Farbintensität der PrP^C-Banden vom 0,1 µl/l PK-Verdau zum 1 µl/l PK-Verdau beobachtet werden, allerdings zeigte die Aktinbande ebenfalls einen Abbau vom 0,1 µl/l PK-Verdau zum 1 µl/l PK-Verdau und zusätzlich beim 1 µl/l PK-Verdau ein fragmentiertes Bandenmuster. Letzteres lässt auf eine partielle Zerstörung der Membran und Teile der intraexosomalen Proteine schließen, womit sich PK als ungeeignet für diesen Versuch erwies.

Im zweiten Versuch wurde Trypsin, eine mildere Protease, verwendet. Zur Bestimmung der optimalen Wirkkonzentration wurde 10x Trypsin-EDTA 1:1 mit PBS verdünnt und jeweils unterschiedlich lange (0min; 10min; 30min) mit drei Exosomenpellets inkubiert. Beim anschließenden Westernblot waren bei allen drei Proben weder PrP^C noch Aktin detektierbar. Ursache war die zu hohe Trypsinkonzentration, bei der innerhalb von 10min sowohl PrP^C als auch Aktin komplett verdaut waren.

Deshalb wurde beim nächsten Versuch das geringer konzentrierte 1x Trypsin-EDTA, 1:1 mit PBS verdünnt, verwendet. Es wurde mit gleichkonzentrierten Exosomenpellets inkubiert und die Reaktion in 5min Abständen von 0min bis 45min gestoppt.

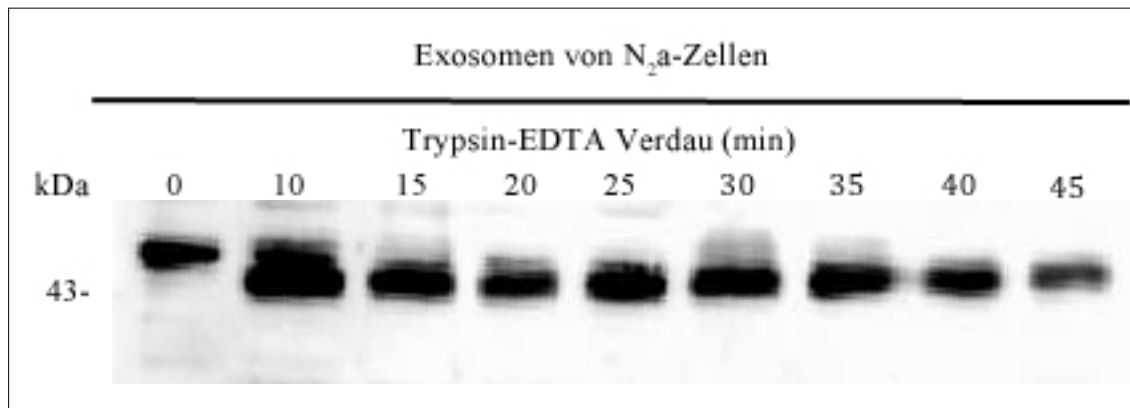
5.2.4 Exosomales PrP^C ist größtenteils oder ausschließlich auf der Membranaußenseite lokalisiert

Abbildung 16 | Vollständiger Verdau von PrP^C mit 1x Trypsin-EDTA nach 35min



Westernblot mit Exosomenpräparation von N₂a-Zellen, unterschiedlich lang mit 1x Trypsin-EDTA behandelt und mit dem Antikörper POM2 detektiert. Deutlich ist die Abschwächung der PrP^C-Proteinbanden zu sehen. Nach 35 min ist keine Bande mehr detektierbar.

Beim Westernblot wurde ein regelmäßiger Abbau der PrP^C-Banden von 0min bis 30min Inkubation mit 1x Trypsin-EDTA beobachtet bis bei 35min keine PrP^C-Bande mehr nachweisbar war. Die Kontrolle des Aktingehalts in denselben Proben auf demselben Westernblot ergab intakte, relativ gleiche Aktinbande. Dies bedeutete, dass trotz fehlendem PrP^C-Nachweis ab 35min die Exosomenmembran noch intakt war.

Abbildung 17 | Intakte Aktinbanden bei Verdau mit 1x Trypsin-EDTA

Westernblot mit Exosomenpräparation von N₂a-Zellen, unterschiedlich lang mit 1x Trypsin-EDTA behandelt und mit einem Antikörper gegen Aktin detektiert. Die Banden sind alle etwa gleich stark. Im Gegensatz zum PK-Verdau gibt es bei dem Verdau mit 1x Trypsin-EDTA keine Fragmentierung der Aktinbanden, was für die bestehende Intaktheit der Vesikelmembran spricht.

Durch diese Ergebnisse konnte hier gezeigt werden, dass das exosomale PrP^C ausschließlich bzw. zum größten Teil, wie das zelluläre Korrelat, durch einen GPI-Anker auf der Membranaußenseite verankert ist.

5.2.5 Nachweis von Prionerkrankung relevanter Proteinase ADAM10 auf Exosomen

Das exosomale PrP^C gleicht durch seine GPI-Verankerung und durch die Lokalisation auf der Membranoberfläche in seinen Eigenschaften dem zellulären PrP^C. Auf Grund dieser Gemeinsamkeiten stellt sich die Frage, ob es auch ähnlich prozessiert wird. Von dem auf der Zelle lokalisierten PrP^C ist bekannt, dass es mit teilweise noch unbekannten Proteasen interagiert und durch sie prozessiert wird. Eine wichtige Rolle spielt dabei die Metalloproteinase ADAM10. Sie schneidet PrP^C N-terminal des GPI-Ankers und entlässt es in den Extrazellulärraum.

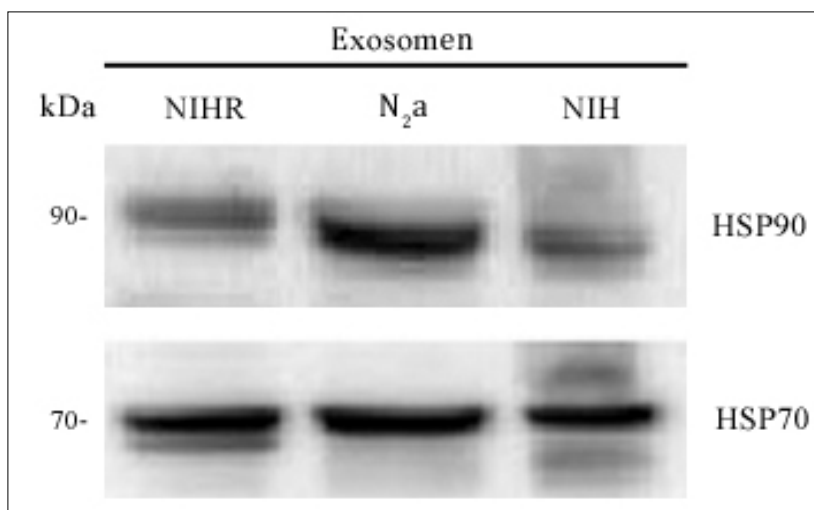
Die Proteinkomposition von Exosomen wurde fast ausschließlich an Exosomen immunologischer Zellen untersucht, über die Zusammensetzung neuronaler Exosomen ist dagegen kaum etwas bekannt.

Aus diesem Grund haben wir Exosomen neuronaler Zelllinien auf Proteine untersucht, welche als mögliche Interaktionspartner von PrP^C in Frage kommen. Der Fokus lag dabei auf Proteinen,

die bereits als Interaktionspartner von PrP^C identifiziert wurden bzw. relevant für die Prionerkrankung sind.

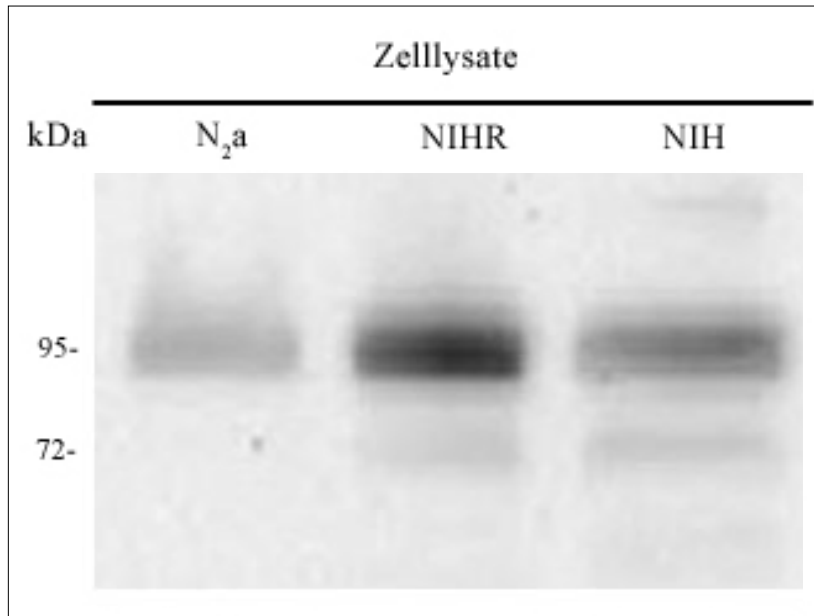
Als Zelllinien für die Exosomenpräparation wurden die neuronalen N₂a-Zellen und NIH-Zellen (+/- Retrovirus) als Vergleich genommen. Aus beiden Zelllinien wurden Exosomen isoliert und via Westernblot mit Hilfe von unterschiedlichen Antikörpern auf verschiedene Proteine untersucht. Es wurde unter anderem HSP90 und HSP70 gefunden. Bei Letzterem wurde bereits an THP-1 Monozyten gezeigt, dass es während der Verpackung in Exosomen an PrP^C bindet und eine potenzielle Rolle bei der Freisetzung von PrP^C via Exosomen spielt ⁵⁸.

Abbildung 18 | Nachweis von HSP70 und HSP90 in Exosomen neuronaler Zellen

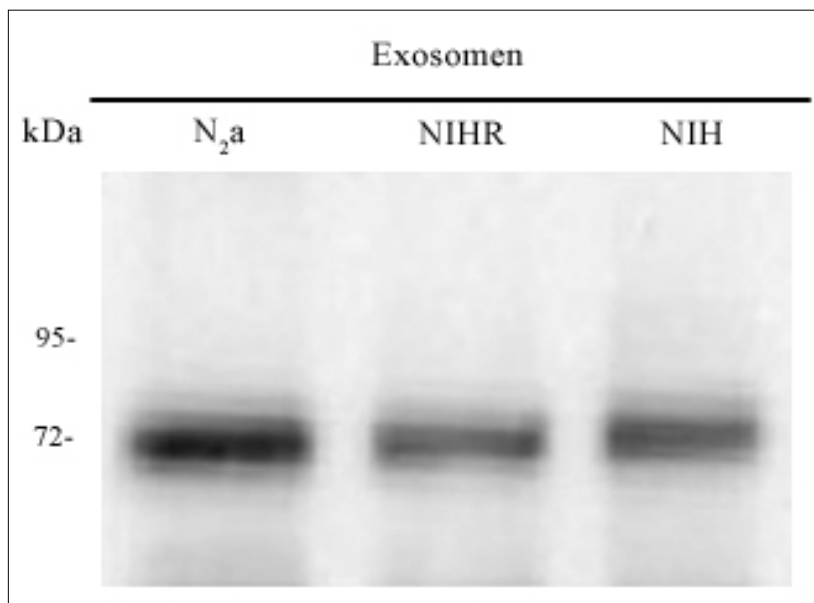


Die Abbildung zeigt einen Westernblot mit Exosomenpräparationen von NIHR-, NIH- und N₂a-Zellen; detektiert wurde mit einem HSP90- bzw. HSP70- Antikörper. In allen drei Proben konnte HSP70 sowie HSP90 nachgewiesen werden.

Besonderes Interesse bei der Suche nach möglichen Interaktionspartnern für PrP^C galt ADAM10. ADAM10 ist eine membrangebundene Metalloproteinase, die auf der Zelloberfläche Ektodomänen von Transmembranproteinen schneidet (u.a. auch PrP^C) und relevant für die PrP^C-Homöostase ist^{59,60,14}. Da bereits bekannt war, dass ADAM10 mit PrP^C interagiert, sollte untersucht werden, ob ADAM10 auch auf Exosomen eine Rolle für die Prozessierung von PrP^C spielen könnte. Es wurde via Westernblot das Vorkommen von ADAM10 auf Exosomen untersucht. Dabei wurde ein Antikörper verwendet, der sowohl katalytisch aktives ADAM10 (mature; 72kDa) als auch die inaktive Vorstufe von ADAM10 (immature; 95kDa) erkennt.

Abbildung 19 | Vergleich von ADAM10 in Zelllysaten und Exosomenpräparationen**a) Ein großer Anteil von ADAM10 in Zelllysaten ist inaktiv**

Die Abbildung zeigt einen Westernblot mit Zelllysaten von NIH-, NIHR- und N₂a-Zellen. Detektiert wurde mit einem Antikörper gegen ADAM10. Deutlich nachweisbar ist bei allen drei Proben die inaktive Form von ADAM10 (95kDa). Die aktive Form (72kDa) wurden dagegen nur in geringen Mengen detektiert.

b) Exosomen enthalten ausschließlich die aktive Form von ADAM10

Die Abbildung zeigt einen Westernblot mit Exosomenpräparationen von NIH-, NIHR- und N₂a-Zellen. Detektiert wurde mit einem Antikörper gegen ADAM10. Unabhängig von der verwendeten Zelllinie, wurde ausschließlich die aktive Form von ADAM10 in den Exosomenproben nachgewiesen.

Tatsächlich konnten wir in allen Exosomenpräparationen der unterschiedlichen Zelllinien ADAM10 nachweisen. Interessanterweise haben wir in den Exosomen nur die aktive Form von ADAM10 gefunden, wohingegen in den Zelllysaten hauptsächlich die inaktive Form vorhanden war. Dieses Ergebnis führt zu der Vermutung, dass ADAM10 eine bestimmte, aktive Aufgabe in Bezug auf die Exosomen hat und möglicherweise mit exosomalem PrP^C interagiert.

6. Diskussion

TSEs sind letale, neurodegenerative Erkrankungen des zentralen Nervensystems. Sie führen zu Neuronenverlust, Astrozytose und zur spongiformen Degeneration des Gewebes. Neben zahlreichen Varianten bei Tieren wie Scrapie bei Schafen oder BSE bei Rindern treten sie als Kuru, Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS), Fatale Familiäre Insomnie (FFI) und Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) auch beim Menschen auf. In der Forschung sind TSEs ein wichtiges Modell für andere neurodegenerative Erkrankungen ^{2,3}.

Eine wichtige Rolle bei TSEs spielt das zelluläre Glykoprotein PrP^C. Es kann durch Umfaltung zum infektiösen Agens PrP^{Sc} konvertieren. Informationen über die Ausbreitung des PrP^{Sc} im Organismus sind essentiell für das Verständnis der Pathogenese von TSEs. Trotz intensiver Forschung sind die Transportwege auf zellulärer Ebene noch weitgehend unbekannt. Als ein möglicher Kofaktor wird die retrovirale Koinfektion diskutiert. Retroviren kommen pandemisch vor und stehen bereits im Verdacht, mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert zu sein, u.a. mit Sarkomen, Lymphomen, insulinabhängiger Diabetes ⁶¹ sowie primär biliärer Zirrhose ⁶². Leblanc konnte bereits *in vitro* nachweisen, dass eine MoMuLV-Infektion von prioninfizierten NIH-Zellen die Prioninfektivität verstärkt und das Virus als Transportvektor von PrP^{Sc} und PrP^C zwischen den Zellen fungiert. Er postulierte, dass Retroviren einen wichtigen Kofaktor bei der Ausbreitung des Prionproteins darstellen könnten ^{31,63}.

Um diese Hypothese zu überprüfen, hat unser Institut ein Modell für die Koinfektion von Mäusen mit Prionen und Retroviren (MoMuLV) etabliert und *in vivo* Experimente mit doppelinfizierten (Prion/MoMuLV) Mäusen durchgeführt. Dr. Susanne Krasemann⁴⁹ fand heraus, dass zu frühen Zeitpunkten (Tag 60 post Prioninfektion) eine zusätzliche Retrovirusinfektion zu einem deutlichen Anstieg der PrP^{Sc}-Menge in der Milz führt. Des Weiteren fanden wir heraus, dass ebenfalls zu frühen Zeitpunkten (Tag 30 post Prioninfektion) die Menge von FDCs, welche eine wichtige Rolle bei der Vervielfältigung von PrP^{Sc} spielen, in der Milz doppelinfizierter Tiere deutlich erhöht ist, wohingegen sie zu späteren Zeitpunkten wieder auf Kontrollniveau absinkt.

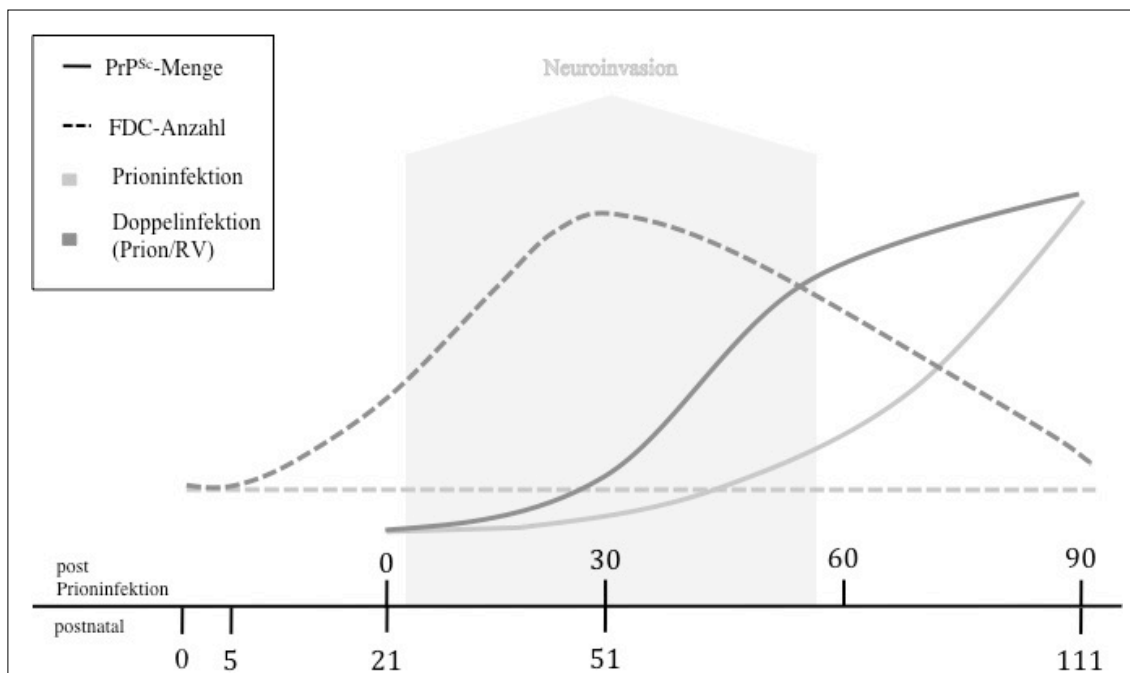
Geht man von der Proteinhypothese nach Prusiner aus, die besagt, dass das infektiöse Agens „das Prion“ aus PrP^{Sc} besteht und keine Nukleinsäuren enthält ²¹, ist die entstehende Menge an PrP^{Sc} vor allem vom Substrat (PrP^C) abhängig. Durch die Retrovirusinfektion werden viele FDCs rekrutiert, die große Mengen an PrP^C exprimieren ²⁸, das, in PrP^{Sc} transformiert, zu einem

deutlichen Anstieg der PrP^{Sc}-Menge führt. Der anschließende Abfall der FDC-Aktivität und der PrP^{Sc}-Menge lässt sich durch das Muster chronisch persistierender Viren erklären. Nachdem die Viren in den Organismus eingedrungen sind, beginnt die akute Infektion auf die der Organismus mit einer gesteigerten Aktivierung und mit akuten körperlichen Symptomen reagiert. Sie kann anschließend in eine chronische Infektion mit leicht gesteigerter Immunaktivität, v.a. bedingt durch T-Lymphozyten übergehen (z.B. HIV, Herpes, Hepatitis C) ⁶⁴. Die erneute Abnahme der FDC-Anzahl, zu späteren Zeitpunkten bei den doppelinfizierten Tieren, führte zu einer vergleichbaren PrP^{Sc}-Menge wie die Kontrollgruppe. Somit ist das Auftreten der vermehrten FDC-Aktivität und der Anstieg der PrP^{Sc}-Menge in der Milz eher als temporäres Ereignis im Krankheitsverlauf der Doppelinfektion zu betrachten.

Überraschenderweise blieb, trotz partiell erhöhtem PrP^{Sc}-Vorkommen in der Milz, einer wichtigen Zwischenstation auf dem Weg zu Neuroinvasion, die Inkubationszeit bis zum Auftreten erster Krankheitssymptome unverändert ⁴⁹. Obwohl bekannt ist, dass die Prionreplikation in den FDCs maßgeblich an der Neuroinvasion beteiligt ist, da letztere bei Abwesenheit von FDCs verzögert ist ^{24-27,54}. Dieses Ergebnis passt zu einer aktuellen Studie über doppelinfizierte (Prion/Visna-Maedi-Virus) Schafe. Dort hatte eine Viruskoinfektion scheinbar auch keinen Einfluss auf die Inkubationszeit der scrapieinfizierten Versuchsgruppe ⁶³. Ein Erklärungsansatz liegt im zeitlichen Ablauf der Ausbreitung von PrP^{Sc}. Nach Aufnahme des infektiösen Agens über die Peripherie beginnt die initiale Phase mit einem steilen Anstieg der Prionreplikation im lymphoretikulären Gewebe (v.a. in der Milz und in den Lymphknoten), die um Tag 60 post Prioninfektion abflacht und in einem Plateau mündet, welches über den ganzen Krankheitsverlauf persistiert ⁵⁵. Zur Zeit geht man davon aus, dass die Neuroinvasion von der Milz in das ZNS an Tag 60 post Prioninfektion bereits stattgefunden hat. Von diesem Zeitpunkt an breitet sich PrP^{Sc} im ZNS aus. Unsere Daten wurden an Tag 60 post Prioninfektion erhoben und liegen damit vermutlich außerhalb des Zeitfensters, in dem die Milz relevant für die Pathogenese der Prionerkrankung ist (s. Abbildung 20).

Ein weiterer Erklärungsansatz besteht darin, dass zwar ein Fehlen von FDCs zu einer längeren Inkubationszeit führt ^{24-27,54}, es jedoch Hinweise gibt, dass eine gesteigerte Anzahl von FDCs keinen Einfluss auf die Inkubationszeit hat, da bereits eine Sättigung eingetreten ist. Somit wäre der MoMuLV-Einfluss auf die FDC-Rekrutierung und die PrP^{Sc}-Menge irrelevant für die Länge der Inkubationszeit einer Prionerkrankung.

Abbildung 20 | Erklärungsmodell des möglichen Verlaufs der PrP^{Sc}-Menge und FDC-Anzahl in der Milz bei Infektion mit Retroviren und Prionen



Das Modell zeigt den möglichen Verlauf der PrP^{Sc}-Menge und der FDC-Anzahl bei einer einfachen Prioninfektion und einer Koinfektion (Prion/RV) über die Zeit. Die FDC-Anzahl steigt zu Beginn der Koinfektion, getriggert durch das RV, an, hat bei Tag 30 post Prioninfektion ihr Maximum erreicht und nähert sich anschließend wieder dem Kontrollniveau. Wohingegen die FDC-Anzahl bei der einfachen Prioninfektion die ganze Zeit konstant bleibt. Die PrP^{Sc}-Menge bei der Doppelinfektion steigt in der Initialphase steil an, flacht dann um Tag 60 ab und mündet schließlich in einem Plateau. Die PrP^{Sc}-Menge der einfachen Prioninfektion steigt dagegen wesentlich langsamer an, endet aber letztendlich auf gleicher Höhe. Es wird vermutet, dass die Neuroinvasion bis Tag 60 post Prioninfektion bereits stattgefunden hat.

Neben dem zeitlichen Muster ist auch der Zelltropismus des MoMuLV *in vivo* von entscheidender Bedeutung für die unveränderte Inkubationszeit im Tiermodell. In Zellkultur infizieren Retroviren Zellen verschiedenen Ursprungs wie z.B. NIH-Zellen oder Mikroglia^{31,65}, weshalb eine Koinfektion (Prion/Retrovirus) eines Zelltyps *in vitro* möglich ist. Es resultiert eine erhöhte Prioninfektivität und ein vermehrter PrP^{Sc}-Transport via RV-Partikel in den Extrazellulärraum. *In vivo* sind die Zielzellen des MoMuLVs jedoch hauptsächlich Zellen des hämatopoetischen Systems (v.a. T-Zellen).

Im lymphoretikulären System hätte es auf Grund des Lymphtropismus von PrP^{Sc} und MoMuLV zur Koinfektion eines Zelltyps kommen können, jedoch ist die erhöhte Menge an PrP^{Sc} in der Milz vermutlich auf eine Vermehrung der FDCs zurückzuführen. FDCs sind vermutlich stromalen Ursprungs⁶⁶⁻⁶⁸ und entsprechen damit nicht dem hämatopoetischen

Zelltropismus des MoMuLVs *in vivo*. Daraus resultiert, dass die Steigerung der PrP^{Sc}-Menge wahrscheinlich auf einer indirekten Aktivierung von FDCs durch das Retrovirus beruht und nicht ursächlich aus einer direkten Retrovirusinfektion der FDCs entstanden ist. Damit ist für unseren Versuch die Hypothese, dass Retroviren als Transportsysteme für PrP^{Sc} dienen könnten, nicht zutreffend, da die Grundvoraussetzung der Doppelinfektion eines Zelltyps nicht gegeben ist.

Das Ergebnis der Doppelinfektion im Tiermodell ist, dass eine FDC-Aktivierung, hervorgerufen durch Retroviren, zu einer deutlichen Erhöhung der PrP^{Sc}-Menge in der Milz führt, dieser Effekt jedoch keine Auswirkung auf die Inkubationszeit der Prionerkrankung hat. Ein weiterführendes Experiment zur Interaktion von Prionprotein und Retrovirus wäre die Untersuchung von Fehlregulationen bei HIV-assoziierten, neurokognitiven Störungen (HIV-associated neurocognitive disorders: HAND)⁶⁹ von HIV- und AIDS-Patienten, mit dem Fokus auf der gegenseitigen Beeinflussung von Prionprotein und HI-Virus⁷⁰.

Neben Retroviren werden auch Exosomen als mögliche Transportsysteme für PrP^C/PrP^{Sc} diskutiert⁷¹. Exosomen sind kleine Vesikel, deren Funktion u.a. die interzelluläre Kommunikation durch Transfer von Proteinen und Lipiden ist. Es ist bereits bekannt, dass sie mit PrP^C und PrP^{Sc} assoziiert sind⁷¹. In diesem Zusammenhang wollten wir PrP^C auf Exosomen näher charakterisieren. Es unterscheidet sich lediglich durch seine Konformation von der pathologischen Form PrP^{Sc}, sodass sie vermutlich die gleichen Transportsysteme nutzen. Wir haben herausgefunden, dass exosomales PrP^C hauptsächlich oder ausschließlich auf der Membranoberfläche der Exosomen vorkommt. Dort ist es durch einen GPI-Anker befestigt und weist somit vergleichbare Eigenschaften wie das zelluläre PrP^C auf. Dies bedeutet, dass es möglicherweise auch, ähnlich wie das zelluläre Korrelat, prozessiert wird.

Es ist bekannt, dass das zelluläre Prionprotein durch Interaktion mit verschiedenen, teilweise noch unbekannten Proteasen prozessiert und in den Extrazellulärraum entlassen wird. Eine wichtige Rolle dabei spielt die Zink-Metalloproteinase ADAM10, welche für die Freisetzung einer geschnittenen PrP^C-Variante ohne GPI-Anker in den Extrazellulärraum mitverantwortlich ist¹⁴.

Da zwar die exosomale Proteinkomposition von Zellen des Immunsystems wie dendritische Zellen oder B-Zellen gut beschrieben ist, es aber kaum Daten über die Zusammensetzung neuronaler Exosomen gibt, haben wir Proteine neuronaler Zelllinien ausgewählt und untersucht. Dabei haben wir uns auf Prionerkrankung relevante Proteine konzentriert, die als

Interaktionspartner von PrP^C diskutiert werden. Wir konnten u.a. HSP70 und HSP90, beides Hitzeschockproteine, in neuronalen Exosomen nachweisen. HSP70 und HSP90 kommen auch in Exosomen immunologischer Zellen vor, dort interagiert HSP70 bekannterweise mit PrP^C ⁵⁸. Des Weiteren konnten wir auch ADAM10 nachweisen. Interessanterweise haben wir nur die katalytisch aktive Form von ADAM10 in den Exosomen gefunden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Proteinase eine bestimmte Funktion innerhalb des Exosoms hat und möglicherweise dort aktiv andere Proteine schneidet und freisetzt.

Weiterführende Experimente wären die Überprüfung einer möglichen Interaktion von PrP^C und ADAM10 auf Exosomen. Durch eine Koimmunopräzipitation könnte das Bindungsverhalten beider Proteine zueinander untersucht werden. Mit Immuno-Elektronenmikroskopie könnte die Lage der Proteine zueinander bestimmt werden. Eine Kolo-kalisation würde gemeinsam mit einem positiven Bindungsverhalten für eine Interaktion von ADAM10 und PrP^C sprechen.

Exkurs: Neben der Prionforschung ist die Entdeckung von katalytisch aktivem ADAM10 in Exosomen auch für andere Gebiete interessant, wie zum Beispiel in der Alzheimerforschung, speziell im Bezug auf das Amyloid-Precursor-Protein (APP). APP kann auf unterschiedliche Weise prozessiert werden. Wird APP durch eine β - und γ -Sekretase geschnitten, entsteht das neurotoxische β -Amyloid. Es stellt den Hauptbestandteil der Plaques im Gehirn von Alzheimer Patienten dar ^{72,73}. Die Überproduktion und Aggregation von diesem β -Amyloid scheint die Hauptursache für die Entstehung von Alzheimer zu sein. Alternativ kann APP auch durch α -Sekretasen zu sAPP α prozessiert werden. Es wird postuliert, dass sAPP α eine neuroprotektive Wirkung besitzt, da es u.a. eine wichtige Rolle bei neuronaler Plastizität und neuronalem Überleben spielt, eine protektive Wirkung gegen Excitotoxizität hat ⁷⁴ sowie die neuronale Stammzellproliferation reguliert ⁷⁵ und außerdem wichtig für die frühe Entwicklung des ZNS ist ⁷⁶. Bei der Prozessierung von APP zu sAPP α scheint ADAM10 die wichtigste α -Sekretase zu sein, da z.B. bei ADAM10-Knock-out-Mäusen die Menge an sAPP α erheblich reduziert war ⁷⁷.

Denkbar ist ein Einfluss der exosomalen Transportrate von ADAM10 auf die Prozessierung von APP. Durch vermehrte Freisetzung von Exosomen, beladen mit ADAM10, könnte die Menge des prozessierten APPs α lokal begrenzt reguliert und damit die neuroprotektive Wirkung verstärkt werden...

7. Zusammenfassung

Prionerkrankungen sind neurodegenerative Erkrankungen mit letalem Krankheitsverlauf. Trotz intensiver Forschung ist bis heute der Ausbreitungsweg des infektiösen Agens im Organismus noch nicht im Detail geklärt. Da sich das krankheitsverursachende PrP^{Sc} lediglich in seiner Konformation von der physiologischen Form PrP^C unterscheidet, benutzen beide Proteinisoformen möglicherweise die gleichen Transportwege. Zur Zeit werden u.a. Exosomen und Retroviren als Transportsysteme diskutiert. Die Fragestellung dieser Arbeit lautete erstens, welche Auswirkung hat eine retrovirale Superinfektion auf prioninfizierte sekundär lymphatische Organe und zweitens, wie ist der Proteinbesatz von neuronalen Exosomen bezüglich Prionerkrankung relevanter Proteine.

Dazu wurden *in vivo* Experimente mit Milzen prion- und retroviralinfizierter (Prion/MoMuLV) Mäuse durchgeführt, die anschließend histologisch untersucht wurden, um die Auswirkung der Koinfektion auf die Milz beurteilen zu können. Außerdem wurden *in vitro* Experimente mit Exosomenpräparationen durchgeführt, um mehr über Prionerkrankung relevante Proteine auf neuronalen Exosomen herauszufinden.

Es ist bekannt, dass *in vitro* Retroviruskoinfektionen in prioninfizierten Zellen zu einer deutlich gesteigerten PrP^{Sc}-Freisetzung in den Extrazellulärraum führen. Daraufhin wurden Retroviruspartikel als mögliche Kofaktoren bei der Ausbreitung von PrP^{Sc} postuliert. Diese Hypothese konnten wir in unseren Versuchen nicht bestätigen. Es kam zwar zu frühen Zeitpunkten der Doppelinfektion zu einer vermehrten PrP^{Sc}-Menge in der Milz, die Inkubationszeit der Krankheit und damit vermutlich auch die Transportkinetik von PrP^{Sc} blieb jedoch unverändert.

Wir vermuten, dass der Einfluss von Retroviren auf die Prionerkrankung nur indirekt ist. Da die Inkubationszeit gleich bleibt, sind retrovirale Partikel nicht wesentlich am Transport von Prionen beteiligt. Andererseits wird die Vermehrung von Prionen durch retroviralinfizierte Immunaktivierung im lymphatischen System gefördert.

Des Weiteren fanden wir heraus, dass das exosomale PrP^C ähnliche Eigenschaften wie das zelluläre Korrelat PrP^C aufweist: Es ist mit einem GPI-Anker assoziiert und hauptsächlich oder ausschließlich auf der Membranoberfläche von Exosomen befestigt. Außerdem fanden wir heraus, dass die Metalloproteinase ADAM10 in Exosomen verpackt wird. Interessanterweise wurde in Exosomen ausschließlich die katalytisch aktive Form von ADAM10 nachgewiesen. Folglich wird ADAM10 sowie auch PrP^C funktionsfähig in die exosomale Membran verpackt, womit sie anscheinend eine aktive Funktion innerhalb dieses Kompartiments innehaben und möglicherweise interagieren.

8. Literaturverzeichnis

1. Geissen M, Krasemann S, Matschke J, Glatzel M (2007): Understanding the natural variability of prion diseases. *Vaccine* **25**, 5631–5636.
2. Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Lührs T, Aguzzi A (2005): Human prion diseases: molecular and clinical aspects. *Arch. Neurol.* **62**, 545–552.
3. Aguzzi A & Calella AM (2009): Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol. Rev.* **89**, 1105–1152.
4. Mabbott NA, MacPherson GG (2006): Prions and their lethal journey to the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 201–211.
5. Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF (1996): Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of “new variant” CJD. *Nature* **383**, 685–690.
6. Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H (1999): Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann. Neurol.* **46**, 224–233.
7. Mead S, Stumpf MP, Whitfield J, Beck JA, Poulter M, Campbell T, Uphill JB, Goldstein D, Alpers M, Fisher EM, Collinge J (2003): Balancing selection at the prion protein gene consistent with prehistoric kurulike epidemics. *Science* **300**, 640–643.
8. Belay ED (1999): Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 283–314.
9. Imran M, Mahmood S (2011): An overview of human prion diseases. *Viol. J.* **8**, 559.
10. Prusiner SB (1998): Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 13363–13383.
11. Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM (1985): Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**, 331–333.
12. Oesch B, Westaway D, Wälchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE (1985): A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**, 735–746.
13. Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB (1987): Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**, 229–240.
14. Altmepfen HC, Prox J, Puig B, Kluth MA, Bernreuther C, Thurm D, Jorissen E, Petrowitz B, Bartsch U, De Strooper B, Saftig P, Glatzel M (2011): Lack of a-disintegrin- and-metalloproteinase ADAM10 leads to intracellular accumulation and loss of shedding of the cellular prion protein in vivo. *Mol Neurodegener* **6**, 36.

15. Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, Dearmond SJ (1986): Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* **5**, 315–324.
16. Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L (1991): Genomic structure of the human prion protein gene. *Am. J. Hum. Genet.* **49**, 320–329.
17. Aguzzi A, Baumann F, Bremer J (2008): The prion's elusive reason for being. *Annu. Rev. Neurosci.* **31**, 439–477.
18. Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992): Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577–582.
19. Caughey BW, Dong A, Bhat KS, Ernst D, Hayes SF, Caughey WS (1991): Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* **30**, 7672–7680.
20. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE (1993): Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 10962–10966.
21. Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982): Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**, 1309–1311.
22. Kocisko DA, Come JH, Priola SA, Chesebro B, Raymond GJ, Lansbury PT, Caughey B (1994): Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**, 471–474.
23. Jeffrey M, McGovern G, Martin S, Goodsir CM, Brown KL (2000): Cellular and sub-cellular localisation of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep. *Arch. Virol. Suppl.* 23–38.
24. Mabbott NA, Mackay F, Minns F, Bruce ME (2000): Temporary inactivation of follicular dendritic cells delays neuroinvasion of scrapie. *Nat. Med.* **6**, 719–720.
25. Montrasio F, Frigg R, Glatzel M, Klein MA, Mackay F, Aguzzi A, Weissmann C (2000): Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* **288**, 1257–1259.
26. Mabbott NA, Young J, McConnell I, Bruce ME (2003): Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *J. Virol.* **77**, 6845–6854.
27. Mohan J, Bruce ME, Mabbott NA (2005): Neuroinvasion by scrapie following inoculation via the skin is independent of migratory Langerhans cells. *J. Virol.* **79**, 1888–1897.

28. Brown KL, Stewart K, Ritchie DL, Mabbott NA, Williams A, Fraser H, Morrison WI, Bruce ME (1999): Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat. Med.* **5**, 1308–1312.
29. Glatzel M, Heppner FL, Albers KM, Aguzzi A (2001): Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate limiting for prion neuroinvasion. *Neuron* **31**, 25–34.
30. McBride PA, Schulz-Schaeffer WJ, Donaldson M, Bruce M, Diringer H, Kretzschmar HA, Beekes M (2001): Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J. Virol.* **75**, 9320–9327.
31. Leblanc P, Alais S, Porto-Carreiro I, Lehmann S, Grassi J, Raposo G, Darlix JL (2006): Retrovirus infection strongly enhances scrapie infectivity release in cell culture. *EMBO J.* **25**, 2674–2685.
32. Théry C, Zitvogel L, Amigorena S (2002): Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579.
33. Pelchen-Matthews A, Raposo G, Marsh M (2004): Endosomes, exosomes and Trojan viruses. *Trends Microbiol.* **12**, 310–316.
34. Peters PJ, Geuze HJ, Van der Donk HA, Slot JW, Griffith JM, Stam NJ, Clevers HC, Borst J (1989): Molecules relevant for T cell-target cell interaction are present in cytolytic granules of human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* **19**, 1469–1475.
35. Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S (1998): Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat. Med.* **4**, 594–600.
36. Théry C, Regnault A, Garin J, Wolfers J, Zitvogel L, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S (1999): Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73. *J. Cell Biol.* **147**, 599–610.
37. Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S (2001): Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunol.* **166**, 7309–7318.
38. Pan BT, Johnstone RM (1983): Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33**, 967–978.
39. Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ (1996): B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J. Exp. Med.* **183**, 1161–1172.
40. Amigorena S (2000): Cancer immunotherapy using dendritic cell-derived exosomes. *Medicina (B Aires)* **60 Suppl 2**, 51–54.

41. Ramachandran S, Palanisamy V (2012): Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **3**, 286–293.
42. Raposo G, Moore M, Innes D, Leijendekker R, Leigh-Brown A, Benaroch P, Geuze H (2002): Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* **3**, 718–729.
43. Basyuk E, Galli T, Mougél M, Blanchard JM, Sitbon M, Bertrand E (2003): Retroviral genomic RNAs are transported to the plasma membrane by endosomal vesicles. *Dev. Cell* **5**, 161–174.
44. Pelchen-Matthews A, Kramer B, Marsh M (2003): Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J. Cell Biol.* **162**, 443–455.
45. Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-Soto LF, Ingmundson A, Horner SM, Cicchetti G, Allen PG, Pypaert M, Cunningham JM, Mothes W (2003): Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* **4**, 785–801.
46. Ott DE (1997): Cellular proteins in HIV virions. *Rev. Med. Virol.* **7**, 167–180.
47. Campbell SM, Crowe SM, Mak J (2001): Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J. Clin. Virol.* **22**, 217–227.
48. Will RG (2003): Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *Br. Med. Bull.* **66**, 255–265.
49. Krasemann S, Neumann M, Luepke JP, Grashorn J, Wurr S, Stocking C, Glatzel M (2012): Persistent retroviral infection with MoMuLV influences neuropathological signature and phenotype of prion disease. *Acta Neuropathol.* **124**, 111–126.
50. Glatzel M, Aguzzi A (2001): Sympathetic prions. *ScientificWorldJournal* **1**, 555–556.
51. Huang FP, Farquhar CF, Mabbott NA, Bruce ME, MacPherson GG (2002): Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J. Gen. Virol.* **83**, 267–271.
52. Prinz M, Heikenwalder M, Junt T, Schwarz P, Glatzel M, Heppner FL, Fu YX, Lipp M, Aguzzi A (2003): Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature* **425**, 957–962.
53. Polymenidou M, Moos R, Scott M, Sigurdson C, Shi YZ, Yajima B, Hafner-Bratkovic I, Jerala R, Hornemann S, Wuthrich K, Bellon A, Vey M, Garen G, James MN, Kav N, Aguzzi A (2008): The POM monoclonals: a comprehensive set of antibodies to non-overlapping prion protein epitopes. *PLoS ONE* **3**, e3872.
54. Brandner S, Klein MA, Frigg R, Pekarik V, Parizek P, Raeber A, Glatzel M, Schwarz P, Rülcke T, Weissmann C, Aguzzi A (2000): Neuroinvasion of prions: insights from mouse models. *Exp. Physiol.* **85**, 705–712.
55. Daude N (2004): Prion diseases and the spleen. *Viral Immunol.* **17**, 334–349.

56. Sakudo A, Onodera T, Ikuta K (2007): Prion protein gene-deficient cell lines: powerful tools for prion biology. *Microbiol. Immunol.* **51**, 1–13.
57. Janigro D (2006): The Cell Cycle in the Central Nervous System. Janigro D (Hrg) 1. Auflage, Humana Press, Totowa, New Jersey, 584.
58. Wang GH, Zhou XM, Bai Y, Yin XM, Yang LF, Zhao D (2011): Hsp70 binds to PrPC in the process of PrPC release via exosomes from THP-1 monocytes. *Cell Biol. Int.* **35**, 553–558.
59. Taylor DR, Parkin ET, Cocklin SL, Ault JR, Ashcroft AE, Turner AJ, Hooper NM (2009): Role of ADAMs in the ectodomain shedding and conformational conversion of the prion protein. *J. Biol. Chem.* **284**, 22590–22600.
60. Endres K, Mitteregger G, Kojro E, Kretzschmar H, Fahrenholz F (2009): Influence of ADAM10 on prion protein processing and scrapie infectiosity in vivo. *Neurobiol. Dis.* **36**, 233–241.
61. Benoist C, Mathis D (1997): Autoimmune diabetes. Retrovirus as trigger, precipitator or marker? *Nature* **388**, 833–834.
62. Poupon R, Poupon RE (2004): Retrovirus infection as a trigger for primary biliary cirrhosis? *Lancet* **363**, 260–261.
63. Salazar E, Monleón E, Bolea R, Acín C, Pérez M, Alvarez N, Leginagoikoa I, Juste R, Minguijón E, Reina R, Glaria I, Berriatua E, de Andrés D, Badiola JJ, Amorena B, Luján L (2010): Detection of PrPSc in lung and mammary gland is favored by the presence of Visna/maedi virus lesions in naturally coinfecting sheep. *Vet. Res.* **41**, 58.
64. Stock I (2011): [Infections with human immunodeficiency viruses. Part I: pathogens, epidemiology, and clinical presentation]. *Med Monatsschr Pharm* **34**, 190–198; quiz 199–200.
65. Stanton JB, Knowles DP, O'Rourke KI, Herrmann-Hoesing LM, Mathison BA, Baszler TV (2008): Small-ruminant lentivirus enhances PrPSc accumulation in cultured sheep microglial cells. *J. Virol.* **82**, 9839–9847.
66. Krautler NJ, Kana V, Kranich J, Tian Y, Perera D, Lemm D, Schwarz P, Armulik A, Browning JL, Tallquist M, Buch T, Oliveira-Martins JB, Zhu C, Hermann M, Wagner U, Brink R, Heikenwalder M, Aguzzi A (2012): Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors. *Cell* **150**, 194–206.
67. Bofill M, Akbar AN, Amlot PL (2000): Follicular dendritic cells share a membrane-bound protein with fibroblasts. *J. Pathol.* **191**, 217–226.
68. Lee IY, Choe J (2003): Human follicular dendritic cells and fibroblasts share the 3C8 antigen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **304**, 701–707.

69. Zhang Y, Qiao L, Ding W, Wei F, Zhao Q, Wang X, Shi Y, Li N, Smith D, Chen D (2012): An initial screening for HIV-associated neurocognitive disorders of HIV-1 infected patients in China. *J. Neurovirol.* **18**, 120–126.
70. Leblanc P, Baas D, Darlix J-L (2004): Analysis of the interactions between HIV-1 and the cellular prion protein in a human cell line. *J. Mol. Biol.* **337**, 1035–1051.
71. Fevrier B, Vilette D, Archer F, Loew D, Faigle W, Vidal M, Laude H, Raposo G (2004): Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 9683–9688.
72. Zhang Y, Thompson R, Zhang H, Xu H (2011): APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain* **4**, 3.
73. Postina R (2012): Activation of α -secretase cleavage. *J. Neurochem.* **120 Suppl 1**, 46–54.
74. Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP (1996): Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J. Neurochem.* **67**, 1882–1896.
75. Ohsawa I, Takamura C, Morimoto T, Ishiguro M, Kohsaka S (1999): Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur. J. Neurosci.* **11**, 1907–1913.
76. Caillé I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Müller U, Prochiantz A (2004): Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* **131**, 2173–2181.
77. Jorissen E, Prox J, Bernreuther C, Weber S, Schwanbeck R, Serneels L, Snellinx A, Craessaerts K, Thathiah A, Tesseur I, Bartsch U, Weskamp G, Blobel CP, Glatzel M, De Strooper B, Saftig P (2010): The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex. *J. Neurosci.* **30**, 4833–4844.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm ²	Quadratmikrometer
ADAM10	Disintegrin- und Metalloproteinase
AK	Antikörper
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APPsα	durch α-Sekretase prozessiertes APP
APS	Ammoniumperoxidsulfat
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
fCJD	familäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
iCJD	iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
vCJD	Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CVL	Beladungspuffer (Loading Puffer)
CWD	chronische Auszehrungskrankheit (Chronic Wasting Disease)
DAB	Diaminiobenzidine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
DRM	Cholesterin-reiche Mikrodomäne (Detergent-Resistant Microdomain)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ENV	Envelope Glykoprotein
ER	endoplasmatisches Retikulum
FDC	follikuläre dendritische Zellen
FFI	Fatale Familäre Insomnie
FBS	fetales Rinderserum (Fetal Bovine Sera)
g	Beschleunigung
g	Gramm
Gag	Gag-Polypeptid

GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
h	Stunde
HRP	Meerrettichperoxidase (Horse Radish Peroxidase)
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSP	Hitzeschockprotein
kDa	Kilo Dalton (= 1000 Da)
l	Liter
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MoMuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MVB	multivesikuläre Körper
NaPTA	Natrium-Phosphorwolframat (Natrium Phosphotungstic Acid)
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
pH	potentia Hydrogenii
PRNP Gen	Prionprotein-Gen
PrP ^C	zelluläres Prionprotein
PrP ^{Sc}	infektiöses Prionprotein
PVDF	Polyvinylidenfluorid-Membran
RML5.0	Scrapie-Stamm (Rocky Mountain Laboratory Passage 5.0)
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
rpm	Runde pro Minute (round per minute)
RV	Retrovirus
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBST	Tris gepufferte Salzlösung und Tween20 (Tris Buffered Saline + Tween20)
TEMED	N',N'-Tetramethylethylenediamine
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
V	Volt
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
ZNS	zentrales Nervensystem

9.2 Tabellen zur: semiquantitativen Bestimmung der FDC-Aktivierung

Tabelle 3 | Kontrollgruppe Tag 51 postnatal

Tag 51 Kontrollmilz A	Gefärbte Areale (μm^2)	Follikelfläche (μm^2)	Prozentualer Anteil der gefärbten Areale an der Follikelfläche (%)
	647,23	26052,49	2,48
	79,7	36320,98	0,22
	88,59	17696,43	0,50
	112,05	20334,73	0,55
	120,27	29976,25	0,40
Gesamtaktivierung			0,83

Tag 51 Kontrollmilz B	Gefärbte Areale (μm^2)	Follikelfläche (μm^2)	Prozentualer Anteil der gefärbten Areale an der Follikelfläche (%)
	25,79	17071,49	0,15
	476,10	38701,30	1,23
	160,59	31910,61	0,50
	87,86	29135,49	0,30
	22,32	18691,09	0,12
Gesamtaktivierung			0,32

Tag 51 Kontrollmilz C	Gefärbte Areale (μm^2)	Follikelfläche (μm^2)	Prozentualer Anteil der gefärbten Areale an der Follikelfläche (%)
	2099,73	101149,85	2,08
	898,69	52604,53	1,71
	295,33	100186,49	0,29
	1426,33	87365,58	1,63
	2538,65	104620,76	2,43
	246,74	94608,59	0,26
	231,24	108174,75	0,21
	1041,08	114037,86	0,91
	617,12	32022,62	1,93
	1400,05	134374,34	1,04
	107,19	29601,72	0,36
	1455,88	140303,00	1,04
Gesamtaktivierung			1,16

Tabelle 4 | Retrovirusinfizierte Gruppe Tag 51 postnatal

Tag 51 Retrovirusinfizierte Milz A	Gefärbte Areale (μm^2)	Follikelfläche (μm^2)	Prozentualer Anteil der gefärbten Areale an der Follikelfläche (%)
	4717,03	71570,36	6,59
	4464,81	65197,28	6,85
	1716,88	30898,66	5,56
	5147,41	69722,27	7,38
	4974,43	72004,86	6,91
Gesamtaktivierung			6,66

Tag 51 Retrovirusinfizierte Milz B	Gefärbte Areale (μm^2)	Follikelfläche (μm^2)	Prozentualer Anteil der gefärbten Areale an der Follikelfläche (%)
	5538,92	61844,44	8,96
	3326,06	52528,40	6,33
	11251,96	54864,48	20,51
	1245,05	21783,73	5,72
	5993,67	72263,99	8,29
Gesamtaktivierung			6,97

Tag 51 Retrovirusinfizierte Milz C	Gefärbte Areale (μm^2)	Follikelfläche (μm^2)	Prozentualer Anteil der gefärbten Areale an der Follikelfläche (%)
	9463,42	107822,46	8,78
	1304,25	79943,62	1,63
	5118,08	82748,33	6,19
	9708,55	85414,47	11,37
	5230,42	54677,97	9,57
	4851,58	267653,22	1,81
	3970,40	641653,80	0,62
	11751,65	79569,33	14,77
	5178,73	82733,52	6,26
	7284,32	109430,57	6,66
	10104,51	81539,08	12,39
	10959,84	82075,97	13,35
Gesamtaktivierung			7,78

Tabelle 5 | Kontrollgruppe Tag 111 postnatal

Tag 111 Kontrollmilz A	Gefärbte Areale (μm^2)	Follikelfläche (μm^2)	Prozentualer Anteil der gefärbten Areale an der Follikelfläche (%)
	392,88	34978,12	1,12
	3,01	23923,76	0,01
	92,95	22537,52	0,41
	70,71	22636,52	0,31
	18,96	13231,31	0,14
Gesamtaktivierung			0,40

Tag 111 Kontrollmilz B	Gefärbte Areale (μm^2)	Follikelfläche (μm^2)	Prozentualer Anteil der gefärbten Areale an der Follikelfläche (%)
	337,15	49662,74	0,68
	298,78	61884,00	0,48
	165,22	24371,60	0,68
	44,21	7943,24	0,56
	112,65	16794,74	0,67
Gesamtaktivierung			0,43

Tag 111 Kontrollmilz C	Gefärbte Areale (μm^2)	Follikelfläche (μm^2)	Prozentualer Anteil der gefärbten Areale an der Follikelfläche (%)
	1034,30	197827,47	0,52
	548,74	94650,66	0,58
	1521,01	207852,09	0,73
	184,71	78643,01	0,23
	3050,75	221643,01	1,38
	247,43	62180,70	0,40
	45,83	25986,04	0,18
	221,36	28621,33	0,77
	472,92	40608,77	1,16
	809,04	89081,54	0,91
	909,55	215752,72	0,42
	1246,81	242615,29	0,51
	639,37	110338,94	0,58
	1057,73	163932,37	0,65
	1803,13	136640,50	1,32
Gesamtaktivierung			0,69

Tabelle 6 | Retrovirusinfizierte Gruppe Tag 111 postnatal

Tag 111 Retrovirusinfizierte Milz A	Gefärbte Areale (μm^2)	Follikelfläche (μm^2)	Prozentualer Anteil der gefärbten Areale an der Follikelfläche (%)
	1088,30	33683,2	3,23
	2367,61	152151,89	1,56
	1990,94	43084,2	4,62
	4081,60	168160,48	2,43
	3207,20	190010,66	1,69
Gesamtaktivierung			2,70

Tag 111 Retrovirusinfizierte Milz B	Gefärbte Areale (μm^2)	Follikelfläche (μm^2)	Prozentualer Anteil der gefärbten Areale an der Follikelfläche (%)
	6922,70	106071,58	6,53
	11188,21	115241,61	9,71
	4492,84	83253,98	5,40
	5851,99	79996,46	7,32
	5902,53	931872,20	0,63
Gesamtaktivierung			4,14

Tag 111 Retrovirusinfizierte Milz C	Gefärbte Areale (μm^2)	Follikelfläche (μm^2)	Prozentualer Anteil der gefärbten Areale an der Follikelfläche (%)
	4969,72	543886,14	0,91
	3086,21	456880,04	0,68
	2833,54	552134,33	0,51
	2205,55	431886,64	0,51
	445,13	104760,30	0,42
	3859,67	189315,23	2,04
	1286,44	72390,86	1,78
	2319,48	395884,65	0,59
	363,22	91938,18	0,40
	340,94	116417,38	0,29
	206,88	110616,47	0,19
Gesamtaktivierung			0,76

10. Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Glatzel danken, der mir meine Doktorarbeit am Institut für Neuropathologie ermöglicht hat. Vielen Dank für das Vertrauen, für die konstruktive Beratung und für die stete Unterstützung.

Herzlich danke ich meiner Betreuerin Dr. Susanne Krasemann, die mich während des gesamten Werdeganges meiner Doktorarbeit großartig begleitet hat und mir bei allen Problemen und ungeahnten Komplikationen immer unterstützend zur Seite stand.

Ein besonderer Dank gilt Jan-Paul Lüpke. Er hat mich hervorragend in den Laboralltag eingeführt, mir alle Methoden ganz genau erklärt und gezeigt. Wenn ich ein Problem im Labor hatte, konnte ich zu jeder Tages- und Nachtzeit zu ihm kommen, er hat mir immer geholfen.

Natürlich möchte ich auch dem Laborteam und dem ganzen Institut für Neuropathologie danken, besonders erwähnen möchte ich: Hermann Altmeyen, Dr. Christian Bernreuther, Frank Dohler, Kristina Härter, Prof. Dr. Christian Hagel, Dr. Sascha Lange, Dr. Jakob Matschke, Dr. Melanie Neumann, Dr. Berta Puig-Martorell, Dr. Angela Schipanski, Katharina Schroeck, Beata Szalay, Dr. Dana Thurm und Birgit Williams, die mir stets mit praktischen Tips sowie konstruktiven Vorschlägen und Anregungen zur Seite standen.

Ferner danke ich dem diagnostischen Labor der Neuropathologie für die große Hilfe bei der Erstellung der histologischen Milzpräparate.

Außerdem möchte ich der Arbeitsgruppe von Dr. Lars Redecke vom DESY und Dr. Dana Thurm dafür danken, dass sie die Reinheit meiner Exosomenpräparationen mittels Photonenkorrelationsspektroskopie überprüft haben.

Mein Dank gilt natürlich auch besonders meinen Eltern und meiner Familie, die mich immer unterstützt haben und ohne die ich nicht dort stände, wo ich heute stehe.

Vielen Dank!

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ingeborg Juliane Grashorn
Geboren: 2.11.1986
Geburtsort: Berlin
Eltern: Wolfgang Grashorn, Anästhesist
Helga Frief-Grashorn, geb. Frief, Anästhesistin
Geschwister: Philipp, Jg. 1988
Amber, Jg. 2002
Wohnhaft: Ottenser Hauptstraße 43a, 22765 Hamburg

Schule

1992-2006 Hochschulreife, Abitur, Note 1,5

Studium.

4-2007 Vorklinisches Studium an der Charité, Berlin
4-2009 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note: 1,5
7-2009 Klinisches Studium am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Block6: Diagnostische Medizin
Block3: Der innere Mensch
Block4: Der Kopf
Block5: Psychosoziale Medizin
Doktorarbeit: Neuropathologie
Block1: Gynäkologie/Pädiatrie
Block2: Operative Medizin
8-2012 PJ-Beginn

Famulatur

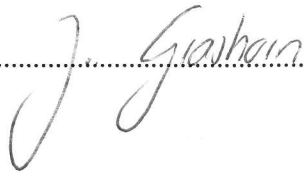
8-9 2009 HNO, Marienkrankenhaus, Hamburg, Deutschland
1-3 2011 Innere Medizin, Tygerberg Hospital, Kapstadt, Südafrika
Notaufnahme, Tygerberg Hospital, Kapstadt, Südafrika
5-6 2012 Gynäkologie und Geburtshilfe, Spital Uster, Uster, Schweiz

12. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'J. Gashorn', is written over the dotted line of the signature field.