

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuropathologie

Prof. Dr. Markus Glatzel

PD Dr. rer. nat. Susanne Krasemann

Muskelin beeinflusst den Transport von PrP<sup>C</sup> in Exosomen  
und die Inkubationszeit nach Prioninfektion

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Leonhard Alexander Nicolaas Veenendaal

Geboren in Hamburg

Hamburg 2019

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 18.04.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. Markus Glatzel

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Tim Magnus

Verachte nur Vernunft und Wissenschaft,  
Des Menschen allerhöchste Kraft.

Mephistopheles, Faust <sup>1</sup>

<b>Zielsetzung dieser Arbeit</b> .....	<b>5</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>6</b>
<b>Summary</b> .....	<b>7</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>8</b>
<b>Prionerkrankungen</b> .....	<b>8</b>
<b>Humane Prionerkrankungen</b> .....	<b>9</b>
<b>Pr<sup>Pc</sup> – Das physiologisch vorkommende zelluläre Prionprotein</b> .....	<b>11</b>
<b>Pr<sup>Psc</sup> – Pathologisches Prionprotein<sup>Scrapie</sup></b> .....	<b>12</b>
<b>Exosomen</b> .....	<b>13</b>
<b>Bildung von Exosomen</b> .....	<b>15</b>
<b>Neuronale Exosomen</b> .....	<b>16</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
<b>Prioninfektion</b> .....	<b>18</b>
<b>Histologische Färbungen und Dekontamination</b> .....	<b>19</b>
<b>Bewertung der Histologischen Ergebnisse</b> .....	<b>20</b>
<b>Immunfluoreszenzfärbung</b> .....	<b>20</b>
<b>Gelelektrophorese und Western Blot</b> .....	<b>22</b>
<b>Blot-Stripping</b> .....	<b>26</b>
<b>Isolierung von Exosomen</b> .....	<b>26</b>
<b>Nanoparticle tracking analysis - NanoSight LM 10</b> .....	<b>27</b>
<b>Statistische Analyse</b> .....	<b>27</b>
<b>Verwendete Materialien, Geräte und Antikörper</b> .....	<b>28</b>
<b>Software</b> .....	<b>32</b>
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>33</b>
<b>Muskelin-Ko-Tiere haben eine verkürzte Inkubationszeit bei Prionerkrankungen</b> .....	<b>33</b>
<b>Histologische Untersuchung</b> .....	<b>34</b>
Hämatoxylin-Eosin – Morphologie und Neurodegeneration .....	34
Saf84 – Die Verteilung von Pr <sup>Psc</sup> ist gleich.....	36
Iba1 – Weniger Mikrogliazellen im Hippocampus der Muskelin-Ko-Kohorte .....	37
Geringere Mikroglia-Aktivierung im Hippocampus der Muskelin-Ko-Kohorte .....	38
GFAP – Muskelin-Ko-Tiere zeigen weniger Astrozytose im Hippocampus .....	40
<b>Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten des Gehirns</b> .....	<b>41</b>
<b>Mengen- und Größenanalyse von Exosomen aus primären Neuronen</b> .....	<b>44</b>
Größe der Exosomen .....	44
Menge der Exosomen .....	46
<b>Exosomen von Muskelin-Ko-Neuronen sind vermehrt mit Pr<sup>Pc</sup> beladen</b> .....	<b>47</b>
<b>Diskussion</b> .....	<b>49</b>
Muskelindefizienz führt zu einer verkürzten Inkubationszeit bei Prioninfektion .....	49
Muskelin-Ko-Histologie präsentiert weniger neurodegenerative Veränderungen .....	50
Subzellulärer Nachweis von Pr <sup>Pc</sup> via konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie.....	54
Muskelin-Ko-Exosomen enthalten mehr Pr <sup>Pc</sup> .....	56
<b>Ergänzende Daten</b> .....	<b>59</b>
<b>Verzeichnisse</b> .....	<b>62</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>62</b>
<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>64</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>73</b>
<b>Lebenslauf</b> .....	<b>74</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	<b>75</b>

## Zielsetzung dieser Arbeit

Die Physiologie des zellulären Prionproteins ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ), insbesondere seine Membranhomöostase, ist bis heute nicht verstanden. Bekannt ist jedoch, dass es mittels Proteasen von der Membran abgeschnitten und über besondere Vesikel, sogenannte Exosomen, sezerniert werden kann. Der Transport von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  innerhalb der Zelle von einem Kompartiment zum anderen ist bisher ebenfalls unklar. Bei Muskelin handelt es sich um ein Adapterprotein, welches an Motorproteine bindet und eine essenzielle Rolle für die Homöostase des  $\text{GABA}_A$  Rezeptors und möglicherweise ebenfalls für  $\text{PrP}^{\text{C}}$  auf der Zellmembran spielt.

Ziel dieser Dissertation ist, zu untersuchen, ob Muskelin einen Einfluss auf den intrazellulären Transport von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  hat. Insbesondere wichtig ist die Frage, ob Muskelin gezielt die Beladung von Exosomen mit PrP beeinflussen kann und ob dieser Prozess die Pathophysiologie einer Prionerkrankung mitbestimmt. Die Bedeutung von Muskelin für den Transport von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  soll untersucht werden, indem eine Doppelfärbung von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  und verschiedenen Endosomen in FFPE etabliert wird. Darüberhinaus werden Exosomen aus primären Neuronen von Muskelin-Ko-Tieren isoliert und auf eine Veränderung ihrer Größe, ihrer Anzahl, sowie der  $\text{PrP}^{\text{C}}$ -Menge untersucht. Durch eine Prioninfektion des Muskelin-Knockout-Mausmodells sollen Inkubationszeiten verglichen werden. Beide Kohorten werden weitergehend histologisch und proteomisch untersucht. Es wurden folgende Hypothesen formuliert: Eine erhöhte  $\text{PrP}^{\text{C}}$ -Menge auf der Plasmamembran könnte zu einer verkürzten Inkubationszeit bei Infektion mit dem RML-Prion-Stamm führen. Dies spiegelt sich in den histologischen Präparaten der Muskelin-Knockout-Kohorte wieder, die möglicherweise eine stärkere Neurodegeneration als die Kontrollgruppe präsentiert. Mithilfe der konfokalen Mikroskopie kann gezeigt werden, dass endozytotische Kompartimente, wie beispielsweise MVB (*multivesicular body*), vermehrt mit  $\text{PrP}^{\text{C}}$  angereichert sind und durch einen Block in der exosomalen Genese alternative (endozytotische) Pfade aktiviert werden. So ist entweder die Anzahl, Größe oder  $\text{PrP}^{\text{C}}$ -Beladung der Muskelin-Ko-Exosomen verändert. Dies wirkt sich auch auf die Inkubationszeit, sowie die lokale Prionverteilung im Gehirn aus.

## Zusammenfassung

Prione sind infektiöse Proteine. Bei den Prionerkrankungen wird das körpereigene PrP<sup>C</sup>-Protein über eine Konformationsänderung in die infektiöse Variante PrP<sup>Sc</sup> (scrapie) autokatalytisch umgeformt. Zu den Prionerkrankungen zählen beispielsweise die Variante Creutzfeld-Jacob'sche Erkrankung (vCJD) oder BSE (Bovine spongiforme Enzephalopathie). Da keine Therapie für Prionerkrankungen existiert, führt die spongiforme Degeneration des Gehirns unweigerlich zum Tode. Trotz intensiver Forschung ist die Membranhomöostase von PrP<sup>C</sup> unverständlich. Durch ein besseres Verständnis über die Physiologie von PrP<sup>C</sup> wird es hoffentlich möglich sein, neue therapeutische Ansatzpunkte für letale Prionerkrankungen zu entwickeln. Muskelin ist ein Adapter Protein, welches den Transport des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors beeinflusst. In dieser Arbeit wollten wir die Rolle von Muskelin für die Membranhomöostase und seinen Einfluss auf den Verlauf einer Prionerkrankung untersuchen. Muskelin-Ko-Mäuse wurden mit infektiösen Prionen infiziert und zeigten im Vergleich zu Muskelin-kompetenten Tieren eine beschleunigte Krankheitsprogression. In den histologischen Untersuchungen konnte kein Muskelin-Ko-spezifisches Prion-Verteilungsmuster identifiziert werden. Muskelin-Ko-Tiere präsentierten jedoch eine geringere spongiforme Degeneration, eine verminderte Astrozytose sowie in Menge und Aktivierungsgrad verminderte Mikrogliazellen. Das Ausmaß der PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerungen war in beiden Kohorten gleich. Auf subsubzellulärer Ebene wurden via konfokaler Mikroskopie Doppelfärbungen des Hirngewebes etabliert, um PrP<sup>C</sup> in den endozytotischen Kompartimenten darzustellen. Weiter wurden unter Verwendung von Muskelin-Ko primären Neuronen (PN) Exosomen isoliert, welche 55 % mehr PrP<sup>C</sup> als wildtyp PN enthalten. So führt das Fehlen des Adapterproteins Muskelin zu einer signifikanten Steigerung der exosomalen PrP<sup>C</sup>-Beladung. Abschließend beschleunigt der Muskelin-Knockout bei Prion-Infektion die Inkubationszeit.

## Summary

Prions are infectious proteins. During prion infection, endogenous PrP<sup>C</sup> is autocatalytically misfolded into the infectious variant PrP<sup>Sc</sup> due to a conformational change. Examples for Prion diseases are Creutzfeldt – Jacob Disease or BSE. Currently, there is no therapy available for prion diseases. The spongiform degeneration of the brain is irreversible and inevitably leads to death. Despite intensive research, the membrane homeostasis of PrP<sup>C</sup> remains to be elucidated. Hopefully a better understanding of the physiology of PrP<sup>C</sup> will lead to the development of novel therapeutic targets for this lethal disease. Muskelin is an adapter protein, which affects the transport of the GABA<sub>A</sub>-receptor. Aim of this thesis was to shed light on the role of muskelin for membrane homeostasis and its influence on the course of Prion disease. Muskelin-Ko mice were infected with prion and showed more rapid disease progression than wild type mice. A muskelin-Ko specific histological prion distribution pattern could not be identified. However, muskelin-Ko-mice showed less spongiform degeneration, reduced astrocytic activation, fewer amount of overall microglia cells and also less microglia activation. The extent of PrP<sup>Sc</sup> deposits was the same in both researched groups. Confocal microscopy of the subcellular compartments was performed in FFPE, to show PrP<sup>C</sup> in the endosomal compartments. Further exosomes derived from muskelin-Ko primary neurons were isolated and presented a 55 % higher PrP<sup>C</sup> amount compared to wild type. Thus, lack of the adapter protein muskelin leads to a significant increase of the exosomal PrP<sup>C</sup> load. The muskelin knockout further leads to a significantly accelerated incubation time during prion infection.

# Einleitung

## Prionerkrankungen

Humane transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) oder Prionerkrankungen sind seltene sporadische, hereditäre oder infektiöse Erkrankungen, welche zu einer Aggregation von fehlgefalteten Prionproteinen und schlussendlich einer fatalen, spongiformen Degeneration des Gehirns führen. Zu dem Kreis der humanen Prionerkrankungen zählen die Variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD), Kuru, die sporadische Creutzfeldt-Jakob Krankheit (sCJD), die fatale familiäre Insomnie sowie das Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom. Charakteristisch für diese Erkrankungsformen sind eine lange Inkubationszeit und ein Krankheitsverlauf, welcher irreversibel fortschreitet und schlussendlich immer letal ist. Bis heute existiert keine kausale Therapie.<sup>2</sup>

TSEs existieren auch im Tierreich und wurden 1750 erstmalig durch Leopoldt beschrieben: In einem „Handbuch zur Nützlichen und auf die Erfahrung gegründete Landwirthschaft“ beschrieb er nicht nur wie Schafe sich die Wolle an den Zäunen ihrer Gehege abkratzten und es so zu Dezimierungen der Bestände kam, sondern er postulierte auch eine mögliche Infektiosität.<sup>3</sup> Diese Erkrankung wurde als Traberkrankheit oder Scrapie bezeichnet. Von dieser Beobachtung leitet sich der Name des krankheitsauslösenden Agens der Prionerkrankung PrP<sup>Sc</sup> PrP-scrapie (*to scrape* = kratzen) ab. Schon in den volkstümlichen Beschreibungen wurden typische Symptome der Erkrankung beschrieben, wie „*La maladie convulsive*“ oder „*la tremblante*“ (zu Deutsch: die Krampf- oder Zitterkrankheit).<sup>4,5</sup> Am Menschen wurde diese Art der Erkrankung erstmalig von Hans Creutzfeldt 1920 und Alfons Jakob 1921 beschrieben, daher der Name Creutzfeldt-Jakob Krankheit. Untersuchungen der historischen Paraffinschnitte konnten nachträglich zeigen, dass sich in Creutzfeldts Schnitten Präparate kein Prion befand. Somit ist Jakob Erstbeschreiber einer humanen Prionerkrankung.<sup>6</sup>

## Humane Prionerkrankungen

Die humanen TSEs lassen sich gemäß ihres Ursprungs in sporadische (sCJD, sporadische letale Insomnie), hereditäre (familiäre CJD, fatale familiäre Insomnie, Gerstmann-Sträußler-Scheinker Syndrom) und infektiöse Varianten (vCJD, iatrogene CJD, Kuru) gliedern.<sup>2</sup> Bei der CJD sind drei Entstehungsmodi bekannt: Die sporadische CJD, welche mit einer Inzidenz

sporadisch		Sporadische Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung Spontane familiäre Insomnie	1-2 pro eine Millionen Einwohner bei Menschen in der 6. und 7. Lebensdekade auftritt.
hereditär		Familiäre Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung Familiäre fatale Insomnie Gerstmann-Sträußler-Scheinker Syndrom	Sie ist mit 85 Prozent die häufigste der CJD-Varianten. Eine Übertragung von sCJD ist ebenfalls möglich, etwa durch kontaminierte neurochirurgische Instrumente, Kornea-
infektiös		Variante Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung Kuru	Transplantationen, <i>post mortem</i> gewonnenes gonadotropes Hormon (GnRH) oder Dura Mater-Transplantate. <sup>7,8</sup> Auch Infektionen mit CJD durch Blutprodukte sind möglich, jedoch unwahrscheinlich. <sup>9</sup> Die familiäre CJD, die klinisch häufig schwierig von sCJD unterschieden werden kann, wird durch verschiedene Mutationen im PRNP-Gen ausgelöst. Viele Mutationen werden mit an hundert Prozent grenzender Penetranz autosomal-dominant vererbt. <sup>10</sup> Bei der fatalen familiären Insomnie handelt es sich um die gleiche Mutation, mit dem Unterschied, dass die erkrankte Familie einen normalerweise nicht relevanten genetischen Polymorphismus am Codon 129 besitzen, welcher für Methionin anstatt Valin codiert. <sup>11</sup> Vollständigkeitshalber ist noch das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom zu erwähnen, welches mit einer Prävalenz von 1 : 10.000.000 sehr selten ist. <sup>12</sup>

Eine medial zeitweise sehr präzente Form der TSE ist die vCJD. Sie wird mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit durch den Verzehr von Tieren, welche mit der bovinen spongiformen Enzephalopathie infiziert sind, übertragen.<sup>13</sup> Ab den Neunzigern traten vermehrt Fälle einer CJD-Variante auf, welche ungewöhnlich junge Patienten betrafen und eine vergleichsweise langsame Krankheitsprogression aufwies. Insbesondere standen hier psychiatrische Symptome wie Depressionen oder Wahn im Vordergrund. Da diese Erkrankung nur bei Menschen höheren Alters bekannt war, wurde ein möglicher

Zusammenhang zwischen der seit 1985 grassierenden BSE-Epidemie unter Rindern postuliert.<sup>14</sup> Schlussendlich gelang es Scott et al. nachzuweisen, dass in der Erkrankung vCJD die Speziesbarriere Kuh auf den Menschen überwunden wurde und Auslöser von fataler Neurodegeneration ist.<sup>15</sup> Über 180.000 BSE-infizierte Huftiere mussten notgeschlachtet werden und insgesamt 4,5 Millionen Rindvieh wurden im Verlauf präventiv eingeschert, um eine Transmission auf den Menschen zu verhindern.<sup>16</sup> Weltweit, soweit erfasst, erkrankten insgesamt lediglich 229 Personen an vCJD.<sup>17</sup> Angesichts der zu tausenden erkrankten Rinder stellt sich die Frage, wieso es in Anbetracht solcher Infektionszahlen nicht mehr vCJD-Fälle gibt. Die Infektionszahlen hatten sich nach staatlichen Gegenmaßnahmen, insbesondere dem Tiermehlverfütterungsverbot, gemäß einer Gauß-Verteilung fast Null angenähert. Alle erkrankten Menschen waren homozygot für einen Polymorphismus am Codon 129 des Prion-Gens, welcher für Methionin kodiert.<sup>18,19</sup> Das bis dahin gültige Dogma besagte, dass der heterozygote Polymorphismus protektiv gegen iatrogene CJD ist.<sup>20,21</sup> 2017 präsentierte sich ein 36-jähriger Mann mit Verdacht auf CJD, welcher posthum als erster Fall von vCJD bei einem Individuum mit heterozygoter Prionprotein-Variante Methionin / Valin gilt.<sup>18</sup> Dies wirft verschiedene Fragen auf: Hat vCJD möglicherweise nur eine verlangsamte Krankheitsprogression in dem heterozygoten Genotyp MV und es droht eine zweite Welle vCJD-Erkrankungen oder es existieren modulierende Faktoren, die nur bei bis dato einem Individuum aller Exponierten zu einem Erkrankungsausbruch geführt haben.

Neben der vCJD, welche durch Produkte BSE-erkrankter Rinder ausgelöst wird, existiert noch eine weitere infektiöse Variante namens Kuru, welche durch den rituellen Endokannibalismus der Foré sprechenden Indigenen in den östlichen Hochgebieten von Papua-Neuguinea übertragen wurde. Kuru bedeutet in der indianischen Sprache der Foré Muskelzittern, welches die primär cerebelläre Symptomatik der Erkrankung treffend beschreibt.<sup>22,23</sup> Kuru scheint aus einem singulären sCJD-Fall ausgegangen zu sein, welcher durch den rituellen Kannibalismus ihrer Verstorbenen und ihrer extremen geographischen Isolation zu einer ausgeprägten Epidemie geführt hatte. Es betraf vor allem Frauen sowie Kinder beider Geschlechter, welche traditionell für das Zubereiten der Festmahlzeit zuständig waren. In dem linguistischen Gebiet der Foré, welches im dichten Urwald von Papua Neu Guinea hoch isoliert lebt, konnte eine neue, gegenüber Kuru protektive, Mutation am PRNP-Gen nachgewiesen werden. Dies ist ein eindrucksvoller Beweis für natürliche Selektion unter Menschen.<sup>24</sup>

## PrP<sup>C</sup> – Das physiologisch vorkommende zelluläre Prionprotein

PrP<sup>C</sup> (Zelluläres Prionprotein) ist ein ubiquitär vorkommendes Glykoprotein, das besonders stark in den Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) exprimiert wird.<sup>25</sup> PrP<sup>C</sup> ist bei Säugetieren mit einer über 92%-igen Sequenzhomologie evolutionär hoch konserviert, was auf eine wichtige physiologische Funktion hindeutet, welche jedoch bis heute unzureichend geklärt ist.<sup>26</sup> Bekannt ist, dass PrP<sup>C</sup> den Schlaf-Wach-Rhythmus von Nagern beeinflusst, bei ischämischen Geschehen in betroffenen Hirnarealen hochreguliert ist, außerdem Nervenzellen gegen oxidative und chemische Degradation schützt. Weiterhin fördert es die neuronale Entwicklung und unterstützt die Integrität der Myelinscheide in Neuronen.<sup>27–30</sup> PrP<sup>C</sup> ist zur Aufrechterhaltung der normalen synaptischen Funktion essenziell.<sup>20</sup> Kontroverserweise entwickeln sich Mäuse, denen das Gen für membranständiges PrP<sup>C</sup> (PRNP) vollständig fehlt auch ohne PrP<sup>C</sup> (PrP<sup>C</sup>-Ko) bis zu ihrem 7. Lebensmonat normal und präsentieren keine Verhaltensauffälligkeiten.<sup>31</sup> Ältere PrP<sup>C</sup>-Ko-Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Altersgenossen jedoch Einschränkungen im Kurz- wie Langzeitgedächtnis. Sie weisen auch ein geringeres exploratives Verhalten auf.<sup>32</sup> PrP<sup>C</sup>-Ko-Mäuse haben eine verminderte GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte schnelle Hemmung, sowie eine herabgesetzte Langzeitpotenzierung. So könnte die Schwächung der inhibitorischen Rezeptoren eine Erklärung für die Neigung zu epileptischen Anfällen bei Prionerkrankungen sein.<sup>20</sup> Das humane Priongen, PRNP, befindet sich auf Chromosom 20 mit einer zwei Exonstruktur, wobei lediglich ein Exon für PrP<sup>C</sup> kodiert.<sup>33</sup> PrP<sup>C</sup> ist ein 30 – 35 kDa großes Protein und über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an der Membran befestigt. Es ist vornehmlich in den Randgebieten von *lipid rafts*, cholesterin- und sphingolipidreichen Membrandomänen lokalisiert. In diesen Mikrodomänen kann PrP<sup>C</sup> durch Spaltung, wie beispielweise dem *α-cleavage*, *β-cleavage* oder durch Metalloproteasen (etwa ADAM10) freigesetzt werden.<sup>34,35</sup> PrP<sup>C</sup> besteht aus 231 Aminosäuren (AS) und verfügt über zwei mögliche N-Glykosylierungsstellen. Es kann mono-, di- oder unglykosyliert vorliegen, was sich im Westernblot durch das typische Dreibandenmuster widerspiegelt. PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> haben eine identische Aminosäurestruktur, unterscheiden sich jedoch grundlegend in ihrer Sekundär- bzw. Tertiärstruktur. Das zelluläre Prionprotein besitzt einen hohen Anteil von Alpha-Helices (42%), jedoch kaum Beta-Faltblättern (3%). Die pathologische Form PrP<sup>Sc</sup> hingegen weist einen hohen Beta-Faltblatt-Anteil (43%) und einen geringeren alpha helikalen Teil auf.<sup>36</sup> PrP<sup>C</sup> kann über eine adhäsive durch, sich wiederholende Aminosäuren

gekennzeichnete Octarepeatregion am N-terminus an bivalente Kationen wie  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Co}^{2+}$  binden, wobei für Kupfer die höchste Affinität besteht.<sup>37</sup> Als potentielle Liganden sind eine Vielzahl von Strukturen bekannt. Als wichtigste zu nennen sind RNA, DNA, Lipide, Transkriptionsfaktoren und Chaperone<sup>38-40</sup>. Bemerkenswert ist, dass  $\text{PrP}^{\text{C}}$  Amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ ) binden kann und so als Mediator synaptischer Dysfunktion fungiert.<sup>41</sup> Darüber hinaus kann  $\text{PrP}^{\text{C}}$  über seinen, in den Extrazellulärraum ragenden, klebrigen N-Terminus freie Radikale binden.<sup>42</sup>

Es sind viele spezifische Funktionen von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  beschrieben, wobei die exakte Funktion und insbesondere die intrazelluläre Wirkweise weiterhin Gegenstand von intensiver Forschung sind.

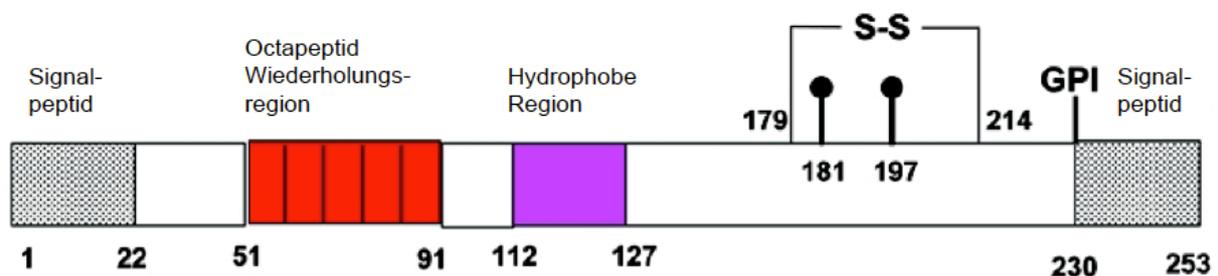


Abb.: 1. **Schematische  $\text{PrP}^{\text{C}}$  Darstellung** von Pastore et al. übernommen und verändert.<sup>43</sup>

Zelluläres Prion Protein – mit 230 Aminosäuren (AS) plus GPI-Anker. Das unstrukturierte N-terminale Ende von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  verfügt über eine Octapeptidsequenz mit 5 Wiederholung von AS 51 – 91, eine Neurotoxische Domäne von AS 106 bis 126, einem hydrophoben Kern bei AS 112 – 127, eine Disulfidbrücke sowie zwei N-Glykosylierungsstellen<sup>44-46</sup>. Der N-terminale Teil ragt wie ein klebriges Lasso in den Extrazellulärraum und kann freie Radikale binden.<sup>42</sup>

### **$\text{PrP}^{\text{Sc}}$ – Pathologisches Prionprotein<sup>Scrapie</sup>**

$\text{PrP}^{\text{Sc}}$  ist die pathologische Form vom Prionprotein. Es unterscheidet sich von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  in der Sekundärstruktur durch einen höheren Beta-Faltblatt Anteil und eine Resistenz gegenüber Verdau mit Proteasen wie z.B. ProteinaseK.<sup>36,47,48</sup> Obgleich die Primärstruktur identisch zu  $\text{PrP}^{\text{C}}$  ist, sind die physiologischen Eigenschaften hinsichtlich Löslichkeit, Struktur und Stabilität grundlegend verschieden.<sup>11-13</sup> Die „protein only“ Hypothese besagt, dass fehlgefaltetes  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  mit dem physiologischen  $\text{PrP}^{\text{C}}$  interagiert, um so eine Konformationsveränderung zu  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  herbeizuführen. In diesen Prozess sind keine Nucleinsäuren involviert und er katalysiert sich selbst.<sup>48,49</sup> Ein Prion kann somit eine Konformationsänderung bei einem gesunden Protein bewirken und so eine Kettenreaktion

auslösen. Weniger als 5 Prionen sowie sehr große Aggregate sind wenig infektiös. Nicht fibrillierte Partikel mit einer Größe von 300 bis 600 kDa mit einer ungefähren Masse von 14-28 Prionpartikel haben die höchste Infektiosität und falten am effizientesten PrP<sup>C</sup> in seine pathologische Form PrP<sup>Sc</sup> um.<sup>50</sup> Eine Infektion mit Prion führt zu keiner spezifischen Immunantwort, da PrP<sup>C</sup> ubiquitär exprimiert wird und die geänderte Sekundär-, wie Tertiärstruktur von PrP<sup>Sc</sup> nicht als Epitop erkannt wird.<sup>51</sup> Die Plasmamembran und die endosomalen Kompartimente wie Beispielsweise MVBs gelten als wahrscheinliche Orte der Konversion.<sup>52</sup> Wo exakt die Konversion von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> stattfindet und wie der genaue Mechanismus hinter der Umfaltung ist, bleibt bis dato ungeklärt.

## **Exosomen**

Zellen können über direkte Zell-Zell-Kontakte, den Transfer von Molekülen und über den interzellulären Transfer von Exosomen kommunizieren.<sup>53-55</sup> Exosomen sind 30 bis 150 nm große, perfekt sphärische Transportvesikel mit einer Lipiddoppelmembran.<sup>56,57</sup> Sie können in Blut, Sperma, Liquor, Urin sowie Zellkultur-Überstand nachgewiesen werden und kommen höchstwahrscheinlich in allen biologischen Flüssigkeiten vor.<sup>58-61</sup> Exosomen entzogen sich lange der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit, da Ihre Funktion auf die Ausscheidung von zellulärem Abraum reduziert wurde. Neuere Ergebnisse zeigen, dass sie neben der Entsorgung und Versorgung von Proteinen, Zell-Zell-Kommunikation und Genexpression auch für den Transfer von Pathogenen wie Prionen oder A $\beta$  ( $\beta$ -Amyloid) verantwortlich sein könnten.<sup>62-64</sup> Im Sucrosegradienten besitzen sie eine ungefähre Dichte von 1,13 – 1,19 g/ml.<sup>65</sup> Exosomen bilden sich im Gegensatz zu anderen extrazellulären Vesikeln (EVs) oder apoptotischen Vesikeln in den MVB und besitzen eine individuelle Lipid-, Protein- und Nukleinsäure-Zusammensetzung.<sup>53</sup> Die Zusammensetzung der Exosomen wird stark von der Ursprungszelle beeinflusst, obgleich es einige alleinig exosomale Markerproteine gibt. Auf Grund ihres endosomalen Ursprungs sind Tetraspanine (CD9, CD63, CD81 und CD82), Proteine für Membrantransport und Fusion (Annexine, Rab Proteine und Flotillin), Proteine aus der MVB – Formierung (Alix/AIP1 und TSG101) und Hitze-Schock-Protein (HSP) (HSP70 und HSP90) in Exosomen vertreten, welche sich als Markerproteine verwenden lassen.<sup>64</sup> Mitochondriale, lysosomale und nukleäre Proteine sind auf Grund der endosomalen Herkunft nicht detektierbar und können als Negativkontrolle einer Exosomen-Aufreinigung dienen.<sup>66</sup> Exosomen sind hoch mit diversen RNAs wie retroviraler RNA, messenger RNA

(mRNA) und micro RNA (miRNA) angereichert. <sup>67</sup> MiRNAs sind um 20 Nukleotide (nt) lange RNAs, die essenziell für die Herabregulierung (silencing) von Genen sind. Exosomen können nicht nur durch Beladung mit miRNA Gene silencen, sondern auch mit Hilfe von mRNAs Proteine in der rezipienten Zelle synthetisieren. <sup>67,68</sup> Weiter besitzen Exosomen von Krebszellen ein Proteom, welches Faktoren enthält, die mit Angiogenese, Metastasierung, Wachstum und Signaltransduktion assoziiert sind. <sup>69,70</sup> Exosomen können auch therapeutisch mit zentral wirksamen Medikamenten, siRNA oder miRNA beladen werden, um effizient, ohne *first pass*-Effekt, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. <sup>71</sup> Exosomen sind erst in den letzten Jahren in den Fokus intensiver Forschung gerückt. Da fast jede Zelle und biologische Flüssigkeit Exosomen enthält, bieten sie bis dato unerschöpfte Anwendungsmöglichkeiten von Diagnosestellung bis Therapie.

Exosom mit typischer Proteinsignatur der Plasmamembran wie beispielsweise PrP<sup>Sc</sup> <sup>72</sup>

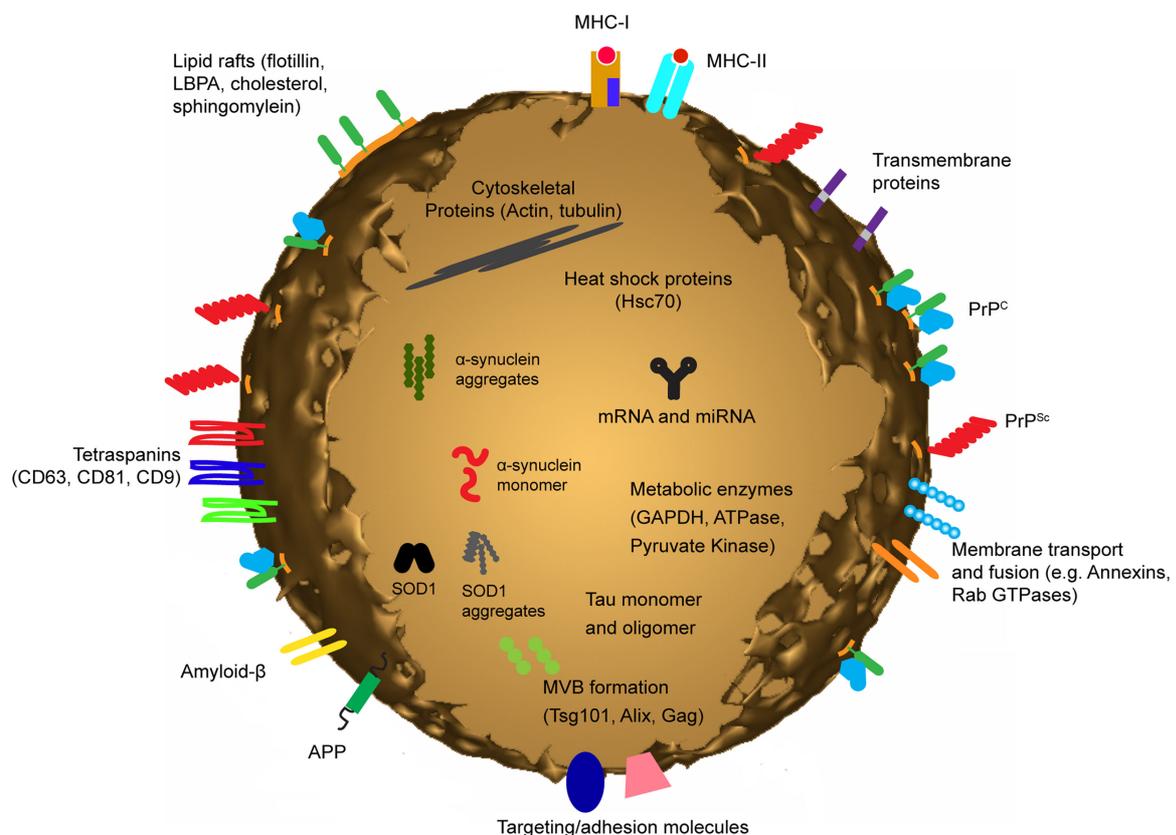


Abb.: 2. **Typische Proteinkomposition eines Exosoms neuronalen Ursprungs.** Abbildung im Englischen zur Wahrung der Übersichtlichkeit von Bellingham et al. übernommen. <sup>72</sup>

## Bildung von Exosomen

Exosomen werden gebildet, indem an der Plasmamembran aus bedeckten Mulden (*coated pits*), endozytotische Vesikel entstehen, welche in frühe Endosomen einschmelzen.<sup>73,74</sup> Die Sortierung von Proteinen in intraluminäre Vesikel erfolgt stark reguliert durch Mono-ubiquitylierung, das ESCRT-system (*endosomal sorting complexes required for transport*) oder durch Assoziation mit *lipid rafts*.<sup>75,76</sup> In den frühen Endosomen oder Sortierungs-Endosomen herrscht ein saures Milieu, in welchem Liganden besser von ihren Rezeptoren dissoziieren und sich somit einfacher sortieren lassen.<sup>77</sup> Diese reifen zu späten Endosomen, in denen durch *inward budding* (Einwärtsknospung) intraluminäre Vesikel aus Teilen der endosomalen Membran entstehen. Anhand ihrer Darstellung in der EM bezeichnet man diese, mit mehreren hunderten Vesikeln gefüllten, späten Endosomen Multivesicular Bodies (MVBs).<sup>78–80</sup> Das Einknospen von Vesikeln wird von der ESCRT-I Komponente Tsg101 und seinem Partner Alix, Ceramid, oder Tetraspaninen reguliert.<sup>81–83</sup> MVBs speichern kurzfristig Membranproteine, wie beispielsweise MHC Klasse II Rezeptoren, um sie bei Bedarf wieder auf die Membran zurück zu transportieren.<sup>84–86</sup> In MVBs internalisierte Vesikel, die Zelloberflächenrezeptoren enthalten, fusionieren mit dem Lysosom und werden degradiert, wenn ein Rezeptor zum Beispiel aufgrund von Überaktivierung herunterreguliert werden soll. Auch Lipide können auf diesem Weg degradiert werden.<sup>87,88</sup> MVBs können mit der PM fusionieren und ihre intraluminären Vesikel freisetzen, die dann Exosomen heißen.<sup>89–91</sup> Für die Fusion des MVBs mit der PM werden Actin / Myosin, Microtubuli und Kinesine, kleine GTPasen sowie SNARES benötigt.<sup>92</sup> Der genaue Mechanismus ist nicht abschließend geklärt. In Reticulozyten fusionieren Multivesicular Bodies unter Beteiligung von Recycling Endosomen (Rab 11) und Calcium mit der PM und setzen so Exosomen frei.<sup>93</sup> Rab-Proteine sind GTPasen zytoplasmatischen Ursprungs, die im Gehirn für die Regulation von Vesikelbildung, Vesikelfusion, Homöostase von Membranproteinen und Vesikeltransport in Zielkompartimente zuständig sind.<sup>91,94</sup> So regulieren Rabs Recycling, Internalisierung von rezeptorgebundenen Liganden und den Abbau von Oberflächenproteinen im Lysosom.<sup>94</sup> Die Abgabe von Exosomen erfolgt durch verschiedene Rabs, wie Rab 11, Rab 27 A/B und Rab 35, wobei in Knock-out-Experimenten immer lediglich eine Teilblockade der exosomalen Genese erfolgte. Dies deutet auf eine komplexe, multifaktorielle Regulation der MVB–Plasmamembran Fusion hin.<sup>63,95,96</sup> Die Freisetzung von Exosomen wird stimuliert bei Thrombinrezeptoraktivierung in Thrombozyten,

Aktivierung von dendritischen Zellen durch Lypopolysaccharide und besonders schnell bei Plasmamembrandepolarisation in neuronalen Zellen.<sup>97,98</sup> Ein zentraler Mechanismus scheint dabei ein intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg zu sein.<sup>61,93</sup> Hier ist hervorzuheben, dass eben diese endosomalen Sortierungseinheiten zur Verbreitung von Pathogenen wie beispielsweise dem HI-Virus genutzt werden können.<sup>99</sup>

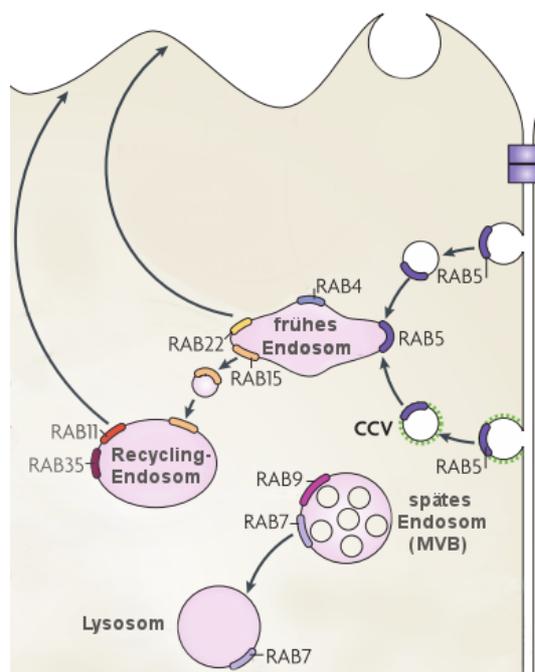
## Neuronale Exosomen

Exosomen werden im physiologischen, wie im pathologischen Setting von neuronalen Zellen freigesetzt. Reifende Neurone steuern die Differenzierung von Oligodendrozyten, in dem sie bei reifen Oligodendrozyten autoinhibitorische Exosomen induzieren.<sup>100</sup> Durch Glutamat gereizte/stimulierte Oligodendrozyten setzen Exosomen frei, welche von Neuronen internalisiert werden. Unter Stress schützen diese Exosomen oligodendrozytären Ursprungs die funktionelle Integrität von Neuronen und erhöhen so ihre Resilienz, indem sie protektive Enzyme, wie die Superoxiddismutase und Katalase, übertragen.<sup>101,102</sup>

Exosomen diverser neuronaler Zellen können die synaptische Erregungsweiterleitung unterstützen, indem Sie essentielle Proteine, zum Beispiel für die Formierung von *second messengern*, bereitstellen.<sup>103</sup> Via Exosomen können Microgliazellen die synaptische Aktivität von Neuronen stimulieren.<sup>104</sup> Auch ortsständige Hilfszellen wie Astrozyten, welche primär für die Nährstoffversorgung von Neuronen zuständig sind, bilden unter oxidativem Stress Exosomen mit einem signifikant erhöhten HSP70-Anteil. Dies erhöht die Überlebenschancen auf benachbarter Neurone.<sup>105</sup> Besonders hervorzuheben ist, dass neuronale Aktivität vorhanden sein muss, damit Exosomen freigesetzt werden können. So sind Neurone durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexbildung im synaptischen Spalt oder NMDA-Rezeptor-Inhibition nicht mehr in der Lage Exosomen freizusetzen.<sup>101</sup> Zusammenfassend kann man sagen, dass neuronale Exosomen nicht nur die neuronale Aktivität regulieren, sondern sie übernehmen auch essentielle Funktionen des menschlichen Gehirns und sind maßgeblich an der physiologischen Gehirnfunktion beteiligt.<sup>64,106</sup>

Im Kontrast dazu steht, dass Exosomen auch als Übermittler von Infektionen und neurodegenerativen Erkrankungen fungieren können. So werden Prionen in Exosomen sortiert und können so Zell-Zell-Barrieren oder Plasmamembranen überwinden. Nicht nur  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -infizierte Exosomen neuronalen Ursprungs können  $\text{PrP}^{\text{C}}$  tragende neuronale Zellen

infizieren, sondern auch Exosomen nicht neuronalem Ursprung. Mäuse, welche mit PrP<sup>Sc</sup> beladenen Exosomen nicht neuronalen Ursprungs inokuliert wurden, entwickeln eine CJD.<sup>60,107</sup> Lösliche A $\beta$ -Peptide werden als krankheitsauslösendes Agens der Alzheimerschen Erkrankungen gesehen. Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass auch A $\beta$ -Amyloid-Peptide via Exosomen freigesetzt, sondern auch, dass über diesen Weg Apoptose induziert werden kann.<sup>108–110</sup> Neben A $\beta$  oder APOE (Apolipoprotein E) enthalten Exosomen eine Vielzahl von relevanten Proteinen, die an neurodegenerativen Erkrankungen beteiligten sind. Beispielsweise wird  $\alpha$ -synuclein calciumabhängig in Exosomen freigesetzt und unterstützt somit die Verteilung von Parkinson im Gehirn.<sup>111–113</sup> SOD1 und TDP-43 sind Proteine, die in Assoziation mit Amyotropher Lateralsklerose stehen, welche ebenfalls via Exosomen versandt werden.<sup>114,115</sup> Alle genannten Proteine weisen Prion-Eigenschaften auf, die mit einer Konformationsänderung anderer Proteine einhergehen. Daher werden die erwähnten Erkrankungen zu den Proteinopathien gezählt. Da es bis dato noch nicht gelungen ist die exosomale Genese vollständig zu unterbinden, stellt sich die Frage, welche Rolle Exosomen bei den TSEs spielen. So mangelt es an einem Modell, welches die Existenz von Exosomen als notwendige Bedingung für die Ausbildung einer Prionerkrankung beweist.



Exosomen haben insofern eine zwiespältige Rolle, als sie protektive und pathogene Eigenschaften vermitteln können. Aktuell konnten Asai et al. in einem Alzheimermodell beweisen, dass die Inhibition von Mikrogliazellen beziehungsweise die Reduktion der Freisetzung von Exosomen eine weitere Ausbreitung von Tau im Gehirn stoppt.<sup>116</sup>

Abb.: 3. Modifiziert nach Stenmark et al.: **Übersicht der endosomalen Kompartimente** – nicht relevante endosomale Kompartimente sind ausgeblendet.<sup>94</sup> Rab 5 ist unter PM lokalisiert und wird als frühes Endosomen bezeichnet. Es ist an der Fusion von

clathrin-beschichteten Vesikeln mit Endosomen beteiligt, lässt sich aber nicht gänzlich von Rab 4, dem schnellen Recycling-Endosomen oder auch frühem Endosomen unterscheiden. Dieses sendet Rezeptoren schnell wieder auf die PM. Das Recycling-Endosomen vermittelt den langsamen Weg von der PM über das frühe Endosomen. Das späte Endosomen (MVB) ist Rab 7 positiv und spielt eine maßgebliche Rolle in der Formation von Exosomen, sowie dem Zuführen von endozytiertem Material zum Lysosom.<sup>94</sup>

## **Muskelin**

Muskelin (MKLN1) ist ein 85kDa messendes intrazelluläres, zytoplasmatisches Protein, welches ursprünglich als Mediator von Zelladhäsion an Thrombospondin-1 (TSP-1) entdeckt wurde. Es gehört zu einer bis dato unbekanntenen Klasse von Transportfaktoren, welche den retrograden Transport von GABA<sub>A</sub>- $\alpha$ 1-Rezeptoren auf verschiedenen cytoskelettalen Systemen ermöglicht. In Axons von Muskelin-Ko-Neuronen ist der retrograde Transport signifikant verlangsamt im Vergleich zu WT-Neuronen. Muskelin scheint somit ein essentieller Transportfaktor degradativer Abbauewege zu sein.<sup>117</sup> Weiter wird Muskelin bei Ischämie im Cortex hochreguliert, wie auch PrP<sup>C</sup>.<sup>28,118,119</sup> Muskelin-Ko-Mäuse zeigen ein normales Verhalten, initial eine dunkle, mit zunehmendem Alter jedoch eine hellere Fellfarbe. Die Veränderung der Fellfarbe bestätigt, dass Muskelin bei der Transportregulation eine übergeordnete Rolle spielt.<sup>117</sup> Heisler et al. ergänzen so ein weiteres Konzept in neuronaler Zellbiologie: Häufige Transportfaktoren, die funktionell spezifische Ladungen binden, welche so verschiedene Zellkompartimente via Actin/Myosin, sowie dynein-/mikrotubuliabhängig durchqueren können.<sup>117</sup> Anzumerken ist, dass das für Muskelin kodierende Gen MNKL1 mit früh einsetzender bipolar-affektiver Störung assoziiert ist.<sup>120</sup>

## **Material und Methoden**

### **Prioninfektion**

Die Inokulation der Versuchstiere wurde von meiner Betreuerin Frau PD Dr. Krasemann und Herrn Prof. Glatzel in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz durchgeführt. Die Versuche wurden durch die Ethikkommission des Amtes für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg unter der Versuchsnummer V 1300/591-00.33 genehmigt. Vor der Infektion wurden die Versuchstiere suffizient mit Ketamin / Xylazin körpergewichtsadaptiert sediert. Eine intraoperative Schmerzprophylaxe erfolgte durch Injektion von Carprofen (5mg/kg Körpergewicht) Die altersgleichen Muskelin-Ko- und WT-Tiere wurden niedrigdosiert intraperitoneal mit 3 logLD<sub>50</sub>, sowie hochdosiert intrazerebral mit 3x10<sup>5</sup> logLD<sup>50</sup>-Prionen vom Rocky Mountain Laboratory (RML) 5.0 - Stamm infiziert. Der RML Stamm gilt als internationaler Standard im Mausversuch mit

Prionen. Er wurde durch Reiheninfektionen von Mäusen mit infektiösem Ziegengewebe generiert. Diese Ziegen wurden wiederum durch an Scrapie erkrankte Schafe initial mit Prion infiziert. So konnte mit diesem infektiologischen Kunstgriff via der Ziege die Speziesbarriere der Maus durchbrochen werden. Die Mäuse werden so lange mit dem Hirngewebe der vorangehenden inokulierten Maus infiziert, bis eine stabile Inkubationszeit erreicht wurde. Beispielweise steht RML 5.0 für die 5 für notwendige Generationsanzahl bis zur stabilen Inkubationszeit.<sup>121</sup> Aufgrund ihrer hohen Umweltstabilität fallen Prionen gemäß Biostoffverordnung in die Risikogruppe II (humane Prionen III). Folglich wurden die Experimente sowie die Haltung der Versuchstiere in einem entsprechenden Labor durchgeführt. Der Befindlichkeitszustand der Tiere nach Infektion wurde täglich überprüft, dokumentiert und eine ausreichende Versorgung sichergestellt. Bei den ersten Anzeichen einer klinischen Erkrankung wurden die Tiere terminiert, um unnötiges Leid in jeder Form zu unterbinden. Eine Hemisphäre der Versuchstiere wurde in einen Paraffinblock gegossen (siehe unten). Die jeweils andere Hälfte blieb für weitere Versuche als Kryokonservat auf -80°C erhalten.

### **Histologische Färbungen und Dekontamination**

Nach der Präparation der Gehirnhemisphären erfolgte initial ein Formalinbad für mindestens 24h, anschließend ein 60-minütiges Ameisensäurebad, gefolgt von einem Wässerungsschritt. Nun kamen die Hemisphären wieder für 24h in Formalin, bevor die Einbettung in Paraffin erfolgte. Wichtig ist zu erwähnen, dass die Behandlung mit Ameisensäure das PrP<sup>Sc</sup> deaktiviert, so dass es seine Infektiosität verliert und im Weiteren im Standard-Labor bearbeitet werden kann. Zusätzlich zerstört das Autoklavieren, sowie die Protease das endogene PrP<sup>C</sup>. Zur Vorbehandlung wurden die Gewebeschnitte 5 Minuten mit 100%iger Ameisensäure behandelt und anschließend bei 100°C für 20 Minuten autoklaviert, um die extrem umweltstabilen Prione zu denaturieren. Im Anschluss erfolgten die Färbungen nach dem Laborstandard für Routinefärbungen im neuropathologischen Labor. Dafür kam das vollautomatische Färbesystem Ventana HX zum Einsatz.

## Bewertung der Histologischen Ergebnisse

Für die lichtmikroskopische Beurteilung der Spongiose, die Anzahl der Astrozyten, der Menge der Mikrogliazellen (MG) und ihr Aktivierungsniveau wurde ein etabliertes semiquantitatives Bewertungssystem verwendet. Jegliche Bewertung der mikroskopischen Schnitte wurde verblindet gegenüber der Schnittidentität durchgeführt. Es wurden insgesamt 4 Grade unterteilt, wobei 0 (keine Ausprägung), 1 (leichte Ausprägung), 2 (mittlere Ausprägung) und 3 (starke Ausprägung) unterschieden wurden. Die Bewertung fand an einem digitalen Leica DMD108 Mikroskop statt, die Abbildungen wurden mit einem automatischen Slidescanner erstellt und mit Nano Slide Viewer bearbeitet. Eine automatisierte Auswertung wurde nicht durchgeführt, da beispielsweise bei sehr hoher MG-Aktivierung die verzweigten Fortsätze als eine Zelle missinterpretiert worden wären.

## Immunfluoreszenzfärbung

Die Schnitte wurden mit einem Mikrotom vom Typ Leica SM2000R 2 µm dick auf Objektträger aufgetragen und über Nacht bei 37 C ° im Wärmeschrank gelagert. Um das Paraffin zu lösen wurden die Schnitte erst bei 63 C ° für mindestens 30 Minuten erhitzt, um anschließend in frischem Xylol 20min weitestgehend entparaffinisiert zu werden. Für je zwei Minuten erfolgte die Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe wie links dargestellt. Durch die Fixierung in Paraffin sind die Proteine, insbesondere die Epitope des Zielproteins, quervernetzt und müssen durch ein „*Heat induced antigen retrieval*“ genanntes Verfahren freigelegt werden. In einem Reiskocher wurden die Schnitte 60 Minuten im AR-Puffer behandelt. Nach dem Kochen hatte der AR-Puffer in der Küvette eine Temperatur von 95° C. Die Küvetten kühlten anschließend 20 Minuten auf Raumtemperatur ab und wurden danach mit H<sub>2</sub>O gespült. Nun erfolgte ein Permeabilisierungsschritt mit 0,2 % Triton X100 in TBS für 10 Minuten, um intrazelluläre Strukturen anschließend besser darstellen zu können. Alle Waschschrte oder Inkubationen fanden auf einem Schwenktisch statt. Mit einem hydrophoben DAKO-Stift wurden die Präparate umrandet und 2 x 3 min in H<sub>2</sub>O gespült. Es erfolgte wieder ein Waschschrte mit 2 x 3 Minuten mit H<sub>2</sub>O. Um unspezifische Bindungsstellen und damit den Hintergrund zu reduzieren, wurde

\_\_\_\_\_ C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O  
100 %  
100 %  
100 %  
96 %  
96 %  
96 %  
80 %  
70 %  
dH<sub>2</sub>O  
\_\_\_\_\_

für 60 Minuten mit *Thermo Fischer Protein-free Blocking-Puffer* bei RT blockiert. Für eine Minimierung des Hintergrundes wurden 50µl Sudanschwarz 0,2 % für 10 Minuten auf jeden Schnitt gegeben. Danach folgten 3 x 5 Minuten in TBS-T Waschpuffer. Die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper erfolgte über Nacht bei 4° C auf einem Schwenktisch. Die Antikörper wurden wie in folgender Tabelle eingesetzt.

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Menge pro Hemisphäre</b>
Pom 2	1:100	75 µl
Rab 7	1:100	75 µl
Rab 11	1:100	75 µl
Rab 5	1:100	75 µl
Rab 4	1:100	75 µl
Lamp 1	1:100	75 µl

Nun erfolgte wieder ein Waschschriff mit H<sub>2</sub>O, 3 x 10 Minuten TBS-T und H<sub>2</sub>O. Alle weiteren Schritte finden in lichtgeschützter Umgebung unter Aluminiumfolie statt, um die Fluorochrome bestmöglich zu schützen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper über 90 Minuten bei RT.

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Menge pro Hemisphäre</b>
Alexa 555	1:300	75 µl
Cy5	1:50	75 µl
Alexa 488	1:300	75 µl

Nach weiteren Waschschriffen für 3x10 min mit TBS-T und H<sub>2</sub>O wurde die überstehende Flüssigkeit abgezogen und der Objektträger mit *DAPI Fluoromount* eingedeckelt und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Die Lagerung nach der Trocknung erfolgte bei 4° C und Dunkelheit, um ein Verblässen der Fluorochrome zu minimieren und eine maximal hohe Bildqualität zu schaffen.

## Gelelektrophorese und Western Blot

Die SDS (*Sodium Dodecyl Sulfat*, zu deutsch Natriumdodecylsulfat) Polyacrylamidgelelektrophorese ist das Standardverfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. SDS ist ein anionisches Tensid, das die Eigenladung der zu untersuchenden Proteine verdeckt und durch eine konstante negative Ladung ersetzt. Die Probe wurde mit 10 x CVL (Ladungspuffer) und RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay buffer*, zu deutsch Lyse- und Extraktionspuffer) bzw. DPBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*, zu deutsch Phosphatgepufferte Salzlösung) auf die gleiche Partikelmenge verdünnt. Der CVL-Puffer besteht aus SDS, das eine Konformationsänderung (Streckung) herbeiführt, Beta-Mercaptoethanol, welches die Disulfidbrücken spaltet, Bromphenol zur Blaufärbung der Probe und einem Glycinanteil, um eine einheitliche Probenbeladung zu gewährleisten. Anschließend wurden die Proben 5min bei 95° C im Thermomixer erhitzt und damit denaturiert. Das Gel wurde mit 1,5 mm dicke, 10 Kammern je 50 µl Volumen gegossen. Für das Trenngel wurde ein Acrylamidanteil von 12% gewählt, um eine optimale Auftrennung im Prionproteinbereich von 30 kDa zu gewährleisten. Das Sammelgel hatte einen Acrylamidanteil von 5%. Das polymerisierte Gel wurde in eine Gelelektrophoresekammer mit Gelelektrophoresepuffer gehängt. Bei 40mA und 60V lief das Gel, abhängig von den geladenen Proteinen, ungefähr 90 Minuten.

---

<b>12% Trenngel</b>	<b>20 ml</b>
Destilliertes Wasser	6,6 ml
30% Rothiphorese (Acrylamid)	8 ml
1,5M Tris HCL pH 8,8	5 ml
0,4% SDS	200 $\mu$ l
<u>Zur Polymerisation</u>	
10% APS	200 $\mu$ l
Temed ( Tetramethylethylenediamine)	20 $\mu$ l

---



---

<b>5% Sammelgel</b>	<b>10 ml</b>
Destilliertes Wasser	6,8 ml
1m Tris HCL pH 6,8	1,25 ml
0,4% SDS	100 $\mu$ l
<u>Zur Polymerisation</u>	
10% APS	100 $\mu$ l
Temed (Tetramethylethylenediamine)	10 $\mu$ l

---



---

<b>RIPA-Puffer</b>	<b>100 ml</b>
50 mM Tris HCL-base pH 8,0	1M Tris HCL
150 mM NaCl	3 ml
1% NP40	1 ml
0,5% Na Deoxycholate	0,5 g
0,1% SDS	10 ml 10%iges SDS
Auf 10 ml RIPA-Puffer wird eine Tablette Protease Inhibitor gegeben	

---



---

<b>CVL Puffer 10x</b>	<b>20 ml</b>
SDS	2 g
1 M Tris HCL pH 7,4	5 ml
$\beta$ - Mercaptoethanol	0,5 ml

---

Sucrose	3 g
1% Bromphenol-blau	200 $\mu$ l
Glycin	
Destilliertes Wasser	Auf 20 ml ergänzen
pH auf 6,8 mit HCL einstellen	

<b>Elektrophorese-Puffer 10x</b>	<b>1000 ml</b>
250 mM Tris Base	30 g/l
1,92 mM Glycin	144 g/l
0,1% SDS	10 g/l
pH 8,3 – 8,8	

Für 1 Liter Elektrophoreseppuffer werden 1 Teil 10x Puffer mit 9 Teilen destilliertem Wasser vermengt.

## Western Blot

Nach Auftrennung der Proteine in der SDS-Gelelektrophorese wurden die im Gel eingeschlossenen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diesen Vorgang nennt man „*blotten*“ (engl. *to blot* = abklatschen). Das Gel mit den enthaltenen Proteinen wurde zwischen zwei feuchte Whatman-Filter und Schwämme auf die Nitrocellulosemembran gelegt. Untergetaucht in einfachem Blotting-Puffer, um Lufteinschlüsse zu minimieren, wurde das Sandwich fixiert und anschließend in die Blottingkammer eingespannt. Nun wurde ein elektrisches Feld senkrecht zur Geloberfläche angelegt, so dass die Proteine in Richtung Anode auf die Nitrocellulosemembran übertragen werden. Über ionische und polare Wechselwirkungen werden die Proteine permanent gebunden. Das Gel wurde bei einer Stromstärke von 400 mA bei einer Spannung von 60 V für 60 Minuten geblottet. Mit dem Ziel unspezifische Bindungen abzusättigen wurde ein Blockierungsschritt mit 5% Milchpulver/TBST vor der Inkubation des Primärantikörpers durchgeführt und anschließend mit TBST gewaschen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4° C auf einem Schwenktisch, um eine optimale Bindung an die Epitope des Zielproteins zu erreichen. Nach drei weiterem Waschschritten wurde der Sekundärantikörper, welcher einer

anderen Spezies als der des Primären angehört, in einer 5% Milchpulver / TBST Lösung entsprechend verdünnt und 1 h bei RT lichtgeschützt auf einem Schwenktisch inkubiert. Schlussendlich wurden via TBST die nicht an den Primären gebundenen Sekundärantikörper abgewaschen. Die an das Fc-Fragment gebundene HRP wurde mit einem chemolumineszierendem Substrat 1 min inkubiert. Je nach zu erwartender Quantität des Zielproteins bzw. Bandenintensität wurden jeweils mit unterschiedlich starken Substraten wie *Super Signal Femto* oder *Pico* gearbeitet. Die Chemolumineszenz wurde detektiert und anhand ihrer Intensität mit der Software *Quantity One* analysiert. Der primäre Antikörper Pom2 wurde wie die Ladekontrolle Tsg101 mit 1:1000, der HRP-Konjugierte Sekundärantikörper mit 1:5000 in 5% Milch/TBST verdünnt.

---

**TBST 10x (Tris buffered saline Tween20)**

10 nM Tris Base pH 7,6	24,22 g
150 mM NaCl	87,66 g
0,05% Tween20	5,0 g

Für einen Liter einfaches TBST wurde ein Teil 10x TBST mit neun Teilen destilliertem Wasser verdünnt.

---



---

**Sandwich Blotting Buffer 10x**

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

Für 1 Liter einfachen Blotting-Puffer wurden ein Teil 10x-Blotting-Puffers mit zwei Teilen Methanol und sieben Teilen destilliertem Wasser vermengt. Abhängig von der Größe des zu untersuchenden Protein kann der Methanolgehalt variieren.

---

## **Blot-Stripping**

Der Stripping-Puffer ermöglicht einen bereits verwendeten Erst-Antikörper zu lösen, um die an die Nitrocellulose gebundenen Proteine wieder für einen neuen Erst-Antikörper zur Detektion weiterer zu untersuchender Protein zu verwenden. Dazu wurde der Blot vier mal zehn Minuten mit TBST gewaschen und anschließend mit Stripping-Puffer sparsam bedeckt. Nach 10 Minuten Inkubation auf der Schwenkunterlage bei Raumtemperatur wurde wieder mit TBST gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu sättigen, kam 5% Milchpulver in TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur zum Einsatz. Der neue Erst-Antikörper wurde anschließend über Nacht bei 4° C inkubiert.

## **Isolierung von Exosomen**

Primäre Neurone von WT- und Muskelin-Ko-Tieren wurden von Frank Heisler zur Verfügung gestellt. Die Exosomen aus dem Zellüberstand von PN wurden durch serielle Zentrifugation isoliert. Zwischen allen Arbeitsschritten befinden sich die Proben stetig auf Eis. Um eine Verunreinigung durch fremde Exosomen, welche in natürlichen Seren enthalten sind, zu verhindern, wurde ein exosomenfreies, synthetisches Neurobasal-Medium mit Zusatz verwendet. Nach 9 bzw. nach 3 Tagen (DIV 9; DIV 12) Kultivierung der Zellen bei 37° C wurden die Überstände seriell bei 4°C zuerst mit 1000g 10 min, darauffolgend mit 7200g 15min lang zentrifugiert. Um Verunreinigungen der Probe durch z.B. größere Vesikel oder Membranreste zu minimieren, wurde die Überstände durch einen 0,22µm Spritzenfilter vor der Ultrazentrifugation gefiltert. Die Isolation der Exosomen wurde bei 100.000g unter 4° für 70min in der Ultrazentrifuge durchgeführt. Das Exosomen-Pellet haftet nach dem behutsamen Absaugen, kaum sichtbar im Zentrifugenröhrchen. Durch DPBS mit Protease, Inhibitor wurde es gelöst und die Proben nach jedem Arbeitsschritt sofort auf Eis kühl gestellt. Die Überschüsse wurden via CO<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C konserviert.

## Nanoparticle tracking analysis - NanoSight LM 10

Die *Nanoparticle tracking analysis* (zu deutsch: Nanopartikel-Verfolgungsanalyse) ist ein Verfahren, welches über Lichtstreuung und Brown'sche Molekülbewegung eine Visualisierung sowie eine Analyse von Partikeln in Suspension ermöglicht. Ein 555 nm Laser durchstrahlt die Probenkammer und regt die zu untersuchenden Partikel unter 20-facher Vergrößerung zur Fluoreszenz an. Eine Kamera zeichnet mit 30 Bildern pro Sekunde ein Video der Partikelbewegung auf, damit anschließend eine Software im Sichtfeld die Partikelbewegung bei konstanten 23,5° C analysiert. Aufgrund dieser Teilchenbewegung können über die Stokes-Einstein-Gleichung die hydrodynamischen Durchmesser berechnet werden. Die Partikelkonzentration kann direkt beurteilt werden.

Das Exosomen-Pellet wurde in DPBS mit einem Proteaseinhibitor kurzfristig auf Eis gelagert und anschließend 1:500 verdünnt. Vor der Messung wurde die Exosomenmischung im 1,5 ml fassenden Reaktionsgefäß mit dem *Vortex* in Dispersion gebracht und unverzüglich in eine sterile 1 ml Spritze aufgezogen. Das Nanosight kühlt die Probenkammer automatisch auf 23,5° C herunter. Mit konsistent schnellem Druck wurde die 0,3 µl umfassende Probe zügig in die linke Probenkammer insuffliert. Der Tisch wurde während der Aufzeichnung nicht berührt und jegliche Erschütterung vermieden, um Artefakte in der Aufzeichnung zu minimieren. Es wurden pro Probe fünf Messungen durchgeführt. Die Größe in Nanometern sowie die Partikelkonzentration pro Milliliter wurden anschließend gemittelt. Es sind verschieden große Exosomen von 80 nm bis 150 nm bekannt. Die gemessenen Exosomen hatten eine durchschnittliche Größe von 132 nm. Zwischen den verschiedenen Proben wurde die Probenkammer mit Ethanol und Druckluft gereinigt, um eine Kontamination mit anderen Exosomen, Partikeln oder Staub zu verhindern.

## Statistische Analyse

Alle Ergebnisse und Abbildungen wurden mit PRISM v6.0e erzeugt. Für die Nanosight-Ergebnisse wurde der *Student's t-test* verwendet. Die Darstellung der Inkubationszeiten erfolgte in Kaplan-Meier-Kurven, welche mit dem Chi-Quadrat-Test und dem Log-Rank (Mantel-Cox) auf Signifikanz überprüft wurden. Die Westernblots wurden via *Quantity One* analysiert und das PrP<sup>C</sup> der Kontrolltiere als 1 definiert. Die histologischen Untersuchungen

wurden semiquantitativ in einer 0 bis 3 messenden Skala bewertet. Nach kollegialer Konsultation mit dem Statistischen Institut des UKEs wurde in diesem Fall der Wilcox-rank-Test eingesetzt, um statistische Signifikanz aufzuzeigen. P wurde definiert als: N.s.  $P > 0,05$ ; \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ .

## Verwendete Materialien, Geräte und Antikörper

---

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
22µm Spritzenfilter „Rotilabo“	Roth
Acrylamid - Rotiphorese 30%	Roth
Ammonium persulfate APS 10%	BioRad
Chemi Doc Gel imaging system	BioRad
Chemi Doc MP detection system	BioRad
DAPI Flouromount G	Southern Biotech
Deckgläser	Roth
Digitales Auflichtmikroskop DMD 108	Leica
DPBS	Gibco
ECL Pierce Westernblotting Substrate	Thermo Scientific
Einmalpipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	BD Biosciences
Ethanol	J.T. Baker
Exosomen Freies FBS	Atlas Biologicals
Feinwaage 430-33	Kern
Hera Safe mit UV-Licht	Hereaus
Immersion Öl (Immersol 518Fx)	Southern Biotech
Inkubator Hera cell 150	Heraeus
Isopropanol 70%	Roth

---

---

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Magnetischer Rührfisch (Variomag mono)	Thermo Electron Corporation
Mikroskop DMD108	Leica Microsystems
Mikrowelle	Sharp
Nanosight LM 50 555nm Laser V 2.3 Build 0033	Malvern
Nitrocellulosepapier	BioRad
Objektträger	Menzel
Opti-MEM	Gibco life Technologies
PAGE Ruler Protein Leiter WB (10-170kDa)	Fermentas
pH Meter (CG 840)	Schott
Pipette Pipatman	Gilson
Pipette Pipatman 2-20 µl	Gilson
Pipette Research fix 0,1-2,5 µl	Eppendorf
Pipette Research fix 1-10 µl	Eppendorf
Pipette Research fix 10-100 µl	Eppendorf
Pipette Research fix 100-1000 µl	Eppendorf
Pipetteboy	Integra Biosciences
Pipettenspitzen	Eppendorf
Proteaseinhibitor (Tablette)	Roche
Protogel	Rothipharma
Reaktionsgefäß (1,5ml, 2ml) - Eppis	Eppendorf
Reaktionsgefäß (15ml, 20ml)	Greiner One Bio
Slidescanner NanoZoomer S210	Hamamatsu
Sodium dodecyl sulfate - SDS Bio- Rad	Bio Rad
SP V Konfokal Mikroskop	Leica
Spritze (1ml, 10ml, 30ml)	Braun

---

---

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Spritze (50ml)	BD Biosciences
Stripping Buffer	Thermo Scientific
Super Signal West Femto	Thermo Scientific
Temed	Sigma
Tetramethylethylenediamine - TEMED	Roth
Thermomixer	Eppendorf
Tiefkühlschrank (- 80°C - UF80- 450S)	Colora Messtechnik GmbH
Tischzentrifuge (5415R)	Eppendorf
Tris- HCl	Sigma- Aldrich
Triton X100	Appllichem
Tween 20	Roth
Ultrazentrifuge L60	Beckmann Coulter
Ultrazentrifugations Tubes (Polyallomer 14x95mm)	Beckman Coulter
UZF Rotor SW40 TI	Beckmann Coulter
Ventana HX	Ventana-Roche Medical systems
Vortex	IKA Labortechnik
Wasseraufreinigungs System (Milli- RX20)	MilliPore
Westernblot Set	Biorad
Whartmanfilter	Biorad
Zellkultur Flakons T25, T75	Sarstedt
Zentrifuge 5430 R - gekühlt	Eppendorf

---

<b>Primäre Antikörper</b>	<b>Affinität</b>	<b>Hersteller</b>
Actin	$\alpha$ - Maus	Milipore
Alix (AIP-1)	$\alpha$ - Maus	BD Bioscience

---

<b>Primäre Antikörper</b>	<b>Affinität</b>	<b>Hersteller</b>
Anti MSP (Purified BCM 415)	$\alpha$ - Maus	Howard Hughes Medical Institute
Flottilin	$\alpha$ - Maus	BD Bioscience
GM130	$\alpha$ - Maus	BD Bioscience
Lamp1	$\alpha$ - Kaninchen	BD Bioscience
Muskelin	$\alpha$ - Kaninchen	Proteintech
Muskelin Rb	$\alpha$ - Kaninchen	Proteintech
POM-2	$\alpha$ - Maus	A. Aguzzi - Universitätsspital Zürich
Rab 4	$\alpha$ - Kaninchen	BD Bioscience
Rab 5	$\alpha$ - Kaninchen	BD Bioscience
Rab 7	$\alpha$ - Kaninchen	Cell Signaling
Rab 11	$\alpha$ - Kaninchen	BD Bioscience
RB393 (Drosophila VAPD-Protein)	$\alpha$ - Kaninchen	Howard Hughes Medical Institute
Transferrinrezeptor Rb	$\alpha$ - Kaninchen	Santa Cruz
Flottilin	$\alpha$ - Maus	BD- Bioscience
POM-1	$\alpha$ - Maus	A. Aguzzi - Universitätsspital Zürich

<b>Sekundäre Ak markiert mit</b>	<b>Spezies</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Cy5	$\alpha$ - Maus	Abcam
Anti-Cy5	$\alpha$ - Kaninchen	Abcam
Alexa 488	$\alpha$ - Maus	Life technologies
Alexa 488	$\alpha$ - Kaninchen	Life technologies
Alexa 488	$\alpha$ - Ziege	Life technologies
Alexa 555	$\alpha$ - Maus	Invitrogen
Alexa 555	$\alpha$ - Kaninchen	Invitrogen
HRP	$\alpha$ - Maus	Promega
HRP	$\alpha$ - Kaninchen	Promega

## Software

---

Excel 2011	Microsoft
GIMP 2.8	GNU - <i>General Public License</i>
LAS AF Lite 4.0.11706	Leica
LaTEX 2 <sub>ε</sub>	LaTEX-project
Mendeley 1.17.9	Mendeley / Elsevier
Nanosight Software NTA 2.3	Malvern
Nanoviewer NDP.view2 U12388-01	Hamamatsu
Photo Shop CS2	Adobe
Prism v6.0e	GraphPad Software
Quantity One	BIO-Rad
Word 2011	Microsoft
Allen Mouse Brain Atlas (online)	2018 Allen Institute for Cell Science
PowerPoint	Microsoft

---

## Ergebnisse

### Muskelin-Ko-Tiere haben eine verkürzte Inkubationszeit bei Prionerkrankungen

Altersgleiche Muskelin-Ko- und WT-Kontrolltiere wurden mit niedriger Dosis intraperitoneal (i.p.) sowie mit hoher Dosis intracerebral (i.c.) mit dem RML 5.0 Prionstamm infiziert. In der intraperitonealen wie auch in der intracerebralen Gruppe zeigte sich eine stark beschleunigte Krankheitsprogression in der Muskelin-Ko-Kohorte. Die Muskelin-Ko-Tiere präsentierten in der i.p.-Gruppe eine Inkubationszeit von 210 Tagen im Vergleich zur Kontrolle mit 233 Tagen. Dieser Effekt stellte sich in der Hochdosis-i.c.-Gruppe nochmals ausgeprägter mit 142 Tagen für die Muskelin defizienten Tiere und 158 Tagen für die Kontrolltiere dar.

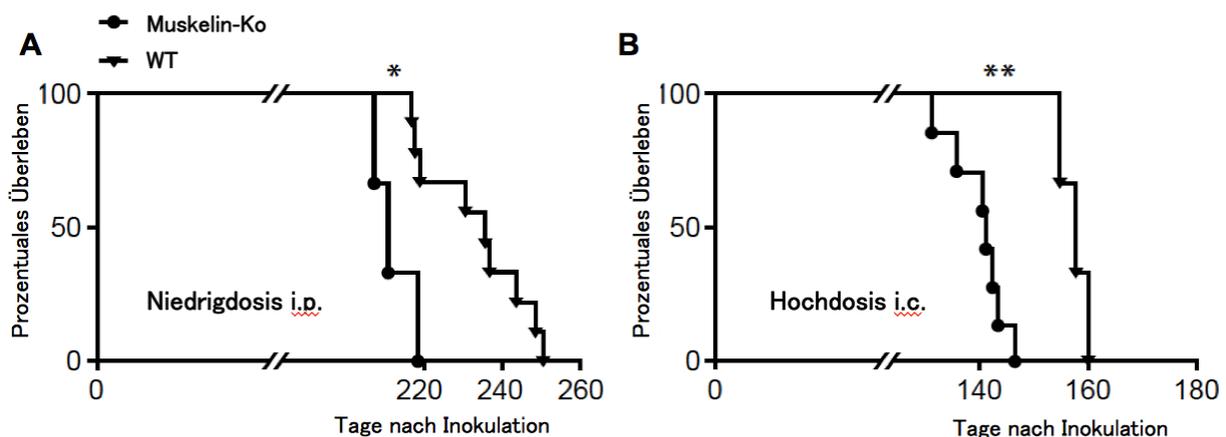


Abb.: 5. Überlebenszeit der Versuchstiere aufgetragen nach Kaplan-Meier **A** In der i.p. Kohorte wurden die WT-Tiere nach  $233 \pm 13$  Tagen klinisch ( $n=9$ ) die Muskelin-Ko nach  $210 \pm 4$  ( $n=8$ ) (Log-rank Test: i.p.: \* $p=0,0126$ ; Chi-Quadrat=6,231) **B** In der i.c.-Kohorte war dieser Effekt nochmals stärker mit WT  $158 \pm 4$  Tage ( $n=9$ ) und Ko  $142 \pm 6$  Tage ( $n=9$ ) (Log-rank Test: \*\*  $p=0,0091$ , Chi Quadrat=6,799) Die Tierversuche wurden von S. Krasemann durchgeführt, statistische Analyse durch den Autor.

## **Histologische Untersuchung**

Um die Krankheitsprozesse in den untersuchten Versuchskohorten näher zu untersuchen, wurden vom Hirngewebe beider Gruppen histologische und immun-histochemische Färbungen durchgeführt. Hier erfolgt die erste histologische Beschreibung einer RML-Prioninfektion im Muskelin-Ko-Mausmodell. Für die Auswertung wurden Gewebepräparate von mit einer niedrigen Dosis  $3 \log LD_{50}$  Prionen intraperitoneal infizierten Tieren herangezogen. Untersucht wurde alle für Prionerkrankungen relevante Hirnregionen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind wenig geläufige Regionen, beispielsweise Teile der Hörbahn, in den ergänzenden Daten zu finden.

## **Hämatoxylin-Eosin – Morphologie und Neurodegeneration**

In der HE-Färbung zeigt sich ein für Prionerkrankungen typisches Bild mit ubiquitärem spongiformen Umbau und Untergang von Neuronen. Signifikante Unterschiede zeigten sich in der Muskelin-Ko-Kohorte in der CA1-Region des Hippocampus sowie der Granularzellschicht des Cerebellums. Beide Bereiche sind von der Spongiose weniger stark betroffen als die der Kontrolltiere. Der Thalamus wie auch der Cortex sind in der Muskelin-Ko-Gruppe in der Tendenz weniger betroffen, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen.

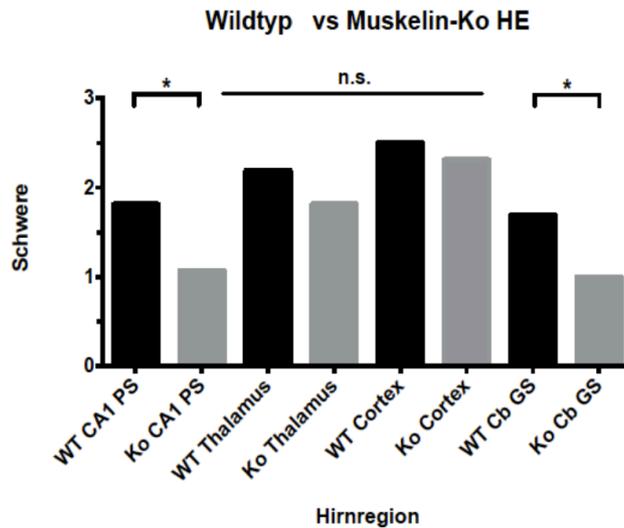


Abb.: 6. Hippocampus und Granularzellschicht sind bei WT-Tieren stärker von Spongiose betroffen, als Muskelin-Ko-Tiere. CA1-Region des Hippocampus: \*  $p=0,0136$ ; Cerebellum Granularzellschicht: \*  $p=0,0202$ ; Verwendete Abkürzungen: Pyramidalzellschicht der CA1-Region des Hippocampus (CA1 PS), Cerebellum Granularzellschicht (Cb GS).

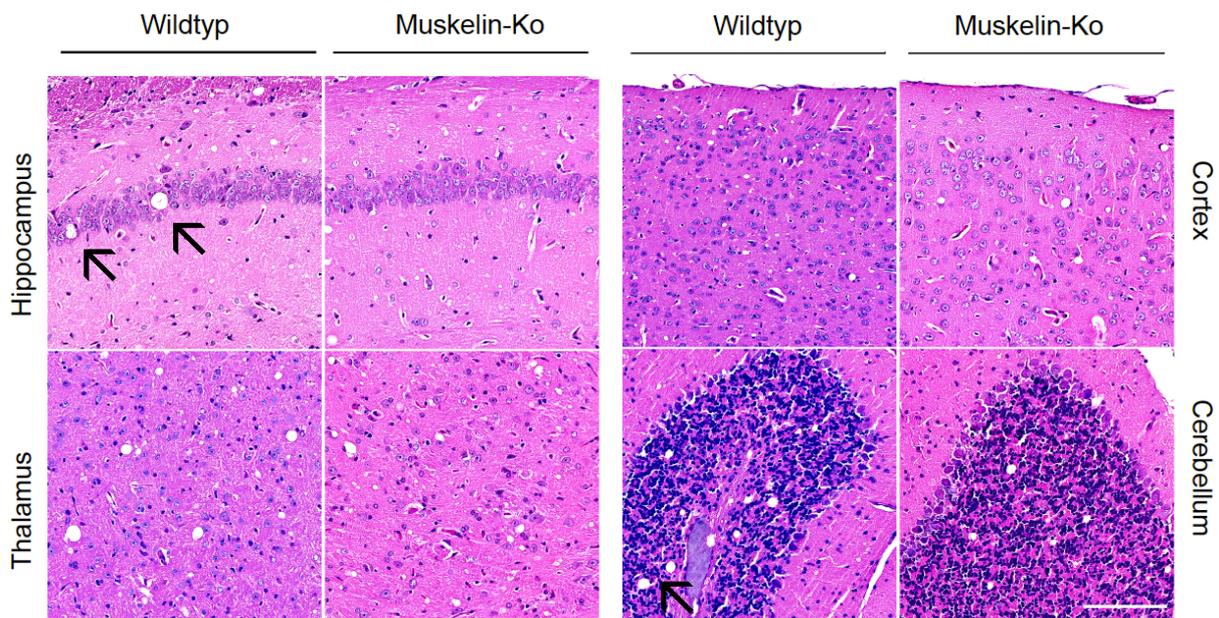


Abb.: 7. HE-Färbung, Sagittalschnitt, Vergrößerung 20x, Maßstabsbalken 100 $\mu$ m; Ubiquitär ist spongiformer Umbau durch weiße Vakuolen erkennbar. Der Hippocampus sowie die Granularzellschicht des Cerebellums der Muskelin-Ko-Tiere präsentieren weniger Spongiose. In der Wildtyp-Kontrolle deuten schwarze Pfeile auf Vakuolen.

## Saf84 – Die Verteilung von PrP<sup>Sc</sup> ist gleich

PrP<sup>Sc</sup> ist die pathologische Form des physiologisch vorkommenden Prionproteins. Saf84 färbt spezifisch für PrP<sup>Sc</sup>. Vergleicht man die WT- und Muskelin-Ko Hemisphären in der Auflichtmikroskopie zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Verteilung oder Intensität der für Prionerkrankungen pathognomonischen PrP<sup>Sc</sup> Ablagerungen.

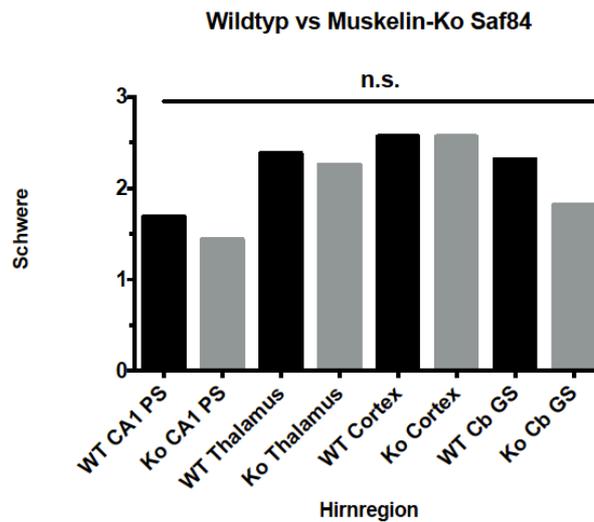


Abb.: 8. Es konnten keine messbaren Unterschiede zwischen Muskelin-Ko und der WT-Kontrolle aufgezeigt werden.

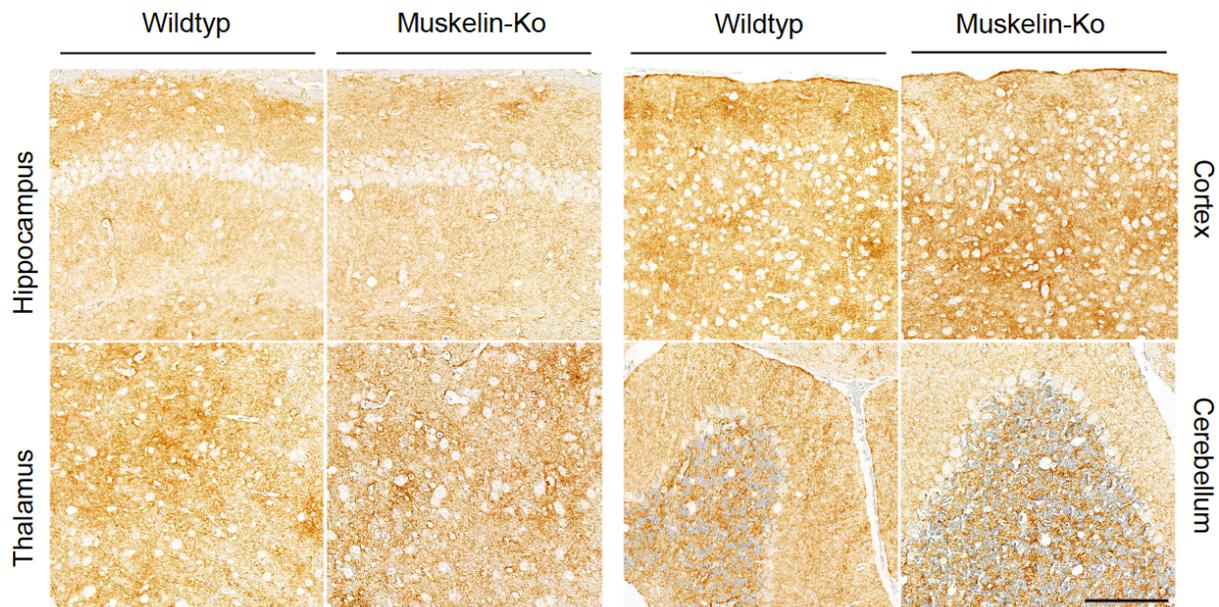


Abb.: 9. Saf84-Färbung, Sagittalschnitt, Vergrößerung 20x, Maßstabsbalken 100µm; Alle Hirnregionen zeigen vergleichbare Intensitäten in der Prionfärbung mit dem Antikörper Saf84. Die fleckige Disposition von PrP<sup>Sc</sup> ist typisch für den terminalen Verlauf der Prionerkrankung. Wie in der HE-Färbung sind neben den Zellkernen ebenfalls ubiquitär Vakuolen zu erkennen.

## Iba1 – Weniger Mikrogliazellen im Hippocampus der Muskelin-Ko-Kohorte

Mikrogliazellen (MG) repräsentieren das hirneigene Immunsystem und sind am ehesten vergleichbar mit Makrophagen. Sie tasten ihre Umgebung ab und phagozytieren Zellreste. In der CA1-Hippocampus-Region fanden sich weniger Mikrogliazellen in den Muskelin-Ko-Versuchstieren. Für die übrigen Regionen waren die Mengen idem. Die höchste Menge von Mikrogliazellen findet sich in beiden Gruppen im Thalamus.

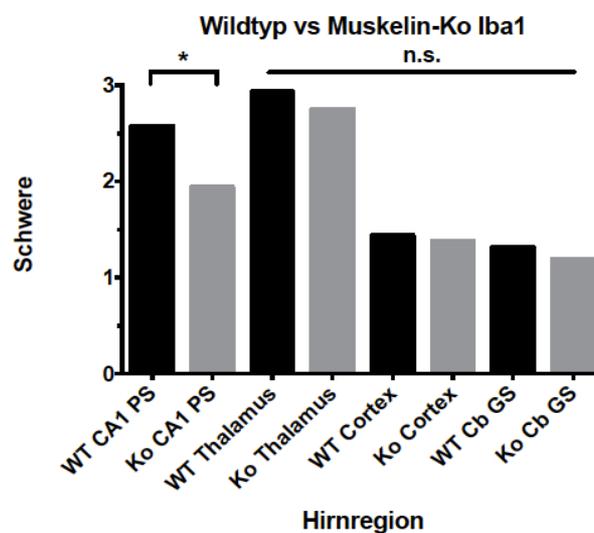


Abb.: 10. Der WT-Hippocampus präsentiert mehr Iba1-positive Mikrogliazellen. CA1-Region des Hippocampus: \* p=0,0272

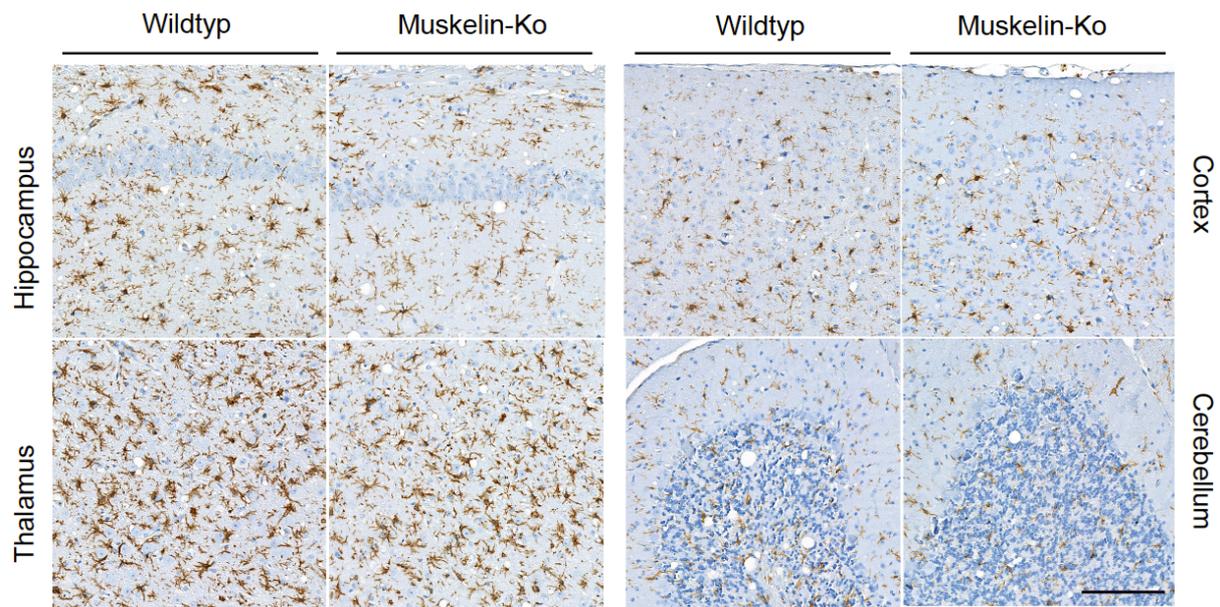


Abb.: 11. Iba1-Färbung, Sagittalschnitt, Vergrößerung 20x, Maßstabsbalken 100µm; Im Hippocampus des Muskelin-Ko-Gewebes zeigt sich eine geringere Menge an Mikrogliazellen, verglichen mit der Wildtyp-Kontrolle. Hohe Konzentration von Mikrogliazellen im Thalamus beider Kohorten, teilweise sind sich überlagernde Zellfortsätze erkennbar, die eine Abgrenzung zwischen den Mikrogliazellen erschwert. Auf allen Schnitten ist spongiforme Degeneration zu erkennen, insbesondere in der WT-Granularzellschicht des Cerebellums.

### Geringere Mikroglia-Aktivierung im Hippocampus der Muskelin-Ko-Kohorte

Mikrogliazellen als Teil des hirneigenen Immunsystems kommen unter physiologischen Umständen in der ruhenden, ramifizierten Form vor und können bei Aktivierung in einen buschig-runden, phagozytierenden Phänotyp übergehen. Weiter existiert ein amöboider Phänotyp, der sich frei durch das Gewebe bewegen kann.<sup>122</sup> Durch ihre hohe Phagozytose- und Exozytoseaktivität könnten Mikrogliazellen bei der Verteilung von Pathogenen<sup>116</sup>, die sich im endosomalen System replizieren (z.B. MVB), eine maßgebliche Rolle spielen. Interessanterweise war das Aktivierungsniveau der Mikrogliazellen in der Muskelin Gruppe geringer. Es zeigte sich in der Kontrollgruppe, dass die Mehrheit der Mikrogliazellen im Hippocampus der Kontrollgruppe in die Kategorie buschig fallen. Diese sind durch einen runden, buschigen Zellkörper und stark verkürzte Fortsätze charakterisiert. Von den Muskelin-Ko-Mäusen waren lediglich 3 Tiere buschig und der Großteil ruhend, mit einem kleinen Zellkörper und weit verzweigten Zellkörpern. So präsentieren Mikrogliazellen im Muskelin-Ko-Mausmodell ein geringeres Aktivierungsniveau.

**A Wildtyp vs Muskelin-Ko Iba1 Mikroglia Aktivierung** **B Wildtyp vs Muskelin-Ko Mikroglia Aktivierung**

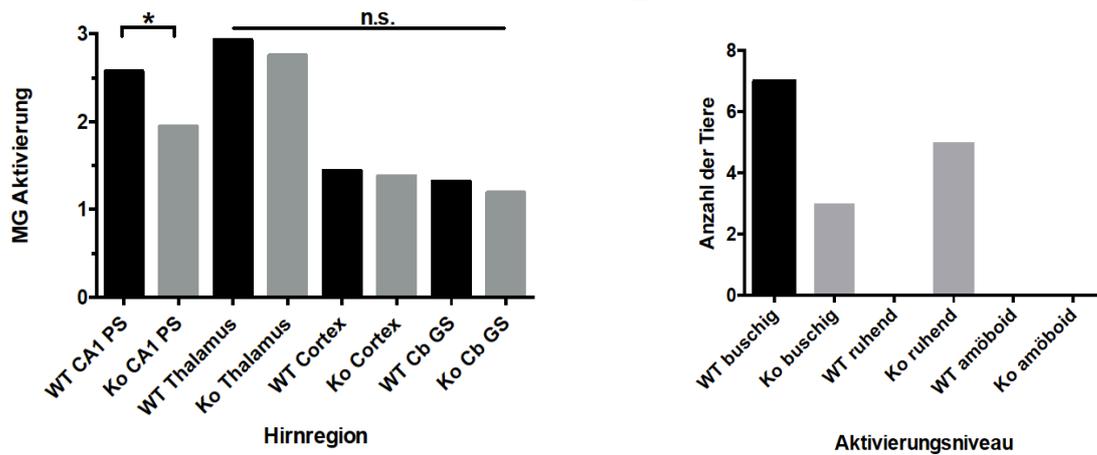


Abb. 12.: **A** Mikroglia-Aktivierungsniveau definiert als: 1 = ruhend 2 = buschig 3 = amöboid; Die CA1-Region des Hippocampus zeigt in der Muskelin-Ko-Kohorte eine entspanntere Mikroglia population (\*  $p=0,0242$ ). **B** WT-Tiere sind im Aktivierungsniveau buschig-rund und damit aktiviert. Die Mikrogliazellen der Muskelin-Ko-Kohorte sind vornehmlich ruhend.

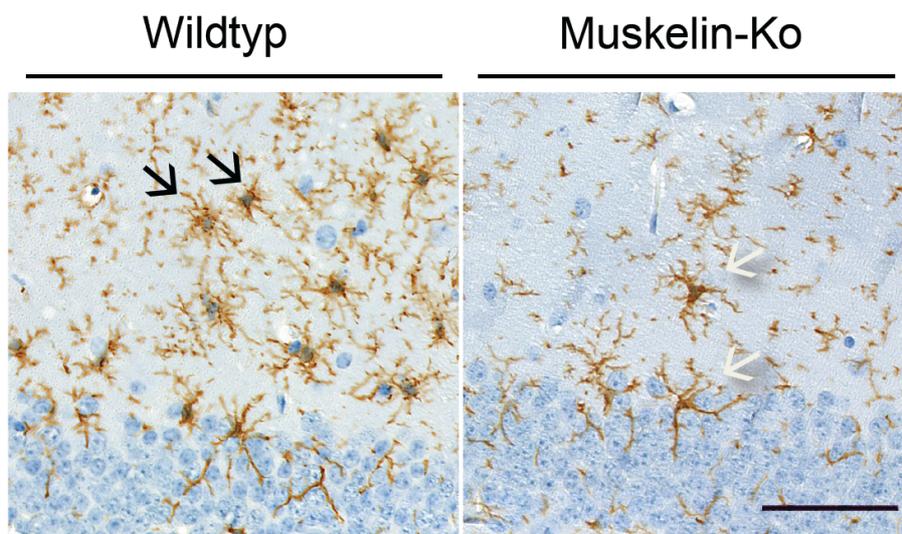


Abb.: 13. Iba-1-Färbung in der CA1-Region des Hippocampus, 40x vergrößert, Maßstabsbalken 50µm. Links gekennzeichnet durch schwarze Pfeile sind buschig-runde und aktivierte Mikrogliazellen zu erkennen. Rechts im Muskelin-Ko-Gewebe sind ruhende Zellen mit langen, entspannten Fortsätzen zu sehen.

## GFAP – Muskelin-Ko-Tiere zeigen weniger Astrozytose im Hippocampus

Die Astrozytose ist eine der drei histologisch wichtigsten Kennzeichen einer CJD. Astrozyten sind neben der Ernährung von Neuronen auch für die pH- und Elektrolytregulation im Gehirn verantwortlich. Sie bilden die Bluthirnschranke und sind bei Verletzung von Axonen für die Bildung von Glianarben verantwortlich.<sup>123</sup> In der CA1-Region des Hippocampus zeigt sich ein deutlich vermindertes Vorkommen von Astrozyten bei den muskelindefizienten Tieren. Die restlichen der hier dargestellten Regionen entsprechen dem des WT und stellten sich als nicht signifikant dar. Zur Vereinfachung der Abbildungen sind hier der Nucleus olivaris superior und Hirnstamm nicht dargestellt. Beide Regionen haben ebenfalls eine verminderte Anzahl von Astrozyten im Vergleich zur WT-Kontrolle.

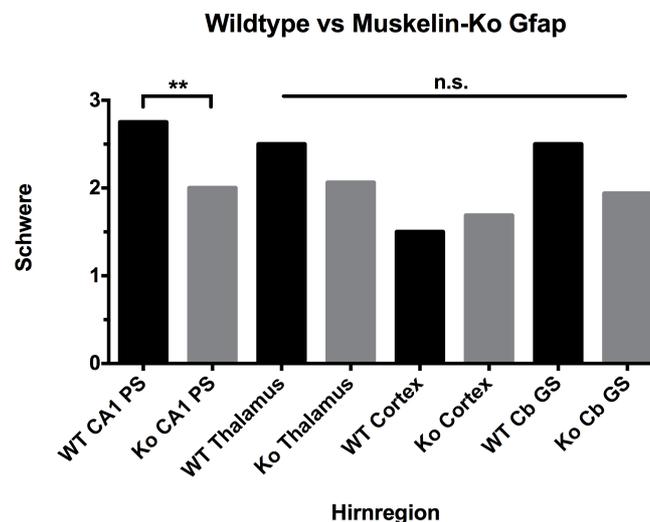


Abb.: 14. Im Hippocampus findet sich bei im Muskelin-Ko Gewebe eine schwächer ausgeprägte Astrozytose, insbesondere in der CA1-Region. \*\*  $p=0,0084$  Muskelin-Ko Thalamus und Cerebellum sind weniger von Astrozytose gekennzeichnet, erreichen das Signifikanzniveau jedoch nicht.

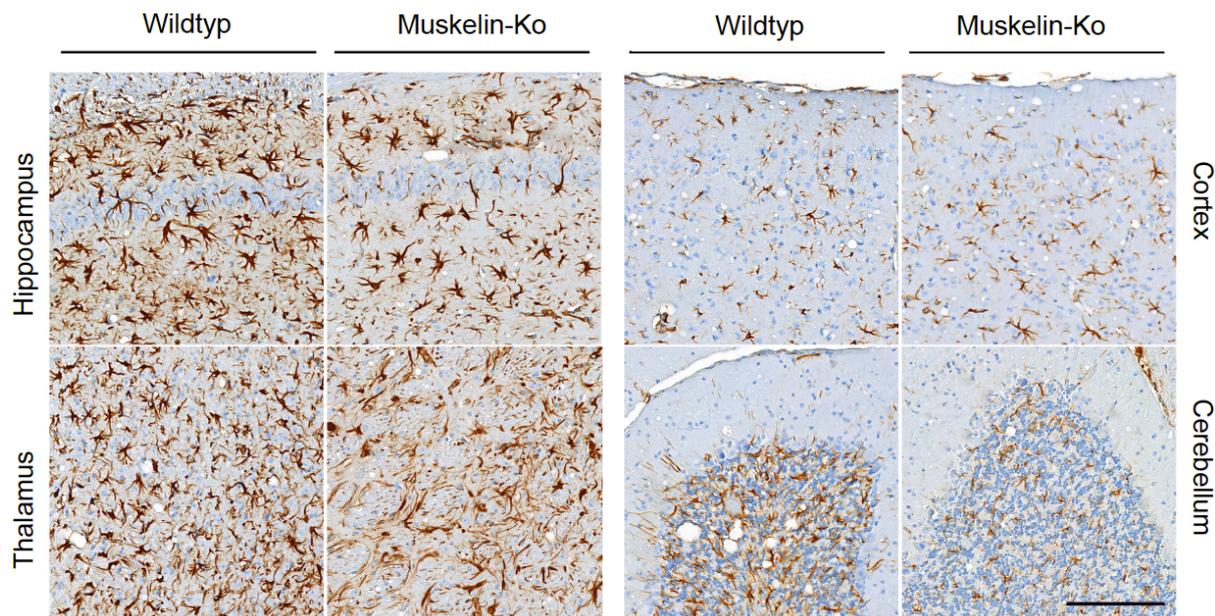


Abb.: 15. GFAP-Färbung, Sagittalschnitte, Vergrößerung 20x, Maßstabsbalken 100µm, In der CA1-Region des Hippocampus der Muskelin-Ko-Kohorte sind deutlich weniger Astrozyten auszumachen als in der Kontrolle. Im Thalamus wie in der Granularzellschicht des Cerebellums sind leichte Unterschiede auszumachen, die das Signifikanzniveau allerdings nicht erreichen.

## Immunfluoreszenzfärbung von Gewebeschnitten des Gehirns

Die Untersuchung der endosomalen Kompartimente erfolgt mit dem Ziel eine mögliche Blockade durch den Knockout des Adapterproteins Muskelin im endosomalen Transportsystem aufzudecken. Um das vermehrte Verbringen von PrP<sup>C</sup> auf die Zellmembran zu untersuchen und einen möglichen Block im endosomalen System aufzuzeigen, stellte sich die konfokale Mikroskopie von endosomalen Kompartimenten als Methode der Wahl heraus. Alle Bilder wurden mit einem Leica SP5-Konfokalmikroskop aufgenommen. Um die Bilder anschließend miteinander vergleichen und detektierte Marker quantifizieren zu können, wurde stets mit gleicher Laser, Verstärkungs- (*gain*) und Intensitätseinstellungen gearbeitet. Als zu untersuchende Hirnregion wurde der Hippocampus gewählt, da er nicht nur verschiedene neuronalen Zelltypen enthält, sondern eine hohe Konzentration von PrP<sup>C</sup> und Muskelin aufweist.<sup>117,124,125</sup> Daher bietet sich die CA1-Region insbesondere für Untersuchungen neurophysiologischer Zusammenhänge an. Der Maßstabsbalken beträgt 10µm, bei einer optischen 63-fachen Vergrößerung und 20-fachem digitalem Zoom. PrP<sup>C</sup> wurde hier mittels des Antikörpers Pom2 detektiert und ist in den Abbildungen in Grün

dargestellt, die für die jeweiligen Rab-Proteine positiv gefärbten Bereiche in rot. Zellkerne erscheinen durch eine Färbung mittels DAPI in blau. Eine Überlagerung der Signale beziehungsweise eine Kolokalisation von PrP<sup>C</sup> mit Rab erscheint in gelb. Eine automatisierte Auswertung der Kolokalisation durch Analyseprogramme mit Regionen von Interesse (ROIs) via Imaris, imageJ, Velocity konnte aufgrund eines stark fluoreszierenden Hintergrundes nicht durchgeführt werden. Alle Aufnahmen zeigen die CA1-Region des Hippocampus.

Bei allen Muskelin-Ko-Schnitten erkennt man deutlich, dass der grüne Kanal heller wirkt verglichen mit den Kontrolltieren. Dies zeigt nebenbefundlich die PrP<sup>C</sup>-Überexprimierung des Muskelin-Ko-Gewebes. (Abb. 16-19 rechts) Das MVB gilt neben der PM als einer der Konversionsorte von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> und ist als Hauptbildungsort der Exosomen von besonderem Interesse. Hier ist durch vermehrte Kolokalisation von PrP<sup>C</sup> und dem MVB-Marker Rab 7 ein starke Gelbfärbung in Clustern (Ansammlungen) nahe der PM zu beobachten. In der Wildtyp-Kontrolle ist die Abgrenzung weniger scharf, ohne einen intensiv gelben Zytoplasmasaum. (Abb. 16) Ein deutlicherer Effekt zwischen Kontrolle und Knockout wäre zu erwarten gewesen. Rab 5 als Marker für das frühe Endosom zeigt keine Kolokalisation mit Pom 2 im Muskelin-Ko Gewebe. Ein zarter Zytoplasmasaum ist zu erkennen, jedoch ohne Cluster nahe der Zellmembran. Das Bindeverhalten des Antikörpers scheint im Wildtyp-Gewebe weniger spezifisch als im Muskelin-Ko-Schnitt. Ein unspezifischer Hintergrund im Zellkern selbst lässt an der FFPE -Eignung des Antikörpers zweifeln. (Abb. 17) Das Recyclingendosom stellt sich mit Rab 11 im Zytoplasma verteilt dar und zeichnet deutlich die Umrisse der Zelle, ohne Kolokalisation mit Pom 2 darzustellen. Im Muskelin-Ko-Gewebe zeigt sich eine starke Hintergrundfluoreszenz im Zellkern, welche im WT-Schnitt nicht zu beobachten ist. Dies spricht gegen das Bindeverhalten des Antikörpers, obwohl deutlich das Perikaryon der Zelle scharf abgegrenzt erkennbar ist. (Abb. 18) Rab 4 ist ein weiterer Marker für frühe Endosomen, welcher deutlich Cluster im Zytoplasma anfärbt ohne Kolokalisation zu beschreiben. Wie bei Rab 5 ist der DAPI-gefärbte Zellkern von roten Signal überlagert, was das Bindeverhalten anzweifeln lässt. (Abb. 19)

Insgesamt lassen sich zwei Dinge festhalten: Muskelin-Ko-Gewebe exprimiert mehr PrP<sup>C</sup>, was sich in einer höheren Intensität des als grün markierten Signals verdeutlicht. Die Muskelin-Ko-Zellen präsentieren in den endosomalen Färbungen ein deutliches, scharf abgegrenztes Perikaryon, ausgenommen in der Rab 5 / Pom 2 Färbung. Dies könnte ein Hinweis auf ein hochreguliertes endosomales System und eine Blockade bzw. alternative Route von PrP<sup>C</sup> sein.

WT-Kontrolle

Muskelin-Ko

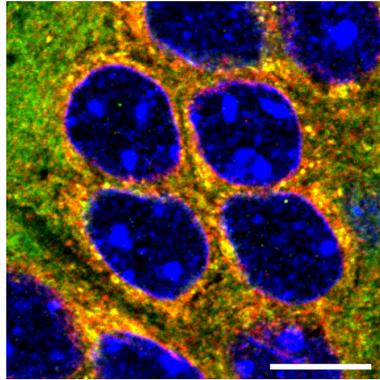
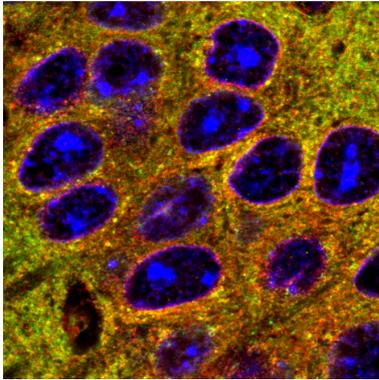


Abb.: 16. **Rab 7 / Pom 2**

MVB / Prion Kofärbung  
Muskelin-Ko zeigen deutliche  
Kokolorisation im Zytoplasma,  
kein Hintergrundsignal im Zellkern.  
Unterschiede nicht zu  
quantifizieren. Umliegendes  
Gewebe stark positiv für PrP<sup>C</sup> im  
Muskelin-Ko-Schnitt.  
Maßstabsbalken 10µm

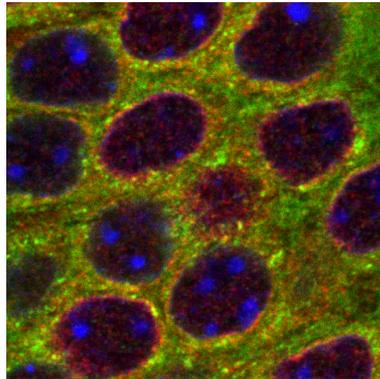
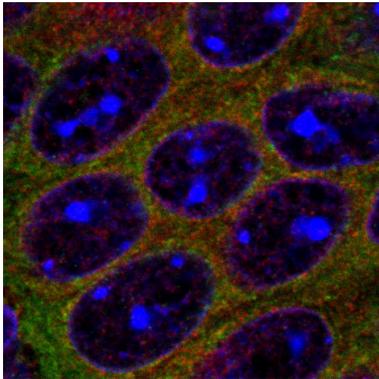


Abb.: 17. **Rab 5 / Pom 2**

Frühes Endosom / Prion  
Kofärbung  
Keine Kokolorisation,  
Distribution von Rab 5 im  
Zytoplasma erkennbar. Leichte  
Hintergrundreaktivität von Rab 5  
im Zellkern. Umliegendes  
Gewebe stark positiv für PrP<sup>C</sup>  
im Muskelin-Ko-Schnitt.

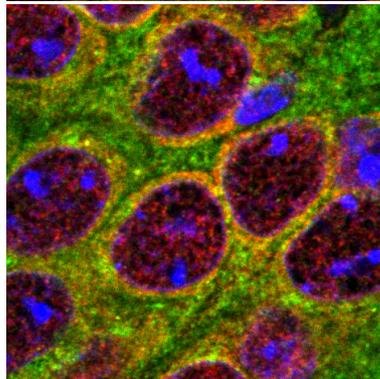
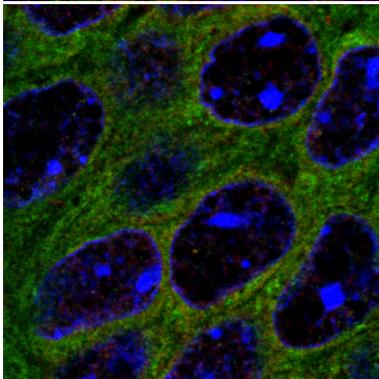


Abb.: 18. **Rab 11 / Pom 2**

Recyclingendosom / Prion  
Im Muskelin-Ko-Gewebe:  
Deutlicher Zytoplasmasaum  
erkennbar, jedoch keine  
Kokolorisation, jedoch Bindung  
des Rab 11 Aks im Zellkern.  
Gewebe stark positiv für PrP<sup>C</sup> im  
Muskelin-Ko-Schnitt.

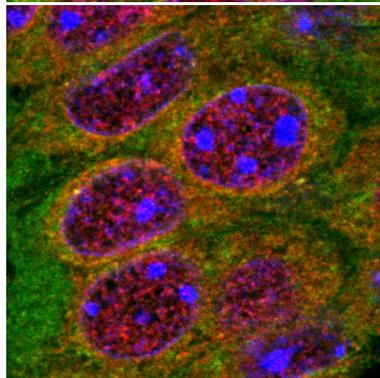
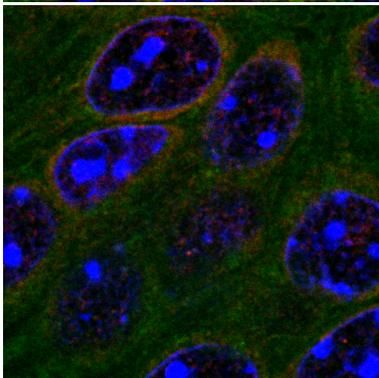


Abb.: 19. **Rab 4 / Pom 2**

Frühes Endosom / Prion  
Unspezifische Bindung von  
Rab 4 Ak im Zellkern,  
insbesondere in Muskelin-Ko  
Schnitt. Auch deutlicher  
Zytoplasmasaum erkennbar.  
Stärkeres Signal bei Muskelin.  
Umliegendes Gewebe stark  
positiv für PrP<sup>C</sup> im Muskelin-  
Ko-Schnitt.

## Mengen- und Größenanalyse von Exosomen aus primären Neuronen

### Größe der Exosomen

Primäre Neurone werden aus neugeborenen Hippocampi (P0) von Mausembryonen gewonnen. Muskelin-Ko Primäre Neurone wurden als Modellsystem gewählt, da sie im Gegensatz zu beispielweise Kulturzelllinien, die Modelle darstellen, viel näher ein einen Organismus *ex vivo* darstellen. Die primären Neuronen wurden im Mittel für Ernte 1. 9 Tage und für Ernte 2. 3 Tage kultiviert, bevor die Untersuchung der Medien vollzogen wurde. Nach der Aufreinigung durch serielle Zentrifugation wurde sowohl die Größe als auch die Anzahl der isolierten Exosomen mittels Nanosight bestimmt.

Die Größenbestimmung für die WT-Kohorte zeigt einen Mittelwert 129 nm, die von der Muskelin-Ko-Gruppe von 136nm. Die Exosomen sind folglich im Mittel 7 nm größer als die Kontrolle, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen. In der 2. Ernte, 3 Tage später, an Tag 11 der primären Neuronen in Kultur, sind die WT-Exosomen mit 119 nm etwas größer, als die Muskelin-Exosomen mit 109 nm, jedoch sind sie ebenfalls nicht signifikant.

Die Messungen ergeben, dass sich die Größe der Exosomen bei Wildtyp- vs Muskelin-Ko-Neuronen nicht signifikant unterscheidet.

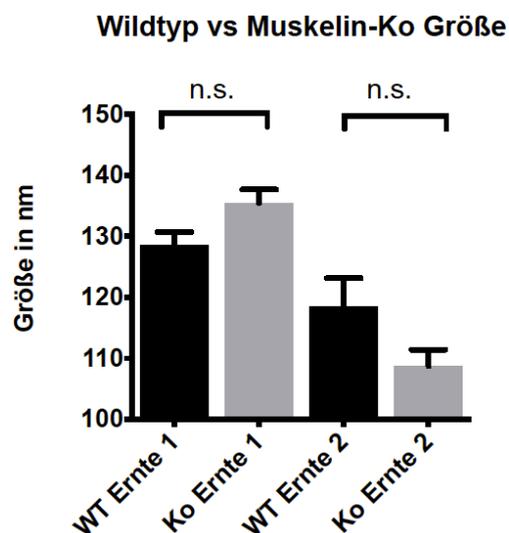


Abb.: 20. Das exosomenhaltige Medium, in dem die PN in Kultur gehalten wurden, ist nach 9 bzw. 3 Tagen erneuert und untersucht worden. Die Exosomen von WT und Muskelin-Ko sind nicht signifikant verschieden groß. **Ernte 1.** : WT Exosomen; Größe 129 nm ± 2 nm, Muskelin-Ko 136 nm ± 2 nm, n=4, p=0,0653; DIV 9; **Ernte 2.** : WT Exosomen; Größe 119 nm ± 5 nm, Muskelin-Ko 109 nm ± 3 nm, n=4, p=0,1201 Mittelwert ± SEM; DIV 12;

Die starke Abnahme der exosomalen Größe von der ersten Ernte zur zweiten in einer Kultur zeigt sich besonders deutlich in der Muskelin-Ko-Kohorte mit 27 nm. (Ernte 1 = 9 Tage (DIV 9); Ernte 2 = 3 Tage (Div 12); Total 12 Tage; \*\*\*  $p=0,0002$ ) Die Größenabnahme der Wildtyp-Exosomen erster Ernte im Vergleich zur zweiten ist nicht signifikant.

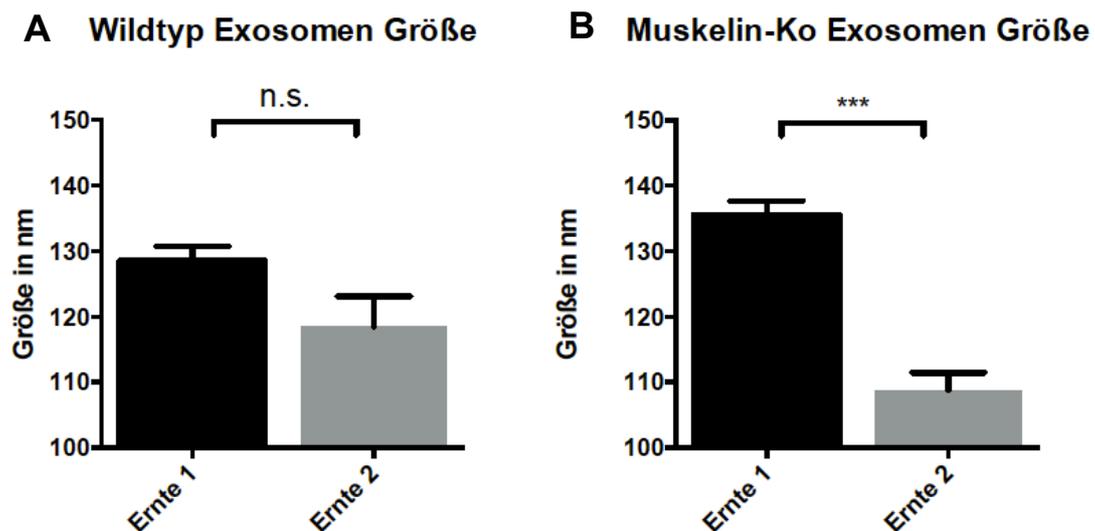


Abb.: 21. Vergleich zwischen der exosomalen Größe in der Ersten und zweiten Ernte innerhalb einer Kultur. **A** Wildtyp-Exosomen Größe; Ernte 1. 129 nm  $\pm$  2 nm; Div 9; Ernte 2. 119 nm  $\pm$  5 nm;  $p=0,1009$ ;  $n=4$ ; Div 12; **B** Muskelin-Ko-Exosomen Größe; Ernte 1. 136 nm  $\pm$  2 nm; Div 9; Muskelin-Ko Ernte 2. 109 nm  $\pm$  3 nm;  $p=0,0002$ ;  $n=4$ ; Div 12; Mittelwert  $\pm$  SEM;

## Menge der Exosomen

Die Menge an Exosomen der ersten Ernte aus dem Überstand primärer Neurone zeigte sich in Wildtyp und Muskelin-Ko annähernd identisch. ( $p=0,9086$ ). Auch in der zweiten Ernte zeigte sich keine signifikante Differenz in der Partikelmenge pro Milliliter. ( $p=0,1486$ )

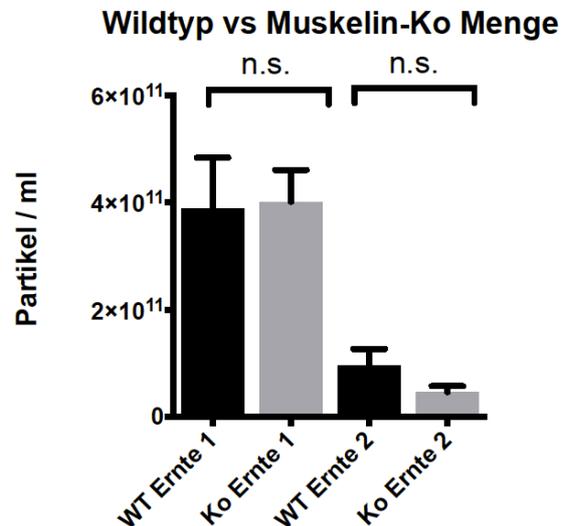


Abb.: 22. Im Vergleich zwischen WT und Muskelin-Ko Exosomenmenge in der ersten und zweiten Ernte ist kein Unterscheid auszumachen. **Ernte 1.:** WT:  $3,9 \times 10^{11}$  p/ml  $\pm 1,4 \times 10^{11}$  p/ml; Muskelin-Ko:  $3,9 \times 10^{11}$  p/ml  $\pm 1,6 \times 10^{11}$  p/ml;  $p=0,9086$ ;  $n=3$ ; Div 9; **Ernte 2.:** WT:  $1,408 \times 10^{11}$  p/ml  $\pm 5,0 \times 10^{10}$  p/ml Muskelin-Ko:  $4,7 \times 10^{10} \pm 1,1 \times 10^{10}$ ,  $p=0,1486$ ;  $n=3$ ; Div 12, Mittelwert  $\pm$  SEM;

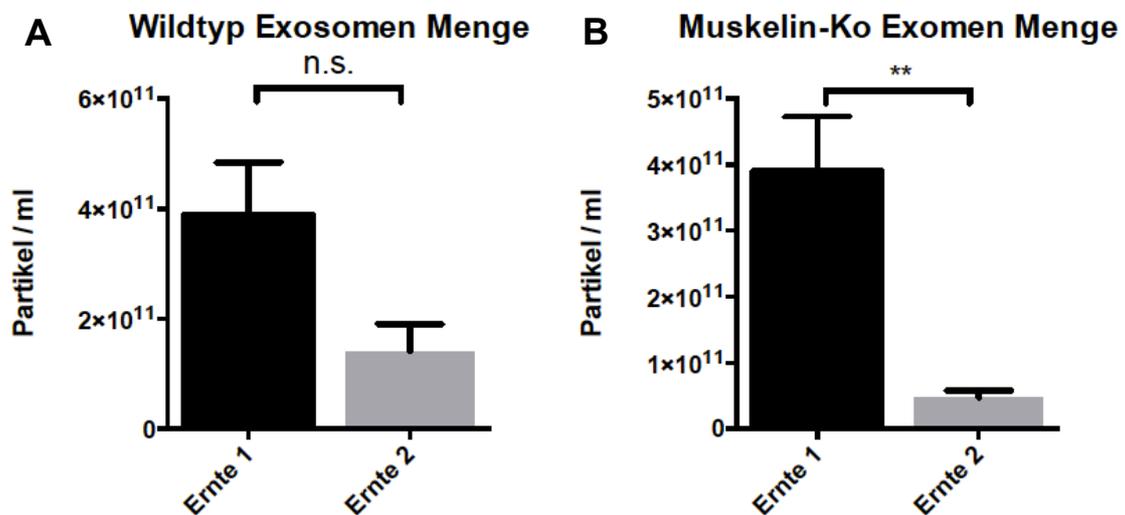


Abb.: 23. Vergleich zwischen erster und zweiter Ernte innerhalb der Kohorten. Muskelin-Ko Exosomen präsentieren eine starke Abnahme der Partikelmenge von der Ersten zu der zweiten Ernte. **A** WT Ernte 1.:  $3,9 \times 10^{11}$  p/ml  $\pm 1,4 \times 10^{11}$  p/ml vs WT Ernte 2.  $1,4 \times 10^{11}$  p/ml  $\pm 5,0 \times 10^{10}$ ;  $p=0,0546$ ;  $n=3$  **B** Muskelin-Ko Ernte 1:  $3,9 \times 10^{11}$  p/ml  $\pm 1,4 \times 10^{11}$  p/ml vs Muskelin-Ko Ernte 2. :  $4,7 \times 10^{10} \pm 1,1 \times 10^{10}$ , \*\*  $p=0,0045$ ;  $n=3$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM;

Im Vergleich der Partikelmengen zwischen erster (Div 9) und zweiter Ernte (Div 12) innerhalb einer Kohorte ist bei den Muskelin-Ko-Exosomen eine signifikante Abnahme der Partikelanzahl zu beobachten (\*\*  $p=0,0045$ ), welche sich in der Kontrollgruppe nicht feststellen lässt ( $p=0,0546$ ).

### **Exosomen von Muskelin-Ko-Neuronen sind vermehrt mit PrP<sup>C</sup> beladen**

Um den exosomalen PrP<sup>C</sup>-Gehalt zu bestimmen, wurden die kryokonservierten Exosomen per Westernblot untersucht. Damit die Mengen der Exosomen bei der Western Blot-Analyse vergleichbar sind, wurden via Nanosight gleiche Partikelmengen von WT ( $3.9 \times 10^{11} \pm 1.6 \times 10^{11}$  p/ml) und Muskelin-Ko ( $3.9 \times 10^{11} \pm 1.4 \times 10^{11}$  p/ml) vor dem Beladen der Polyacrylamidgele bestimmt. Als Marker für Exosomen wurden die in Exosomen angereicherten Proteine Alix, HSP90, Flotillin und TSG101 verwendet. Die Beladung von Exosomen findet unter Hilfe von Alix und TSG101 über den ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*) statt. So eignen sich insbesondere diese beiden Marker, um die gleiche Ladung in der Probe sicherzustellen und Verwechslungen mit beispielsweise apoptotischen Vesikeln ähnlicher Größe auszuschließen. So konnten mit TSG101 die konstantesten Ergebnisse erzielt werden. Als Kontrolle für eine potentielle Verunreinigungen der Präparation durch zelluläre Bestandteile ähnlicher Größe diente der Golgi-Marker GM130.

Via Nanosight wurde die Menge an Exosomen in der Probe bestimmt und jeweils gleiche Mengen zur weiteren Analyse im Western Blot geladen. Dort wurden PrP<sup>C</sup>, Tsg101 und Hsp90 bestimmt. PrP<sup>C</sup> in den Muskelin-Ko Exosomen ist im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle deutlich erhöht. Die Tsg101 Ladungskontrolle ist in beiden Proben gleich, was zusätzlich gleiche exosomale Mengen beweist. HSP90 wird in Exosomen verpackt und stellte sich ebenfalls als konstanter Marker dar. (A) Bei gleicher Exosomen-Quantität ist die relative PrP<sup>C</sup>-Menge in den Muskelin-Ko-Exosomen 55% höher als in der WT-Kontrolle. Die WT-Kontrolle ist definiert als 1. (B) Die Kontrolle und Muskelin-Ko-Gehirne enthalten gleiche Mengen PrP<sup>C</sup>. Die unterschiedliche Beladung der Exosomen mit PrP ist folglich eine Verteilungsänderung und nicht eine Veränderung der absoluten Menge von PrP<sup>C</sup>. (C)

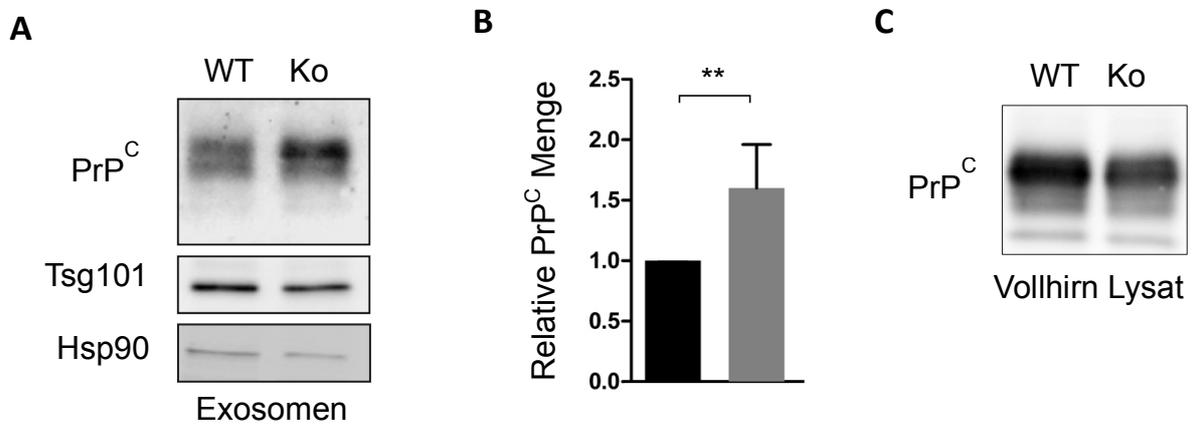


Abb.: 24. **A** PrP<sup>C</sup> ist deutlich intensiver zu erkennen als in der Kontrolle, Tsg101 und HSP90 sind konstant als Markerproteine für Exosomen. **B** Für die Untersuchung wurde die Exosomen in den Proben auf gleiche Exosomenmengen gebracht. (WT:  $3.9 \times 10^{11} \pm 1.6 \times 10^{11}$ ; Muskelin-Ko:  $3.9 \times 10^{11} \pm 1.4 \times 10^{11}$ ) Die relative PrP<sup>C</sup>-Menge in den Muskelin-Ko-Exosomen ist 55% höher als in der WT-Kontrolle definiert als 1. ( $1.55 \pm 0.08$ ; \*\*  $p=0,0084$ ;  $n=3$ ) **C** Je 10 $\mu$ l Vollhirnhomogenisat von Wildtyp, wie Muskelin-Ko-Tieren zeigen gleiche PrP<sup>C</sup>-Mengen.

## Diskussion

### Muskelindefizienz führt zu einer verkürzten Inkubationszeit bei Prioninfektion

Muskelin-Ko-Tiere entwickeln nach einer Prioninfektion schneller eine klinische Erkrankung. Dies wurde durch das initiale Experiment mit einer i.p. Injektion vom RML-Stamm bewiesen. Hauptursächlich hierfür ist die erhöhte Menge von PrP<sup>C</sup> auf der Zellmembran, welche mehr Substrat für die katalytische Umwandlung zu PrP<sup>Sc</sup> bereit stellt. Eine Infektionsroute mittels intrazerebraler Injektion ergab eine mit im Mittel 16 Tagen stark verkürzte Erkrankungsdauer im Vergleich zu den Kontrolltieren. Lediglich andere PrP<sup>C</sup> überexprimierende prioninfizierte Mausmodelle wie TGA 20 oder ADAM10-Ko weisen eine noch geringere Inkubationszeiten auf.<sup>34,126</sup> Da die Expression von Muskelin und PrP<sup>C</sup> im ZNS ausgeprägter als im PNS ist, kann von einer Verstärkung des adversen Effektes der Mutation auf eine Prioninfektion ausgegangen werden.<sup>127,128</sup> Für den i.p. Infektionsweg müssen die Prionen eine nicht unerhebliche Strecke in verschiedenen Organsystem zurücklegen. So ist der Gastrointestinaltrakt über das enterische Nervensystem mit dem ZNS verbunden. Weiter bietet das GALT (zu deutsch: Darmassoziiertes Immunsystem) eine intestinal gelegene Möglichkeit für Prione in Kontakt mit APCs (zu deutsch: Antigenpräsentierenden Zellen), wie beispielsweise dendritischen Zellen zu kommen, welche neben M-Zellen (modifizierte Epithelzellen) eine Rolle bei der Aufnahme der infektiösen Partikel spielen.<sup>129</sup> Über diesen Umweg erreichen Prione die Milz und so Anschluss an das autonome Nervensystem.<sup>130</sup> Da Muskelin die höchste Expression im ZNS hat, kommt der Knockout vom muskelinvermittelten retrograden PrP<sup>C</sup>-Transport weniger zum Tragen als bei einer cerebralen Infektionsroute. Folglich ist die Zeit zur klinischen Manifestation von Symptomen bei der i.c. Versuchsanordnung bei Muskelin kürzer verglichen mit der intraperitonealen. Das schnelle Versterben der Muskelin-Ko-Kohorte kann weiterhin gut in Zusammenhang mit der Überexprimierung von PrP<sup>C</sup> auf der neuronalen PM und der vermehrten Beladung von Exosomen mit PrP<sup>C</sup> gebracht werden.

## Muskelin-Ko-Histologie präsentiert weniger neurodegenerative Veränderungen

Obwohl die Muskelin-defizienten Tiere wesentlich schneller nach einer Infektion mit RML Prionen versterben, zeigt sich in der HE-Färbung eine moderatere Spongiose im Vergleich zu den WT-Versuchstieren. Überraschenderweise stellt sich im Hippocampus und Cerebellum die spongiforme Degeneration der Muskelin-Ko-Kohorte signifikant geringer dar. Tagnaouti et al. untersuchten das Distributionsmuster Muskelines und zeigten höher konzentrierte Areale im Hippocampus und Cerebellum.<sup>124</sup> Auf zellulärer Ebene präsentierten Pyramidalzellen in der CA1-Region, sowie in der Granular- und Purkinjenzellschicht im Cerebellum die höchste Muskelineexpression.<sup>124</sup> Dieses Verteilungsmuster entspricht ebenfalls dem inhibitorischen GABA-Rezeptor und bestätigt eindrücklich die Ergebnisse von Heissler et al.<sup>117</sup> Demzufolge ist durch die physiologisch vermehrte Expression von Muskelin in diesen Arealen im Wildtyp und dem anschließendem Knockout von MNLK-1 eine vermehrte PrP<sup>C</sup>-Akkumulation exakt in diesen Zellen zu erwarten. Die HE-Färbung zeigt jedoch, dass bei den Muskelin-Ko-Tieren es im Cerebellum und Hippocampus zu einer verminderten Spongiose gekommen ist. Dass exakt diese Areale vermindert von Spongiose befallen sind, ist eine bemerkenswerte Beobachtung, da mehr PrP<sup>C</sup> zu mehr Neurodegeneration führen sollte. Eine mögliche Ursache für dieses Phänomen kann die Inkubationszeit darstellen. Möglicherweise hatten die Muskelin-Ko-Tiere nicht genügend Zeit die volle Pathologie der Wildtyp-Kontrolltiere zu entwickeln. PrP<sup>C</sup> wird auf der PM von Muskelin-Ko-Neuronen 1,82x exprimiert. So ist eine vielfache Menge von PrP<sup>C</sup> als Substrat bei einer PrP<sup>Sc</sup>-Infektion vorhanden, ohne dass die absolute Menge von PrP<sup>C</sup> im Gehirn verändert ist.<sup>125</sup> Hier wegweisend ist die Arbeit von Sandberg et al., in der von einer zweiphasigen Prionverbreitung und -toxizität berichtet wird. In der ersten Phase verbreiten sich Prionen exponentiell, nicht durch die PrP<sup>C</sup>-Konzentration begrenzt, bis ein maximaler Priontiter vom 10<sup>6</sup> fachen erreicht wird. Die zweite Phase zeichnet sich durch ein Plateau aus, welche den Beginn der klinischen Phase markiert. Dieser Zeitraum ist invers proportional zur PrP<sup>C</sup>-Konzentration.<sup>131</sup>

Ausgehend von dieser bemerkenswerten Beobachtung stellten die Kollegen Sandberg et al. die Hypothese auf, dass die Neurotoxizität durch unterschiedliche Subklassen von Prionen verursacht wird, in dem ein *pathway switch* (Klassenwechsel) stattfindet, wenn die Plateauphase beginnt.<sup>132</sup>

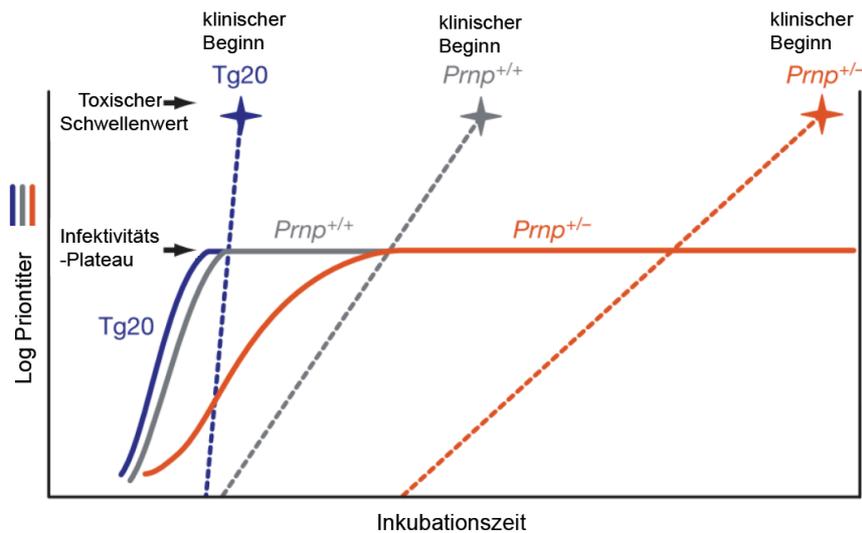


Abb.: 25. **Kinetik der Prionverbreitung und Toxizität** Prionreplikation (durchgezogene Linien) ist exponentiell (Phase 1) bis ein maximaler Priontiter erreicht wird, welcher unabhängig vom  $PrP^C$  Expressionsniveau ist. Hier erfolgt ein Klassenwechsel, welcher

zur Produktion einer toxischen Variante (gestrichelte Linien) führt und linear abhängig von der  $PrP^C$  Konzentration ist (Phase 2). Toxische Prione akkumulieren nicht, bis das Infektivitätsplateau erreicht wurde. Nachdem der toxische Schwellenwert überschritten wurde, beginnt die klinische Erkrankung. Übernommen von Sandberg et al. 2011 <sup>131</sup>

Es ist also zu vermuten, dass die Krankheitsprogression der beiden Kohorten initial gleich war, da sie unabhängig von der  $PrP^C$ -Menge ist. Nach dem mechanistischen Wechsel in die zweite Phase verändert sich der Priontiter demnach nicht und es beginnt die eigentliche Neurodegeneration mit den typischen neuropathologischen Kennzeichen: Spongiformem Umbau, Neuronenverlust und Gliose. In der Muskelin-Kohorte könnten diese neurodegenerativen Effekte schwächer ausgeprägt sein, da mehr  $PrP^C$  zum Vermitteln der neurotoxischen Effekte vorhanden ist. So führt die relativ erhöhte Menge von  $PrP^C$  zu mehr Substrat und einer beschleunigten Krankheitsprogression, welche möglicherweise durch die von Sandberg et al. postulierte nicht direkt nachweisbare  $PrP^{Lethal}$ -Subklasse verursacht wird. Weiter kann angenommen werden, dass nicht nur die Prion-Ausbreitung und die Neurotoxizität zwei getrennte Prozesse sind, sondern dass möglicherweise Prionen per se nicht neurotoxisch sind. <sup>132</sup>

In der Saf84-Prionfärbung ist kein signifikanter Unterschied in der Intensität der Ablagerungen festzustellen. Mehr  $PrP^C$  auf der PM führt möglicherweise durch erhöhte Neurotoxizität zu einer verkürzten Inkubationszeit, jedoch nicht zu einer vermehrten Disposition von  $PrP^{Sc}$  im Gehirn. <sup>126,133</sup> Die untersuchten Bereiche der Muskelin-Ko-Kohorte zeigen eine geringere  $PrP^{Sc}$ -Disposition, welche man als generellen Trend festhalten darf. Eine Erklärung für diesen Effekt könnte die Inkubationszeit der Muskelin-Ko-Tiere sein. Sie ist wesentlich kürzer, es besteht folglich weniger Zeit für  $PrP^{Sc}$ -Ablagerung im Gehirn zu

generieren. Nach Erreichen der Plateauphase erfolgt die von Sandberg et al. postulierte neurotoxische Phase, die den Beginn der klinischen Erkrankung markiert.<sup>131</sup> Wenn der PrP<sup>Sc</sup>-Titer sich dem Plateau annähert, sieht man zum Zeitpunkt der klinischen Erkrankung bei Euthanasierung der Versuchstiere oft keinen Unterschied in der PrP<sup>Sc</sup>-Menge im Vergleich zu den WT-Tieren. Eine so verschleierte, unterschiedliche PrP<sup>Sc</sup>-Kinetik kann durch sogenannte *matched timepoints* aufgedeckt werden. So konnten wir nach 75 Tagen *post infectionem* zeigen, dass Muskelin-Ko-Mäuse schon früh signifikant mehr PrP<sup>Sc</sup> im Vergleich zu Wildtyp-Tieren akkumulieren.<sup>125</sup>

Die Proteinmengen von PrP<sup>Sc</sup> sind im Westernblot terminal miteinander vergleichbar und zeigen, dass nicht die absoluten PrP<sup>Sc</sup>-Mengen in den Kohorten verschieden sind, sondern die Distribution auf der Zelloberfläche. Mehr PrP<sup>C</sup> auf der PM bedeutet auch mehr Substrat für Konversion von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup>, sowie für die Vermittlung von neurotoxischen Effekten und damit schlussendlich zu einer beschleunigten Infektion. Es ist schon länger bekannt, dass PrP<sup>C</sup>-überexprimierende Tga20-Mäuse eine wesentlich verkürzte Inkubationszeit präsentieren und dass sich erhöhte Mengen von PrP<sup>C</sup> auf der Plasmamembran bei einer Prioninfektion negativ auf die Überlebenszeit auswirken.<sup>34</sup> Tga20-Mäuse weisen jedoch bei *matched timepoints* niedrigere PrP<sup>Sc</sup>-Mengen auf als ihre Wildtyp-Kontrollen, was auf eine andersartig vermittelte Neurotoxizität schließen lässt.<sup>34,126,131</sup>

Weiter könnten alternative Routen zur Verbreitung genutzt werden, wie beispielsweise der exosomale Weg, mit dem sich die Zelle selbst des toxischen Proteins entledigt, es aber hoch effizient propagiert. Diese Theorie passt zu den Beobachtungen von  $\alpha$ -Synuclein überexprimierenden SH-SY6Y-Zellen, bei denen mit Bafilomycin oder Ammoniumchlorid eine parkinsonähnliche Hemmung des Lysosoms erreicht wurde. Diese führte konsekutiv zu einer Erhöhung von  $\alpha$ -Synuclein in Exosomen und zu einer Steigerung  $\alpha$ -Synuclein-Übertragung auf gesunde Zellen.<sup>134</sup> Es ist bereits bekannt, dass eine eingeschränkte Dynein-funktion die autophagozytotische Entsorgung von Proteinen, welche zur Aggregation neigen, deutlich einschränkt. Am Beispiel von Chorea Huntington konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass es nicht nur zu einer Zunahme der Toxizität kommt, sondern auch zu vorzeitigen Proteinablagerungen.<sup>135</sup> Das ist dahingehend interessant, dass wir über definierte Zeitpunkte eine erhöhte Menge an PrP<sup>Sc</sup> in den Muskelin-Ko-Mäusen nachweisen konnten.

Im Rahmen der Prion-Infektion ist die Reaktion des hirneigenen Immunsystems bemerkenswert. In der Iba1-Färbung ist die Anzahl von Mikrogliazellen (MG) nicht nur geringer als in der Kontrollgruppe, sondern auch ihr Aktivierungszustand ist ruhend. Der physiologische Zustand von MG im gesunden Gehirn ist ruhend. Mikrogliazellen, als Makrophagen des Gehirns, tasten in diesem Zustand mit ihren Ausläufern fortwährend ihre Umgebung ab. Bei extrazellulären Reizen, wie beispielsweise Noxen, apoptotische Zellen, LPS oder generell Pathogenen, verändern sie Ihre Morphologie von rund-ruhend zum buschigen aktiveren Phänotyp. Dieser kennzeichnet sich durch kurze, breite Prozesse und ein wütendes Aussehen.<sup>136</sup> Es ist bekannt, dass bei einem Fehlen von MG im Mausmodell es zu einer verstärkten PrP<sup>Sc</sup>-Ablagerung und einer erhöhten Infektiosität kommt.<sup>137</sup> Eine Ausschaltung der gesamten Mikrogliapopulation mit Ganciclovir führt ebenfalls zu einer vermehrten Ablagerung von PrP<sup>Sc</sup> und einer beschleunigten Krankheitsprogression, was auf ein grundsätzlich protektives und vorteilhaftes Verhalten von Mikrogliazellen bei einer Prioninfektion schließen lässt.<sup>138</sup>

Die Muskelin-Ko-Kohorte zeigt trotz einer beschleunigten Krankheitsprogression eine normale MG-Population. Dies ergänzt die Ergebnisse der allgemein reduzierten Spongiose, wobei bis heute nicht erweisen ist, woher das schwammartig anmutende Bild entsteht. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Entdeckung, dass Mikrogliazellen protektive wie auch adverse Eigenschaften präsentieren können. M2-Mikrogliazellen beispielsweise reduzieren A $\beta$ -Plaques bei IL-1 $\beta$ -abhängiger Neuroinflammation.<sup>139</sup> Ein Wechsel vom protektiven, phagozytotischen M2 in den neurotoxischen, pro-inflammatorischen M1-Phänotyp stellt eine mögliche Erklärung für die diskutierte Janusköpfigkeit von MG-Zellen bei neurodegenerativen Erkrankungen dar.<sup>140,141</sup> So kann bei einer Prionerkrankung ein Wechsel in den M1-Phänotyp postuliert werden, welcher dann zu einer verstärkten Neurodegeneration führt.<sup>142</sup> Astrozyten können ebenfalls in zwei Subpopulationen unterschieden werden, welche an die Nomenklatur der MG-Zellen angelegt wurde. Aktuell entdeckte A1-Astrozyten haben negative Eigenschaften und sind bei ZNS-Traumata und bei verschiedensten neurodegenerativen Erkrankungen sowie Proteinopathien hoch exprimiert.<sup>143</sup> Der A1-Subtyp wird insbesondere von klassisch aktivierten Mikrogliazellen induziert. Folglich ist ein Mausmodell defizient an Mikrogliazellen wahrscheinlich nicht in der Lage die A1-Astrozyten zu bilden. Die A1-Astrozyten verlieren zügig die meisten ihrer astrozytotischen Eigenschaften und entwickeln neurotoxische Funktionen, mit welchen sie Neurone aktiv vernichten können. Aktivierte Mikrogliazellen stellen eine notwendige Bedingung für A1-Astrozyten dar.<sup>143</sup> Daher ist davon auszugehen, dass die Mikrogliazellen,

welche bei allen Tieren der Muskelin-Ko-Kohorte im ruhenden Aktivierungsstatus vorlagen, nicht entscheidend zu einem beschleunigtem Versterben beigetragen haben. Möglich ist, das eine verkürzte Phase 2 der Infektion nach Sandberg eine geringere Aktivierung der Mikrogliazellen zur Folge hat. So können eine geringere M1- und A1-Population zu einer geringeren Neurodegeneration geführt haben. Nach aktuellem Forschungsstand ist der A1-Phänotyp nur durch aktivierte Mikroglia ausgelöst.<sup>143</sup> Folglich könnte es sein, dass diese Subspezies in der Muskelin-Ko-Kohorte nicht vorkommt. Überprüfen könnte man dies über eine spezifische Färbung für den jeweiligen Subtyp, um den dominanten Typ in der Prioninfektion nachzuweisen. Aktuell existiert für den M2-Subtyp Arginase 1 als meist versprechender, semi-etabliertes Marker.<sup>141</sup> So könnte eine Ko-Färbung Arginase 1 mit IBA1 etabliert werden, um das Verhältnis von neuroinflammatorischen gegen neuroprotektive Mikrogliazellen auszuzählen. Für die neu beschriebenen, neuroprotektiven A2-Astrozyten ist kein Antikörper verfügbar. Weiter ist es nur mit experimentellen Antikörpern möglich, eingewanderte Monozyten von hirneigenen Mikrogliazellen zu unterscheiden. In der immunologischen Ausnahmesituation, wie einer Prioninfektion, können potentiell periphere Immunzellen in das Gehirn einwandern. Die Differenzierung von diesen morphologisch und immunohistochemisch wenig unterscheidbaren Zellen könnte entscheidend dazu beitragen, die beschleunigte Inkubationszeit bei geringerer Neurodegeneration aufzuklären. Ein *Pathway switch* in die von Sandberg et al. postulierte letale PrP<sup>L</sup>-Subpopulation bietet eine stimmige Erklärung für das beschleunigte Versterben der Tiere. Wie dieser abläuft und auf welche Weise das Signal vermittelt wird, gilt es weiter aufzuklären.

### **Subzellulärer Nachweis von PrP<sup>C</sup> via konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Da bei der MNKL1-Ko-Maus bei gleicher Gesamtmenge PrP<sup>C</sup> vermehrt auf der PM vorliegt, warf sich die Frage auf, wo der Block in der Transportroute des Rezeptors liegt. Daher war ein Ziel dieser Arbeit den Vorgang auf zellulärer und subzellulärer Ebene *in situ* darzustellen. Bei der Suche nach einem Block in den endozytotischen Kompartimenten stellte sich primär das MVB als erfolgversprechend dar, weil es in der initialen Veröffentlichung der Kollegen Heissler et al. als prall gefüllt in der EM zu erkennen war.<sup>117</sup> MVBs oder späte Endosomen, wie auch die PM gelten als mögliche Zellkompartimente in der Konformationsänderung von

PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup>.<sup>144</sup> MVBs sind sehr eng mit der Rezeptorhomöostase der PM assoziiert und maßgeblich an der Bildung von Exosomen beteiligt.<sup>60,144</sup> Darüberhinaus konnte Kolokalisation mit PrP<sup>Sc</sup> für das Lysosom beschrieben werden.<sup>145</sup> So lag der Fokus bei der Suche nach einem endozytotischen Block auch in eben diesen Kompartimenten und es kamen auch andere mit Exosomen assoziierte, endosomale Kompartimente in Frage. Trotz hoch qualitativer Schnittpräparate und subjektiv deutlicher Kolokalisation von PrP<sup>C</sup> und Rab 7 / MVB im Muskelin-Mausmodell konnten die Bilder nicht suffizient quantifiziert werden. Im Vergleich zu Färbungen an WT-Tieren waren rein optisch Unterschiede auszumachen. Trotz dem Einsatz vielfältiger Methoden wie der Markierung von ROIs (*region of interest*) in Rab7 positiven Clustern, *Background*-Subtraktion, oder automatisierten Analyse via Imaris, Image J oder Velocity konnten keine Bilder quantifiziert werden. Ein Hauptgrund für dieses Problem ist sicher der natürlich hohe Hintergrund der Immunfluoreszenz in Färbungen von Geweben, insbesondere des Gehirn, obwohl die Schnitte mit 2µm maximal dünn angefertigt und eine Sudanschwarz-Applikation zur Reduktion Autofluoreszenz durchgeführt wurden. Obwohl die konfokale Mikroskopie die Methode der Wahl zur Untersuchung von intrazellulären Transportvorgängen ist, sind die Anwendungsmöglichkeiten für subzelluläre Strukturen im Größenbereich 200nm in FFPE limitiert.

In allen FFPE-Färbungen konstant ist eine deutlich intensivere Fluoreszenz der PrP<sup>C</sup>-Färbung in den Muskelin-Ko-Hippocampi. Dies spiegelt auch unsere Ergebnisse in Primären Neuronen wider: Eine Umverteilung der PrP<sup>C</sup>-Menge auf die Plasmamembran, bei gleicher PrP<sup>C</sup> Gesamtmenge.<sup>146</sup> Der intensivste Bereich ist, wie aufgrund der Muskelin- und PrP<sup>C</sup>-Verteilung zu vermuten war, der Hippocampus. Die Rab 7 positive MVB Muskelin-Ko-Färbung ist in der Überlagerung mit PrP<sup>C</sup> im Vergleich zum WT deutlich intensiver. So lässt sich hier eine Akkumulation von PrP<sup>C</sup> in den MVBs bei einer adulten Maus beschreiben. Erwähnenswert ist hier, dass der verwendete Rab 7-Antikörper nicht zwischen sekretorischen und degradativen MVB unterscheidet und es ebenfalls eine Kreuzreaktivität für das saure Lysosom besteht. Im Muskelin-Ko-Gewebe zeigen Rab 11 positive Recyclingendosomen subjektiv eine stärker konzentrierte zytoplasmatische Anreicherung von PrP<sup>C</sup> mit Überlagerung der Signale. Die Vermutung liegt nahe, dass durch den vermehrten Einbau von PrP<sup>C</sup> in die PM das Recyclingendosomen durch die Nähe und den fortwährenden Austausch mit der PM mehr PrP<sup>C</sup> enthält als die Wildtypkontrolle. Frühe endosomale Kompartimente (Rab 4 +) sind vereinzelt in Kolokalisation mit PrP<sup>C</sup> zu erkennen. Das MVB (Rab 7 +) und das langsame Recyclingendosom (Rab 11 +) stellen in FFPE bei der adulten Muskelin-Ko-

Maus Kompartimente der vermehrte PrP<sup>C</sup> - Deposition da. Um eine höhere Auflösung zu erreichen, bedarf es einer anderen Methode, wie beispielsweise der höher auflösenden STED-Mikroskopie, freischwimmende Schnitte oder die Expansion- Mikroskopie, welche das Gewebe in ein sich expandierenden Gel einbettet und die Strukturen maßstabsgerecht aufquellen lässt. <sup>147</sup> Nach den initialen Ergebnissen in den FFPE Gewebe-Schnitten führten Heisler et al. endosomale Färbungen auf primären Neuronen mit konfokaler Mikroskopie durch. Dort konnte man zeigen, dass in Div 7 Primären Neuronen Rab 5 sehr stark, Rab 4 stark und Rab 7 mit PrP<sup>C</sup> kolokalisiert. <sup>146</sup> In Zellkultur konnte von uns später gezeigt werden, dass PrP<sup>C</sup> durch den MNKL1- Knockout nicht mehr suffizient in das Lamp1-positive Lysosom transportiert wird. <sup>146</sup> Das Rab 11 positive Recyclingendosom der Muskelin-Ko-Kohorte stellt sich *in vitro* konträr zu den FFPE-Schnitten als unbeeinträchtigt durch die den Knockout da. Möglich ist, dass *in vitro* auf vielfältige Kompensationsmechanismen zurückgegriffen werden kann, welche in der primären neuronalen Zellkultur nicht abgebildet werden.

### **Muskelin-Ko-Exosomen enthalten mehr PrP<sup>C</sup>**

Es ist bereits seit längerem bekannt, dass Exosomen nicht nur PrP<sup>C</sup> enthalten, sondern auch an einer Ausbreitung der infektiösen Proteine beteiligt sein können. <sup>107</sup> Exosomen sind neben Zell-Zell-Kontakten, Nanotubes und proteolytischem *shedding* an der Ausbreitung von Prion von einer Zelle in die anderen beteiligt. Die physiologische wie die fehlgefaltet PrP-Variante können in Exosomen verpackt und effizient verteilt werden. <sup>60,148,149</sup> Es liegt nahe, dass PrP<sup>C</sup> bei einer Beeinträchtigung in der Membranhomöostase in allen anderen verfügbaren endosomalen Kompartimenten gelagert wird, um dem potentiell schädlichen Einfluss von einer Fehlbeladung der PM mit PrP<sup>C</sup> zu entkommen. Da das MVB nicht nur als ein potentielles Kompartiment bei der Konversion von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> gilt <sup>144</sup>, sondern auch maßgeblich an der exosomalen Formation beteiligt ist <sup>150</sup>, war eine Hypothese dieser Arbeit, dass nach Knockout von Muskelin vermehrt Exosomen freigesetzt werden und diese gegebenenfalls in ihrer Größe und Menge oder Beladung verändert sind.

Die mittlere Größe der Exosomen von primären Neuronen von MNKL1-Ko-Tieren war mit 136nm etwas größer als die der Kontrolltiere mit 129 nm, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen. In der Anzahl der Exosomen konnte ebenfalls kein Unterschied

ausgemacht werden. Beispielsweise kommt es bei einer vollständigen Blockade des lysosomalen Degradationsweges in N2A-Zellen zu einer Größen- und Mengenzunahme von Exosomen.<sup>125</sup> Es existieren zur Zeit keine genügenden Daten zur Größe bzw. Menge von Exosomen auf primären Neuronen von TGA 20-Mäusen, welche generell eine erhöhte Menge an PrP<sup>C</sup> exprimieren. In unserem Modell kann daher nicht sicher unterschieden werden, ob die erhöhte Menge von PrP<sup>C</sup> auf der PM zu der bei uns beobachteten Vergrößerung geführt hat oder die durch den Muskelin-Knockout ausgelöste dyneinabhängige Blockade in der Rezeptorinternalisierung. Da Exosomen unter Verwendung der Plasmamembran und der enthaltenen Rezeptoren durch Einwärtsknospung entstehen, kann man postulieren, dass mehr PrP<sup>C</sup> auf der PM automatisch zu mehr exosomalem PrP<sup>C</sup> führen könnte. Dagegen spricht jedoch die Differenz von 1,82x erhöhtem PrP<sup>C</sup> auf der PM im Vergleich zu 1,55x mehr PrP<sup>C</sup> auf den Exosomen. Um diese These zu entkräften sollten perspektivisch primäre neuronale Exosomen von PrP<sup>C</sup> überexprimierenden Tieren, wie TGA 20 oder ADAM10-Ko-PN, weitergehend untersucht werden.

Interessanterweise bleiben die WT-Exosomen in der ersten Ernte im Vergleich zur zweiten in ihrer Größe konstant, wohingegen die Muskelin-Ko-Exosomen einen hoch signifikanten Größenverlust von 136 nm auf 109 nm präsentieren. Da der Muskelinknockout neben der Umverteilung von GABA<sub>A</sub> und PrP<sup>C</sup> auf der PM weitere Veränderungen, wie das Verblässen der dunklen Fellfarbe nach sich zieht, kann angenommen werden, dass noch weitere bisher nicht geklärte Aberrationen im Zusammenspiel mit dem Fehlen von Muskelin stattgefunden haben können. Die Unfähigkeit der muskelindefizienten primären Neurone ausgewählte Proteine in Richtung Lysosom zu transportieren, bedeutet, dass Teile des essentiellen Degradations- und Recyclingsystems nicht korrekt funktionieren. So ist eine Überlastung der endosomalen Kompartimente denkbar, welche zu einer Beeinträchtigung der exosomalen Produktion und somit zu einer Verkleinerung der Exosomen geführt hat. Dies passt weiter zu der Beobachtung, dass die Anzahl der Exosomen muskelindefizienter PN von der 1. zur 2. Ernte stark signifikant abnimmt, obwohl die Kontrolle keine Signifikanz aufweist.

Die Untersuchungen der ersten (Div 9) und zweiten Exosomen-Ernte (Div 12) von primären Neuronen von WT-Kontroll-Tieren gegen Muskelin-Ko, konnten keine signifikanten Mengen- oder Größenunterschiede feststellen. Daher wurden in einem weiteren Experiment via Westernblot die Beladung der Exosomen untersucht und die PrP<sup>C</sup>-Mengen in der gleichen Anzahl von Exosomen miteinander verglichen. Hier zeigte sich, eine 55 % ( $\pm 0.08$ ; \*\* p=0,0084; n=3) erhöhte exosomale PrP<sup>C</sup> Menge im Vergleich mit der WT-Kontrolle als Schwellenwert für 1 gesetzt. So führt das Fehlen von Muskelin zu einer Steigerung der PrP<sup>C</sup>-Menge in Exosomen.

Da PrP<sup>Sc</sup> wie bei vielen anderen Proteinopathien ebenfalls in Exosomen verpackt werden kann, führt die höhere Beladung an PrP<sup>C</sup> möglicherweise *in vivo* dazu die Verteilung von PrP<sup>Sc</sup> im Gehirn der Ko-Tiere maßgeblich zu beschleunigen. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass eine Monesin-induzierte, Stimulation der Exosomenproduktion zu einer beschleunigten interzellulären Transmission von Prion führt.<sup>151</sup> Diese Arbeit zeigt erstmals, dass eine höhere exosomale PrP<sup>C</sup>-Beladung *in vivo* zu einer beschleunigten Transmission von Prionen geführt haben könnte. Dieser Zusammenhang *in vivo* stützt die These, dass Exosomen nicht nur PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> tragen, sondern auch maßgeblich an der Verbreitung der Infektion beteiligt sind.<sup>60,146,152,153</sup> Muskelin-Ko-Tiere, welche eine erhöhte Menge an PrP<sup>C</sup> in Exosomen zeigen, haben bei einer Prioninfektion eine verkürzte Inkubationszeit.<sup>146</sup> Weiter kann eine vereinfachte Verteilung von PrP<sup>Sc</sup> via Exosomen zu einer Verkürzung der PrP<sup>C</sup>-Mengen unabhängigen ersten Phase nach Sandberg et al. der Prioninfektion geführt haben. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass neben der Erhöhung der Plasmamembran-PrP<sup>C</sup>-Menge die exosomale Beladung eine relevante Rolle spielen könnte. Diese beiden beobachteten Effekte sind in unserem Tiermodell nicht klar zu trennen, daher kann auch nicht klar Definiert werden, welcher der beiden letztendlich zu der verkürzten Inkubationszeit bei Muskelin-Ko-Tieren geführt hat.

## Ergänzende Daten

Neben den häufig untersuchten Regionen, wie beispielsweise Hippocampus oder Cortex, wurden weitere Regionen untersucht. Die auf den ersten Blick obskure Wahl von *Superior olivari complex* (SOC oder Nucleus olivaris superior) und Colliculus inferior rührte daher, dass diese in der Mikroskopie durch einen scheinbar intensiveren Befall aufgefallen sind. Dies passte zu der Beobachtung, dass manche Patienten über akustische Halluzinationen im Rahmen einer CJD berichten.<sup>154</sup> In der Statistik konnten diese Teile der Hörbahn hinsichtlich histologischem Befall jedoch nicht als signifikant identifiziert werden. Die weiteren Regionen wie Hirnstamm (HS), Subiculum (Sub), Cerebellum (Cb), Hirnstamm - Pons (Hs PG; pontines Grau) und die Molekularzellschicht im Cerebellum stellten sich in einer ersten Durchsicht der Präparate als auffällig dar. Um dieser Beobachtung Evidenz zu verleihen, wurden sie Teil der Statistik. Hier ist lediglich zu erwähnen, dass sich weniger Mikrogliazellen im SOC, Hirnstamm und Pons befanden als in den gleichen Bereichen, in denen die spongiformen Veränderungen signifikant geringer sind, ausgenommen dem Pons. Dies fügt sich der Interpretation der in Hauptteil gezeigte Ergebnisse an: Die Ko-Tiere zeigen wenig Mikrogliazellen in der Region und wenig spongiforme Veränderung. Außer in der CA1-Region sind die Astrozyten in allen beiden Kohorten gleich häufig in den Regionen vertreten. Für die Saf84-Färbung besteht über die gesamten Untersuchten Hirnregionen keine Signifikanz.



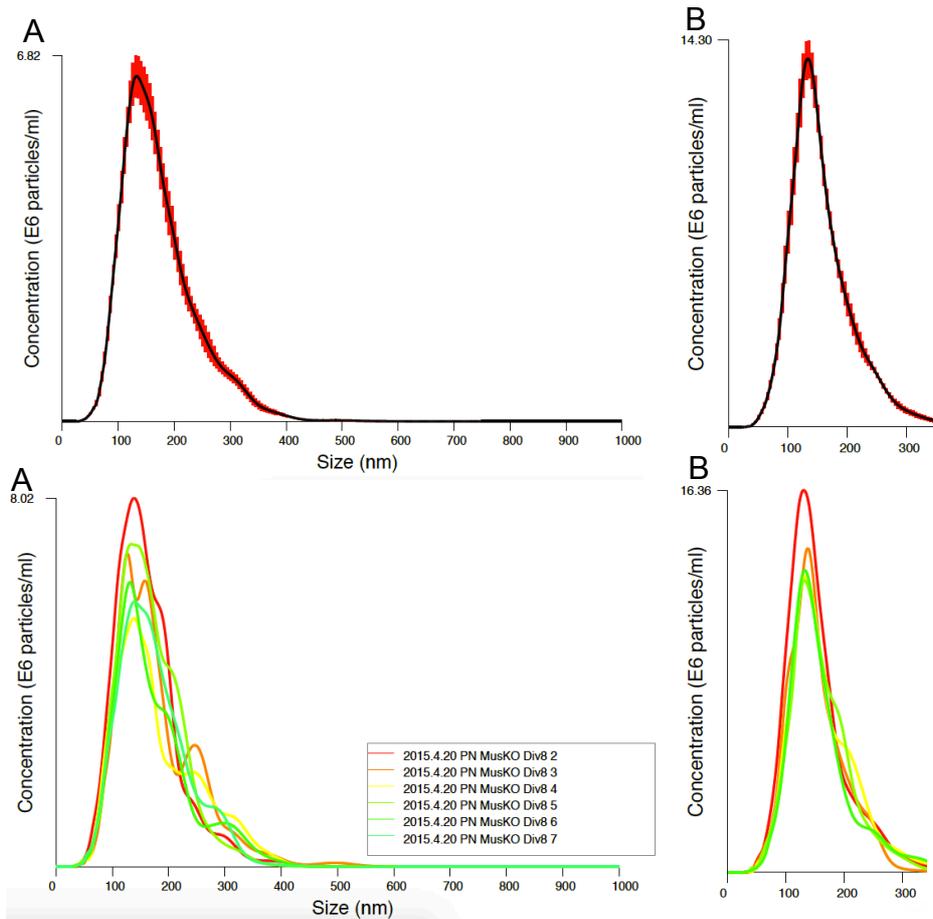


Abb. 27.: **A** Exemplarisch eine Nanosight-Messung von Muskelin-Ko PN Exosomen, noch nicht auf die jeweilige Verdünnung angepasst. Interessant ist hier, dass selbst nach dem Vortexen und Aufziehen der Exosomen in die Spritze die Größe über die Zeit minimal zunahm. In diesem Fall ist von beginnender Aggregation der Exosomen auszugehen. PrP<sup>C</sup> verfügt über ein sogenanntes *sticky end* am N-terminus und kann so Der hohe PrP<sup>C</sup>-Gehalt der Exosomen erklärt diese Beobachtung. **B** Diese Beobachtung trat in den Testversuchen mit N2A-Zellen, welche ein normales PrP<sup>C</sup> Niveau aufweisen, kaum auf.

## Verzeichnisse

### Abkürzungsverzeichnis

---

ADAM10	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein</i>
Ak	Antikörper
APCs	<i>Antigen presenting cell</i> / Antigenpräsentierende Zelle
APOE	Apolipoprotein E
AR	<i>antigen retrieval</i>
AS	Aminosäure
Blot	Westernblot
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
Cb	Cerebellum
CJD	Creutzfeldt-Jakob disease / Erkrankung
Collinf	Colliculi inferiores - Teil der Hörbahn
d	d = Tage (engl., days)
DIV	<i>Diversion</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ESCRT	endosomal sorting complexes required for transport
EVs	Extracellular vesicles
FFI	Fatale Familiäre Insomnie
FFPE	Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe (engl., formalin-fixed paraffin-embedded tissue)
GABA <sub>A</sub>	<i>Gamma-aminobutyric acid</i> / $\gamma$ -Aminobuttersäure
GALT	Darm assoziiertes Lymphatisches Gewebe / <i>gut associated lymphatic tissue</i>
GnRH	Gonadotropin releasing Hormone
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
GS / GL	Granularzellschicht / <i>granular layer</i>
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSP	Hitze Schock Protein
i.c.	intrazerebral
i.p.	intraperitoneal

---

---

kDa	Kilodalton
Ko	Knockout
MG	Mikroglia
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex / <i>major histocompatibility complex</i>
miRNA	Mikro RNA
MNLK-1	Name des für Muskelin kodierenden Gens
Musk	Muskelin
Muskelin-Ko	Muskelindefizient
n.s.	Nicht signifikant
nm	Nanometer
NMDA – Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
PG	Pontines Grau (engl., pontine grey)
PM	Plasmamembran
PRNP	<b>PRioN Protein</b>
PS / PL	Pyramidenzellschicht / <i>pyramidal layer</i>
RML	Rocky Mountain Laboratory Prion Stamm
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Selektiv markierte Bereiche für Bildanalyse / <i>region of Interest</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
sCJD	Sporadische CJD
SFI	Spontane Fatale Insomnie
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNARES	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SOC	<i>Superior olivary complex</i> (Teil aufsteigenden Hörbahn) Nucleus olivaris
SOD1	Superoxide Dismutase [Cu-Zn]
STED	<i>stimulated emission depletion</i>
Sub	Subiculum
TDP-43	Transactive response DNA binding protein 43 kDa
TFR	Transferrinrezeptor
TSE	Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien

---

TSP-1	Thrombospondin-1
vCJD	variante Creutzfeldt-Jakob disease
wt	Weißer Substanz / <i>white matter</i>
WT	Wild typ
ZNS	Zentrales Nervensystem
µm	Mikrometer

## Literaturverzeichnis

1. Johann Wolfgang von Goethe. Faust - Der Tragödie erster Teil – Wikisource. (1808). at <[https://de.wikisource.org/wiki/Faust\\_-\\_Der\\_Tragödie\\_erster\\_Teil](https://de.wikisource.org/wiki/Faust_-_Der_Tragödie_erster_Teil)>
2. Zerr, I. Leitlinie CJD Deutschen Gesellschaft für Neurologie. at <[http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030-042l\\_S1\\_Creutzfeldt-Jakob-Krankheit\\_2012\\_1.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-042l_S1_Creutzfeldt-Jakob-Krankheit_2012_1.pdf)>
3. Leopoldt JG. *Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der LandWirthschaft. Volume 5, Johann Gottlieb Rothen, Sorau.* (1750).
4. Schneider, K., Fangerau, H., Michaelsen, B. & Raab, W. H. M. The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. *Brain Res. Bull.* **77**, 343–355 (2008).
5. Wen-Quan Zou & Pierluigi Gambetti. *Prions and Disease Vol II.* (2013).
6. Katscher, F. It's Jakob's disease, not Creutzfeldt's. *Nature* **393**, 11–11 (1998).
7. Brown, P. The decline and fall of Creutzfeldt-Jakob disease associated with human growth hormone therapy. *Neurology* **38**, 1135–7 (1988).
8. Bernoulli, C. DANGER OF ACCIDENTAL PERSON-TO-PERSON TRANSMISSION OF CREUTZFELDT-JAKOB DISEASE BY SURGERY. *The Lancet* **309**, 659 (1977).
9. Dietz, K. *et al.* Blood transfusion and spread of variant Creutzfeldt-Jakob Disease. *Emerg. Infect. Dis.* **13**, 89–96 (2007).
10. Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P. & Chen, S. G. Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br. Med. Bull.* **66**, 213–39 (2003).
11. Montagna, P., Gambetti, P., Cortelli, P. & Lugaresi, E. Familial and sporadic fatal insomnia. *Lancet. Neurol.* **2**, 167–76 (2003).
12. Mastrianni, J. A. *Genetic Prion Diseases. GeneReviews(®)* (University of Washington, Seattle, 1993). at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301407>>
13. Scott, M. R. *et al.* Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 15137–42 (1999).
14. Britton, T. C., Al-Sarraj, S., Shaw, C., Campbell, T. & Collinge, J. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 16-year-old in the UK. *The Lancet* (1995). doi:10.1016/S0140-6736(95)91827-2

15. Scott, M. R. *et al.* Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. (1999).
16. Brown, P., Will, R. G., Bradley, R., Asher, D. M. & Detwiler, L. Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 6–16
17. vCJD cases Worldwide (at 28 May 2015) <http://www.eurocjd.ed.ac.uk/>.
18. Mok, T. *et al.* Variant Creutzfeldt–Jakob Disease in a Patient with Heterozygosity at PRNP Codon 129. *N. Engl. J. Med.* **376**, 292–294 (2017).
19. Collinge, J. *et al.* Kuru in the 21st century—an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet* **367**, 2068–2074 (2006).
20. Collinge, J. *et al.* Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370**, 295–297 (1994).
21. Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T. & Collinge, J. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. *Nature* **352**, 340–342 (1991).
22. Gajdusek, D. C. & Zigas, V. Degenerative Disease of the Central Nervous System in New Guinea. *N. Engl. J. Med.* **257**, 974–978 (1957).
23. GAJDUSEK, D. C., GIBBS, C. J. & ALPERS, M. Experimental Transmission of a Kuru-like Syndrome to Chimpanzees. *Nature* **209**, 794–796 (1966).
24. Mead, S. *et al.* A Novel Protective Prion Protein Variant that Colocalizes with Kuru Exposure. *N Engl J Med* **21361**, 2056–65 (2009).
25. Bendheim, P. E. *et al.* Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* **42**, 149–156 (1992).
26. Schatzl, H. M., Dacosta, M., Taylor, L., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* **245**, 362–374 (1995).
27. Tobler, I. *et al.* Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**, 639–642 (1996).
28. McLennan, N. F. *et al.* Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am. J. Pathol.* **165**, 227–235 (2004).
29. Kanaani, J., Prusiner, S. B., Diacovo, J., Baekkeskov, S. & Legname, G. Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons in vitro. *J. Neurochem.* **95**, 1373–1386 (2005).
30. Bremer, J. *et al.* Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat. Neurosci.* **13**, 310–318 (2010).
31. Büeler, H. *et al.* Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**, 577–582 (1992).
32. Coitinho, A. S., Roesler, R., Martins, V. R., Brentani, R. R. & Izquierdo, I. Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age. *Neuroreport* **14**, 1375–9 (2003).
33. Harris, D. A. Cellular biology of prion diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**, 429–44 (1999).
34. Altmeppen, H. C. *et al.* The sheddase ADAM10 is a potent modulator of prion disease. *Elife* **4**, (2015).
35. Glatzel, M. *et al.* Shedding light on prion disease. 244–256 (2015). doi:10.1080/19336896.2015.1065371
36. Pan, K. M. *et al.* Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 10962–6 (1993).

37. Millhauser, G. L. Copper Binding in the Prion Protein. *Acc. Chem. Res.* **37**, 79–85 (2004).
38. Cordeiro, Y. *et al.* DNA converts cellular prion protein into the beta-sheet conformation and inhibits prion peptide aggregation. *J. Biol. Chem.* **276**, 49400–9 (2001).
39. Gabus, C. *et al.* The prion protein has RNA binding and chaperoning properties characteristic of nucleocapsid protein NCP7 of HIV-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 19301–9 (2001).
40. Linden, R. *et al.* Physiology of the prion protein. *Physiol. Rev.* **88**, 673–728 (2008).
41. Laurén, J., Gimbel, D. A., Nygaard, H. B., Gilbert, J. W. & Strittmatter, S. M. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature* **457**, 1128–32 (2009).
42. Béland, M. & Roucou, X. The prion protein unstructured N-terminal region is a broad-spectrum molecular sensor with diverse and contrasting potential functions. *J. Neurochem.* **120**, 853–68 (2012).
43. Pastore, A. A Structural Overview of the Vertebrate Prion Proteins. 185–197 (2007).
44. Riek, R. *et al.* NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* **382**, 180–2 (1996).
45. Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. & Wüthrich, K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* **413**, 282–8 (1997).
46. Hagiwara, K., Hara, H. & Hanada, K. Species-barrier phenomenon in prion transmissibility from a viewpoint of protein science. *J. Biochem.* **153**, 139–145 (2013).
47. McKinley, M. P., Bolton, D. C. & Prusiner, S. B. A protease-resistant protein is a structural component of the Scrapie prion. *Cell* **35**, 57–62 (1983).
48. Caughey, B. & Raymond, G. J. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* **266**, 18217–23 (1991).
49. Kocisko, D. *et al.* Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**, 471–474 (1994).
50. Silveira, J. R. *et al.* The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**, 257–61 (2005).
51. Heppner, F. L. Prevention of Scrapie Pathogenesis by Transgenic Expression of Anti-Prion Protein Antibodies. *Science (80-. )*. **294**, 178–182 (2001).
52. Borchelt, D. R., Taraboulos, A. & Prusiner, S. B. Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **267**, 16188–99 (1992).
53. Théry, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 569–579 (2002).
54. Stoorvogel, W., Kleijmeer, M. J., Geuze, H. J. & Raposo, G. The Biogenesis and Functions of Exosomes. *Traffic* **3**, 321–330 (2002).
55. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology* **200**, 373–383 (2013).
56. Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur. J. Cell Biol.* **35**, 256–63 (1984).
57. Conde-Vancells, J. *et al.* Characterization and comprehensive proteome profiling of exosomes secreted by hepatocytes. *J. Proteome Res.* **7**, 5157–5166 (2008).

58. Caby, M.-P., Lankar, D., Vincendeau-Scherrer, C., Raposo, G. & Bonnerot, C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int. Immunol.* **17**, 879–887 (2005).
59. Ronquist, G. & Brody, I. The prostasome: Its secretion and function in man. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **822**, 203–218 (1985).
60. Vella, L. J. *et al.* Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing. *J. Pathol.* **211**, 582–590 (2007).
61. Fauré, J. *et al.* Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol. Cell. Neurosci.* **31**, 642–648 (2006).
62. Février, B., Vilette, D., Laude, H. & Raposo, G. Exosomes: A bubble ride for prions? *Traffic* **6**, 10–17 (2005).
63. Février, B. & Raposo, G. Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 415–421 (2004).
64. Gupta, A. & Pulliam, L. Exosomes as mediators of neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation* **11**, 68 (2014).
65. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr. Protoc. Cell Biol.* **Chapter 3**, Unit 3.22 (2006).
66. Mears, R. *et al.* Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 4019–31 (2004).
67. Bellingham, S. a., Coleman, B. M. & Hill, A. F. Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10937–10949 (2012).
68. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–9 (2007).
69. Taylor, D. D. & Gercel-Taylor, C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **110**, 13–21 (2008).
70. Vlassov, A. V., Magdaleno, S., Setterquist, R. & Conrad, R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820**, 940–948 (2012).
71. Ha, D., Yang, N., Nadithe, V. & Pharmaceutica Sinica, A. B. Exosomes as therapeutic drug carriers and delivery vehicles across biological membranes: current perspectives and future challenges. *Acta Pharm. Sin. B* **6**, 287–296 (2016).
72. Bellingham, S. A., Guo, B. B., Coleman, B. M. & Hill, A. F. Exosomes: Vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? *Front. Physiol.* **3 MAY**, 124 (2012).
73. Hirsch, J. G., Fedorko, M. E. & Cohn, Z. a. Vesicle fusion and formation at the surface of pinocytotic vacuoles in macrophages. *J. Cell Biol.* **38**, 629–632 (1968).
74. Haigler, H. T., McKanna, J. a & Cohen, S. Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *J. Cell Biol.* **81**, 382–395 (1979).
75. Hicke, L. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 195–201 (2001).
76. Gassart, A. De, Ge, C. & Fe, B. Lipid raft – associated protein sorting in exosomes. *Proteins* **102**, 4336–4344 (2003).
77. Gruenberg, J. & Maxfield, F. R. Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 552–563 (1995).
78. Stoorvogel, W., Strous, G. J., Geuze, H. J., Oorschot, V. & Schwartz, a. L. Late

- endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell* **65**, 417–427 (1991).
79. van Deurs, B., Holm, P. K., Kayser, L., Sandvig, K. & Hansen, S. H. Multivesicular bodies in HEp-2 cells are maturing endosomes. *Eur. J. Cell Biol.* **61**, 208–24 (1993).
  80. Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J. & Caplan, S. The early endosome: A busy sorting station for proteins at the crossroads. *Histol. Histopathol.* **25**, 99–112 (2010).
  81. Nazarenko, I. *et al.* Cell surface tetraspanin Tspan8 contributes to molecular pathways of exosome-induced endothelial cell activation. *Cancer Res.* **70**, 1668–78 (2010).
  82. Trajkovic, K. *et al.* Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science* **319**, 1244–1247 (2008).
  83. Falguières, T. *et al.* In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4942–55 (2008).
  84. Kleijmeer, M. *et al.* Reorganization of multivesicular bodies regulates MHC class II 11 antigen presentation by dendritic cells. *J. Cell Biol.* **155**, 53–63 (2001).
  85. Ceresa, B. P. & Schmid, S. L. Regulation of signal transduction by endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 204–10 (2000).
  86. Mayor, S., Presley, J. F. & Maxfield, F. R. Sorting of membrane components from endosomes and subsequent recycling to the cell surface occurs by a bulk flow process. *J. Cell Biol.* **121**, 1257–1269 (1993).
  87. Futter, C. E., Pearse, A., Hewlett, L. J. & Hopkins, C. R. Multivesicular endosomes containing internalized EGF-EGF receptor complexes mature and then fuse directly with lysosomes. *J. Cell Biol.* **132**, 1011–1023 (1996).
  88. Mullock, B. M., Bright, N. a., Fearon, C. W., Gray, S. R. & Luzio, J. P. Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid organelle of intermediate density and is NSF dependent. *J. Cell Biol.* **140**, 591–601 (1998).
  89. Pan, B. T. & Johnstone, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. *Cell* **33**, 967–978 (1983).
  90. Johnstone, R. M., Bianchini, A. & Teng, K. Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions. *Blood* **74**, 1844–1851 (1989).
  91. Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J. Cell Biol.* **97**, 329–339 (1983).
  92. Cai, H., Reinisch, K. & Ferro-Novick, S. Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle. *Dev. Cell* **12**, 671–682 (2007).
  93. Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T. & Colombo, M. I. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* **6**, 131–43 (2005).
  94. Stenmark, H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 513–525 (2009).
  95. Zheng, Y., Campbell, E. C., Lucocq, J., Riches, A. & Powis, S. J. Monitoring the Rab27 associated exosome pathway using nanoparticle tracking analysis. *Exp. Cell Res.* **319**, 1706–13 (2013).
  96. Hsu, C. *et al.* Regulation of exosome secretion by Rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *J. Cell Biol.* **189**, 223–32 (2010).
  97. Heijnen, H. F., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J. & Sixma, J. J. Activated platelets

- release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. *Blood* **94**, 3791–9 (1999).
98. Obregon, C., Rothen-Rutishauser, B., Gitahi, S. K., Gehr, P. & Nicod, L. P. Exovesicles from human activated dendritic cells fuse with resting dendritic cells, allowing them to present alloantigens. *Am. J. Pathol.* **169**, 2127–2136 (2006).
  99. Arenaccio, C. *et al.* Exosomes from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-infected cells license quiescent CD4+ T lymphocytes to replicate HIV-1 through a Nef- and ADAM17-dependent mechanism. *J. Virol.* **88**, 11529–39 (2014).
  100. Bakhti, M., Winter, C. & Simons, M. Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *J. Biol. Chem.* **286**, 787–96 (2011).
  101. Frühbeis, C. *et al.* Neurotransmitter-Triggered Transfer of Exosomes Mediates Oligodendrocyte-Neuron Communication. *PLoS Biol.* **11**, (2013).
  102. Fröhlich, D. *et al.* Multifaceted effects of oligodendroglial exosomes on neurons : impact on neuronal firing rate , signal transduction and gene regulation. *Philos.trans.r.soc.l. B Biol.Sci.* **369**, 20130510 (2014).
  103. Wang, S. *et al.* Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *J. Neurosci.* **31**, 7275–7290 (2011).
  104. Antonucci, F. *et al.* Microvesicles released from microglia stimulate synaptic activity via enhanced sphingolipid metabolism. *Embo J* **31**, 1231–1240 (2012).
  105. Tytell, M. Release of heat shock proteins (Hsps) and the effects of extracellular Hsps on neural cells and tissues. *Int. J. Hyperthermia* **21**, 445–455 (2005).
  106. Basso, M. & Bonetto, V. Extracellular vesicles and a novel form of communication in the brain. *Front. Neurosci.* **10**, 1–13 (2016).
  107. Fevrier, B. *et al.* Cells release prions in association with exosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9683–8 (2004).
  108. Masters, C. L. *et al.* Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 4245–9 (1985).
  109. Rajendran, L. *et al.* Alzheimer ' s disease <sub>NL</sub> -amyloid peptides are released in association with exosomes. (2006).
  110. Wang, G. *et al.* Astrocytes secrete exosomes enriched with proapoptotic ceramide and Prostate Apoptosis Response 4 (PAR-4): Potential mechanism of apoptosis induction in Alzheimer Disease (AD). *J. Biol. Chem.* **287**, 21384–21395 (2012).
  111. Emmanouilidou, E. *et al.* Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J. Neurosci.* **30**, 6838–51 (2010).
  112. Saman, S. *et al.* Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **287**, 3842–3849 (2012).
  113. Marimpietri, D. *et al.* Proteome Profiling of Neuroblastoma-Derived Exosomes Reveal the Expression of Proteins Potentially Involved in Tumor Progression. *PLoS One* **8**, (2013).
  114. Basso, M. *et al.* Mutant copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) induces protein secretion pathway alterations and exosome release in astrocytes: Implications for disease spreading and motor neuron pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **288**, 15699–15711 (2013).

115. Ding, X. *et al.* Exposure to ALS-FTD-CSF generates TDP-43 aggregates in glioblastoma cells through exosomes and TNTs-like structure. *Oncotarget* **6**, 24178–24191 (2015).
116. Asai, H. *et al.* Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat. Publ. Gr.* **18**, 1584–1593 (2015).
117. Heisler, F. F. *et al.* Muskelin regulates actin filament- and microtubule-based GABA(A) receptor transport in neurons. *Neuron* **70**, 66–81 (2011).
118. Dhodda, V. K., Sailor, K. a, Bowen, K. K. & Vemuganti, R. Putative endogenous mediators of preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain identified by genomic and proteomic analysis. *J. Neurochem.* **89**, 73–89 (2004).
119. Weise, J. *et al.* Upregulation of cellular prion protein (PrP c) after focal cerebral ischemia and influence of lesion severity. *Neurosci. Lett.* **372**, 146–150 (2004).
120. Nassan, M. *et al.* A genome wide association study suggests the association of muskelin with early onset bipolar disorder: Implications for a GABAergic epileptogenic neurogenesis model. *J. Affect. Disord.* **208**, 120–129 (2017).
121. CHANDLER, R. L. Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet (London, England)* **1**, 1378–9 (1961).
122. Graeber, M. B. *Changing Face of Microglia*. at <<http://science.sciencemag.org/>>
123. Ransom, B., Behar, T. & Nedergaard, M. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends in Neurosciences* (2003). doi:10.1016/j.tins.2003.08.006
124. Tagnaouti, N. *et al.* Neuronal expression of muskelin in the rodent central nervous system. *BMC Neurosci.* **8**, 28 (2007).
125. Heisler, F. F. *et al.* Muskelin Coordinates PrPC Lysosome versus Exosome Targeting and Impacts Prion Disease Progression. *Neuron* (2018). doi:10.1016/j.neuron.2018.08.010
126. Fischer, M. *et al.* Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* **15**, 1255–64 (1996).
127. Ford, M. J., Burton, L. J., Morris, R. J. & Hall, S. M. Selective expression of prion protein in peripheral tissues of the adult mouse. *Neuroscience* **113**, 177–192 (2002).
128. Neuroscience, B. *et al.* Neuronal expression of muskelin in the rodent central nervous system. *BMC Neurosci.* **8**, (2007).
129. Mabbott, N. A. & MacPherson, G. G. Prions and their lethal journey to the brain. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 201–211 (2006).
130. McBride, P. A. *et al.* 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**, 9320–7 (2001).
131. Sandberg, M. K., Al-Doujaily, H., Sharps, B., Clarke, A. R. & Collinge, J. Prion propagation and toxicity in vivo occur in two distinct mechanistic phases. *Nature* **470**, (2011).
132. Sandberg, M. K. *et al.* Prion neuropathology follows the accumulation of alternate prion protein isoforms after infective titre has peaked. *Nat. Commun.* **5**, 4347 (2014).
133. Altmeppen, H. C. *et al.* Lack of a-disintegrin-and-metalloproteinase ADAM10 leads to intracellular accumulation and loss of shedding of the cellular prion protein in vivo. doi:10.1186/1750-1326-6-36
134. Alvarez-erviti, L. *et al.* Neurobiology of Disease Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol. Dis.* **42**, 360–367 (2011).

135. Ravikumar, B. *et al.* Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat. Genet.* **37**, 771–776 (2005).
136. Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P. & Gordon, S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* **39**, 151–70 (1990).
137. Kranich, J. *et al.* Engulfment of cerebral apoptotic bodies controls the course of prion disease in a mouse strain-dependent manner. *J. Exp. Med.* **207**, 2271–2281 (2010).
138. Zhu, C. *et al.* A neuroprotective role for microglia in prion diseases. *J. Exp. Med.* **213**, jem.20151000 (2016).
139. Cherry, J. D., Olschowka, J. A. & O'Banion, M. K. Arginase 1+ microglia reduce A $\beta$  plaque deposition during IL-1 $\beta$ -dependent neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* **12**, 203 (2015).
140. Kigerl, K. A. *et al.* Identification of Two Distinct Macrophage Subsets with Divergent Effects Causing either Neurotoxicity or Regeneration in the Injured Mouse Spinal Cord. *J. Neurosci.* **29**, (2009).
141. Cherry, J. D. *et al.* Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *J. Neuroinflammation* **11**, 98 (2014).
142. Aguzzi, A., Nuvolone, M. & Zhu, C. The immunobiology of prion diseases. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 888–902 (2013).
143. Liddelow, S. A. *et al.* Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* **541**, 481–487 (2017).
144. Yim, Y.-I. *et al.* The multivesicular body is the major internal site of prion conversion. *J. Cell Sci.* 1434–1443 (2015). doi:10.1242/jcs.165472
145. Sassa, Y., Yamasaki, T., Horiuchi, M., Inoshima, Y. & Ishiguro, N. The effects of lysosomal and proteasomal inhibitors on abnormal forms of prion protein degradation in murine macrophages. *Microbiol. Immunol.* **54**, 763–768 (2010).
146. Heisler, F. F. *et al.* Muskelein Coordinates PrP C Lysosome versus Exosome Targeting and Impacts Prion Disease Progression Article Muskelein Coordinates PrP C Lysosome versus Exosome Targeting and Impacts Prion Disease Progression. *Neuron* 1–15 (2018). doi:10.1016/j.neuron.2018.08.010
147. Chang, J.-B. *et al.* Iterative expansion microscopy. *Nat. Methods* (2017). doi:10.1038/nmeth.4261
148. Falker, C. *et al.* Exosomal cellular prion protein drives fibrillization of amyloid beta and counteracts amyloid beta-mediated neurotoxicity. *J. Neurochem.* **137**, 88–100 (2016).
149. Coleman, B. M. & Hill, A. F. Extracellular vesicles - their role in the packaging and spread of misfolded proteins associated with neurodegenerative diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* **40**, 89–96 (2015).
150. Keller, S., Sanderson, M. P., Stoeck, A. & Altevogt, P. Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol. Lett.* **107**, 102–8 (2006).
151. Guo, B. B., Bellingham, S. A. & Hill, A. F. Stimulating the release of exosomes increases the intercellular transfer of prions. *J. Biol. Chem.* **291**, 5128–5137 (2016).
152. Grad, L. I., Pokrishevsky, E., Silverman, J. M. & Cashman, N. R. Exosome-dependent and independent mechanisms are involved in prion-like transmission of propagated Cu/Zn superoxide dismutase misfolding. *Prion* **8**, 331–5 (2014).
153. Alais, S. *et al.* Mouse neuroblastoma cells release prion infectivity associated with exosomal vesicles. *Biol. Cell* **100**, 603–618 (2008).

154. Salazar, R., Cerghet, M. & Ramachandran, V. Bilateral hearing loss heralding sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: a case report and literature review. *Otol. Neurotol.* **35**, 1327–9 (2014).

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei Herrn Professor Markus Glatzel bedanken, der mir diese Promotion ermöglicht hat und immer für konkrete Fragen zur Verfügung stand. Bei meiner Betreuerin Frau PD Dr. Susanne Krasemann möchte ich mich sehr herzlichst für die exzellente Betreuung bei der praktischen Arbeit, für die Vermittlung Ihrer weitsichtigen, wie strukturierten Arbeitsweise und ihrer anspornenden, angenehmen Art bedanken. Besten Dank auch an Dr. Frank Heissler und Prof. Matthias Kneussel vom ZMNH für die Bereitstellung der Knockout-Tiere und dem Präparieren und Pflegen der primären Neurone in der Zellkultur. Für meine Anfangszeit im Labor Danke auch an Clemens Falkner, der mich in das Nanosight, die Zellkultur und Exosomenisolation eingeführt hat. Bei Beata Szalay möchte ich für das Erlernen aller labortechnischen Grundtechniken und Hilfestellung bei allen Rezepturen bedanken. Danke auch an das Diagnostik-Team der Neuropathologie für das Einarbeiten in die Routinen und die netten Kaffeepausen - insbesondere an Kristin Hartmann für die Präparation ultradünner Schnitte in unerreichter Qualität. Bei Luise Linsenmeier muss ich mich insbesondere für unzählige Kaffees bedanken - die Tasse ist jetzt an einem besserem Ort. Auch konnte ich Dich bei jeder Gelegenheit mit den unwichtigsten Fragen behelligen, ohne dass du mich in Kühlraum eingesperrt hast. Dafür 1 großes Danke. An meine Freunde, die mich stets mehr oder weniger obstruiert haben, um mich kognitiv zu erden – Grüße gehen raus an: Markus, Barush, Jonas, Niklas, Davide, Alexander und Rainer. An Jannik und Judith - Danke für den Kampf gegen die deutsche Sprache. Dani, danke für deine liebevolle Unterstützung in dieser sehr intensiven Zeit! Danke auch an meine Großmutter Marli Heilmann, die stets ein offenes Ohr für mich hatte.

Insbesondere gebührt mein Dank meinem Vater, sowie Herrn Prof. Thaiss und Frau Prof. Koch und dem Team der III. Medizinischen Klinik, sowie der Station 3G. Ohne sie wäre diese Dissertation nur schwer möglich gewesen.

Weiter möchte mich bei dem gesamten Team der Neuropathologie bedanken. Ich habe in den Frühbesprechungen viel Input von euch allen bekommen und jeder hat seinen persönlichen Teil beigetragen.

**Vielen Dank**

## **Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurde der Lebenslauf entfernt.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht:

**Muskelin Coordinates PrP<sup>C</sup> Lysosome versus Exosome Targeting and Impacts Prion Disease Progression.**

Heisler FF, Pechmann Y, Wieser I, Altmeyen HC, **Veenendaal L**, Muhia M, Schweizer M, Glatzel M, Krasemann S, Kneussel M.

Neuron 2018 doi: 10.1016/j.neuron.2018.08.010. Epub 2018 Aug 30.

## Eidesstattliche Versicherung

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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....