

**SPONTANE UND KEIMINDUZIERT
FIBRILLOGENESE DES PRION-PROTEINS UND
IHR ZUSAMMENHANG MIT DER SPEZIES-
BARRIERE**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Giannantonio Panza

aus Duisburg

Düsseldorf 2009

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Dieter Willbold der mir diese Arbeit ermöglichte und Prof. Dr. Detlev Riesner, der sich bereiterklärte diese Arbeit mitzubetreuen. Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Dr. Eva Birkmann, die immer mit einem guten (bis genialen) Rat aus so mancher misslichen Lage herausgeführt hat.

Bei allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern des Instituts für Physikalische Biologie: Agyenim, Tommy; Bannach, Oliver; Brener, Oleksandr; Dalli, Deniz; Dressen, Fabian; Dumpitak, Christian; Esters, Bernd; Geißen, Rene; Haverkamp, Tobias; Henke, Franziska; Hofmann, Nina; Müller Henrik; Nagel-Steger, Luitgard; Pul, Ümit; Reinartz, Elke; Schenker, Michael; Salwierz, Agnieszka; Steger, Gerhard; Stöhr, Jan; Ümit Pul; Weinmann Nicole und besonders Gruber, Heidi. Und zusätzlich bei Weiß, Jürgen und Jeruschke, Kay für die Hilfestellung bei der Elektronenmikroskopie. Alle hier genannten haben nicht nur mit sehr viel fachlicher Kompetenz diese Arbeit erst ermöglicht, sondern auch menschlich den Arbeitsplatz tagtäglich liebenswert gestaltet haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie: Attilio Panza, Dora Panza und meinem Schwesterherz Francesca Panza: *Vi voglio bene e grazie per il sostegno.*

Meiner Freundin Luisa Wagner die mir immer beigestanden hat: *я тебя люблю.* Und der ganzen Familie Wagner.

Zu guter Letzt möchte ich all meinen Freunden danken die mich in jeder Lebensphase begleitet und geprägt haben.

*Tu erst das Notwendige,
dann das Mögliche,
und plötzlich schaffst du das Unmögliche...*

*San Francesco di Assisi (1182 - 1226)
Stifter des Franziskanerordens
und spirituelles Vorbild von San Francesco di Paola (1436 - 1507)
Schutzpatron Kalabriens*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Tabellen und Abbildungsverzeichnis	V
Veröffentlichungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Proteinfehlfaltungskrankheiten.....	1
1.2 Proteinfehlfaltung	2
1.2.1 Amyloide Fibrillen	4
1.3 Transmissible spongiforme Enzephalopathien.....	8
1.4 Das Prion-Protein	9
1.5 Biochemische und biophysikalische Eigenschaften von PrP ^{Sc} und PrP ^C	11
1.6 Modelle zur Replikation	14
1.7 <i>In vitro</i> Konversion des Prion-Proteins	17
1.8 Spezies-Barriere	19
1.8.1 Molekulare Mechanismen der Spezies-Barriere	19
1.8.2 Keiminduzierte PrP-Aggregationsstudien.....	20
1.8.3 Einfluss der PrP-Aminosäuresequenz auf die Spezies-Barriere	23
1.9 Fragestellung	25
2 Ergebnisse	27
2.1 Mechanismus zur Amyloidbildung des Syrian Hamster Prion-Proteins.....	27

2.2	Spontane Amyloidbildung von bovinem, ovinem und murinem PrP	28
2.2.1	Amyloidbildungsbedingungen.....	29
2.2.2	Analyse der pre-amyloiden PrP-Struktur	30
2.3	Keiminduzierte Fibrillogenese.....	32
2.4	Molekulare Spezies-Barriere	35
2.5	Einfluss von Sekundärfaktoren auf die PrP-Aggregation.....	38
2.5.1	Amyloidbildung von rekPrP in Gegenwart von Glykogen	38
2.5.2	Einfluss von Advanced Glycation Endproducts auf die rekPrP Aggregation	39
3	Diskussion.....	40
3.1	Rolle des pre-amyloiden Struktur bei der Amyloidbildung von rekPrP	40
3.2	Ausbildung der Spezies-Barriere ist auf molekularer Protein-Ebene möglich.....	41
3.3	Einfluss von nicht-Protein Faktoren auf die Amyloidbildung.....	43
3.4	Keiminduzierte Amyloidbildung zur Diagnose von Proteinfehlfaltungs-Krankheiten: Ein Ausblick	44
4	Zusammenfassung	45
5	Summary	46
6	Literaturverzeichnis	IX
7	Anhang: Veröffentlichungen	7-1
	Veröffentlichung 1: Mechanisms of prion protein assembly into amyloid	7-1
	Veröffentlichung 2: Spontaneous and BSE-prion seeded amyloid formation of full length recombinant bovine prion protein.....	7-9

Veröffentlichung 3: Molecular interactions between prions as seeds and recombinant prion-proteins as substrates resemble the biological interspecies barrier <i>in vitro</i>	7-15
Veröffentlichung 4: Aggregation and Amyloid Fibril Formation of the Prion Protein is Accelerated in the Presence of Glycogen.....	7-35
Veröffentlichung 5: Influence of the Maillard reaction to prion protein misfolding and aggregation.....	7-41
8 Anhang: Material und Methoden	8-1
8.1 Verwendete Puffer.....	8-1
8.2 Prion-Proteine.....	8-2
8.2.1 Expression und Aufreinigung verschiedener rekombinanter Prion-Proteine.....	8-2
8.3 PrP ^{Sc} -Aufreinigung mittels Phosphorwolframat	8-7
8.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Micro BCA-Test.....	8-9
8.5 Immunologischer Proteinnachweis	8-10
8.5.1 Differenzielle Ultrazentrifugation.....	8-10
8.5.2 Dot-Blot.....	8-10
8.5.3 Diskontinuierlich Gelelektrophorese und Western-Blot.....	8-11
8.5.4 Proteinnachweiß mittels spezifischer Antikörper	8-13
8.6 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie.....	8-14
8.7 Ultrazentrifugation	8-16
8.7.1 Analytische Ultrazentrifugation.....	8-16
8.8 Transmissions-Elektronenmikroskopie	8-18

8.9	Nachweis amyloider Strukturen mittels spezifischer Farbstoffe	8-20
8.9.1	Thioflavin-T (ThT)	8-20
8.9.2	Fluoreszenzmessung im Tecan Safire Multidetektionsgerät	8-22
8.9.3	Kongorot	8-23
8.10	Polarisationsmikroskopie	8-24
8.11	Mathematische Ausgleichskurven	8-24

Tabellen und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht einiger Proteinfehlfaltungskrankheiten	2
Tabelle 2: Vergleich der Eigenschaften von PrP ^C und PrP ^{Sc} Formen.....	12
Tabelle 3: Interspezies-Transmission und -Barriere	42
Tabelle 4: Prion-Protein-Sequenzen mit verwendeten Abkürzungen.....	8-2
Abbildung 1.1: Faltungstrichter für Proteinfaltung und Aggregation.....	3
Abbildung 1.2: Mechanismen der Fibrillenbildung	5
Abbildung 1.3: Strukturen amyloider Fibrillen.....	7
Abbildung 1.4: Modell des PrP ^C	10
Abbildung 1.5: Strukturmodell von PrP ^{Sc}	13
Abbildung 1.6: Konversionsmodelle	15
Abbildung 1.7: Modell der Prion Amplifikation.....	16
Abbildung 1.8: <i>In vitro</i> SDS-Konversion	19
Abbildung 1.9: : Molekulares Model der Spezies-Barriere auf Proteinebene	22
Abbildung 2.1: Analyse der Sekundärstruktur.....	31
Abbildung 2.2: Oligomerisierungsgrad des pre-amyloid Stadiums von OvPrP und BovPrP.....	32
Abbildung 2.3: Intraspezies PrP ^{Sc} -keiminduzierte Amyloidbildung von BovPrP, OvPrP und MuPrP	34
Abbildung 2.4: Nachstellung der Interspezies-Transmission und -Barriere <i>in vitro</i>	37
Abbildung 8.1: Fließdiagramm <i>E. coli</i> Präparation	8-4

Abbildung 8.2: Fließdiagramm der SEC-Chromatographie.....	8-5
Abbildung 8.3: CD-Spektren typischer Sekundärstrukturen	8-15
Abbildung 8.4: Sedimentation-Diffusion-Gleichgewichtszentrifugation.....	8-16
Abbildung 8.5: Modell der Thioflavin-T Bindung an β -strands	8-21
Abbildung 8.6: Kongorot.....	8-23
Gleichung 8.1: Gleichgewichtszustand als Funktion der Molekülmasse	8-17
Gleichung 8.2: Konz. Profil in Abhängigkeit von Molekülmasse/Winkelgeschwindigkeit	8-18
Formel 8.1: Molare Elliptizität	8-14
Formel 8.2: Polynom der Ordnung 3	8-25

Veröffentlichungsverzeichnis

Veröffentlichung 1: Mechanisms of prion protein assembly into amyloid.....	7-1
Veröffentlichung 2: Spontaneous and BSE-prion seeded amyloid formation of full length recombinant bovine prion protein	7-9
Veröffentlichung 3: Molecular interactions between prions as seeds and recombinant prion-proteins as substrates resemble the biological interspecies barrier <i>in vitro</i>	7-15
Veröffentlichung 4: Aggregation and Amyloid Fibril Formation of the Prion Protein is Accelerated in the Presence of Glycogen.....	7-35
Veröffentlichung 5: Influence of the Maillard reaction to prion protein misfolding and aggregation.....	7-41

1 Einleitung

1.1 Proteinfehlfaltungskrankheiten

Im Allgemeinen bezeichnet man den Untergang von Nervengewebe, speziell von Neuronen, als Neurodegeneration. Bei neurodegenerativen Erkrankungen ist dieser Prozess pathologisch beschleunigt. Eine Vielzahl von ätiologisch unterschiedlichen neurodegenerativen Erkrankungen sind mit amyloiden Proteinablagerungen im zentralen Nervensystem verbunden (Paulson, 1999; Tolnay *et al.*, 1999). Der Begriff „Amyloid“ wurde vom deutschen Wissenschaftler und Arzt Rudolph Virchow 1854 geprägt. Amyloid bedeutet „stärkeähnlicher Stoff“ (aus dem Griech.: amyllum = Stärke oder Zucker). Noch im selben Jahr erkannte der Chemiker Kekulé, dass es sich um eine eiweißhaltige Substanz handelt. In den weiteren Jahren bezeichnet man mit „Amyloid“ extrazelluläre fibrilläre Proteinaggregate, die häufig mit einer Krankheit assoziiert sind (Glenner, 1980). Heute werden amyloide Aggregate durch drei Konsenseigenschaften definiert (Glenner, 1980; Glenner *et al.*, 1974): (i) Spezifische Kongorotbindung: Kongorot gehört zur Gruppe der Azofarbstoffe und ist ein chemischer pH-Indikator. Kongorot wird als spezifischer Marker für fibrilläre Proteinstrukturen verwendet. Im polarisierten Licht sind amyloide Fibrillen, nach Kongorotbindung, an der gold-grünen Doppelbrechung (optische Anisotropie) erkennbar (Puchtler *et al.*, 1962). (ii) Fibrilläre Struktur der amyloiden Aggregate: Die elektronenmikroskopisch sichtbaren amyloide Fibrillen weisen einen Durchmesser von 5 bis 15 nm auf, sind starr und unverzweigt (siehe Kapitel 1.2.1). (iii) Erhöhter Anteil an β -Faltblattstruktur: β -Faltblattstruktur konnte bei allen Protein-Untereinheiten von amyloiden Ablagerungen nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass die Proteinfaltung zu β -Faltblattstrukturen eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielt.

Da sich bei diesen Erkrankungen ein Protein in eine pathologische Struktur umfaltet, die dann zur Aggregation führt, spricht man auch von Proteinfehlfaltungskrankheiten (Tab. 1).

Tabelle 1: Übersicht einiger Proteinfehlfaltungskrankheiten

Krankheit	Ursache	klinische Symptome	betroffener Hirnbereich	Amyloidbildendes Protein
Alzheimer	sporadisch (95%) genetisch (5%)	progressive Demenz	Hippocampus	Amyloid β und Tau
Morbus Parkinson	meist sporadisch selten genetisch	Bewegungsstörungen	Hypothalamus und Substantia Nigra	α -Synuclein
Chorea Huntington	genetische Prädisposition (autosomal dominante Vererbung)	Demenz, motorische und psychische Störungen	zerebraler Cortex	Huntingtin
Creutzfeld Jakob Krankheit	sporadisch (90%) genetisch (8%) übertragbar (2%)	Demenz, Probleme, psychische Schlaflosigkeit	verschiedene Hirnregionen	Prion-Protein

1.2 Proteinfaltung

Proteine falten sich weitestgehend selbstständig (z. T. mit Hilfe von Chaperonen) und spontan in ihre funktionelle native dreidimensionale Struktur. Allerdings ist die funktionelle Isoform nicht die einzig mögliche Struktur, in die sich ein Protein falten kann. So ist bekannt, dass sich Proteine in verschiedene Intermediate und Aggregationsformen falten können (Abb. 1.1). Die verschiedenen thermodynamischen Energiezustände (Gibbssche freie Energie) sind als „Faltungstrichter“ dargestellt. Dabei faltet sich das Protein zu einem stabilen funktionellen Monomer. Dieser Zustand stellt das Energieminimum dar und ist somit thermodynamisch stabil. Neben dem Energieminimum für eine bestimmte Polypeptidkette gibt es verschiedene lokale Energieminima und bei Wechselwirkungen mit anderen Monomeren sogar gänzlich unterschiedliche Aggregationsformen, die ebenfalls lokale Energieminima aufweisen. Somit ist das Faltungs-Trichter-Modell nicht auf einen minimalen Energiepunkt zulaufend (funktionelles Monomer), sondern äußerst komplex mit vielen Energieminimas (siehe Abbildung 1.1).

Der Faltungsprozess als solcher ist noch relativ wenig erforscht, allerdings kann man ein „random-search“ Mechanismus ausschließen bei dem alle möglichen Protein-Konformationen

durchlaufen werden. Dieser Prozess würde außerhalb der Lebensdauer von biologischen Organismen stattfinden (Levinthal, 1968). Daher wird meist ein kooperativer Mechanismus angenommen, bei dem Aminosäureseitenketten durch kooperative Wechselwirkungen die Sekundär- und Tertiärstruktur ausbilden (A.R. Dinner, 2000). Die Theorie eines kooperativen Mechanismus mit verschiedenen Faltungs- und Zwischenstadien führte zur Beschreibung von „energy-landscapes“ (auch Faltungstrichter) für verschiedene Polypeptide (siehe Abbildung 1.1) (P.G. Wolynes, 1995), (Dill *et al.*, 1997). Für die stabilen Intermediate wird das Modell des „molden-globule“ Stadium angeführt (Arai *et al.*, 2000). Beim „molten-globule“ Intermediat sind bereits alle Sekundärstruktur-Elemente ausgebildet, das Protein hat aber noch nicht die endgültige Tertiärstruktur eingenommen.

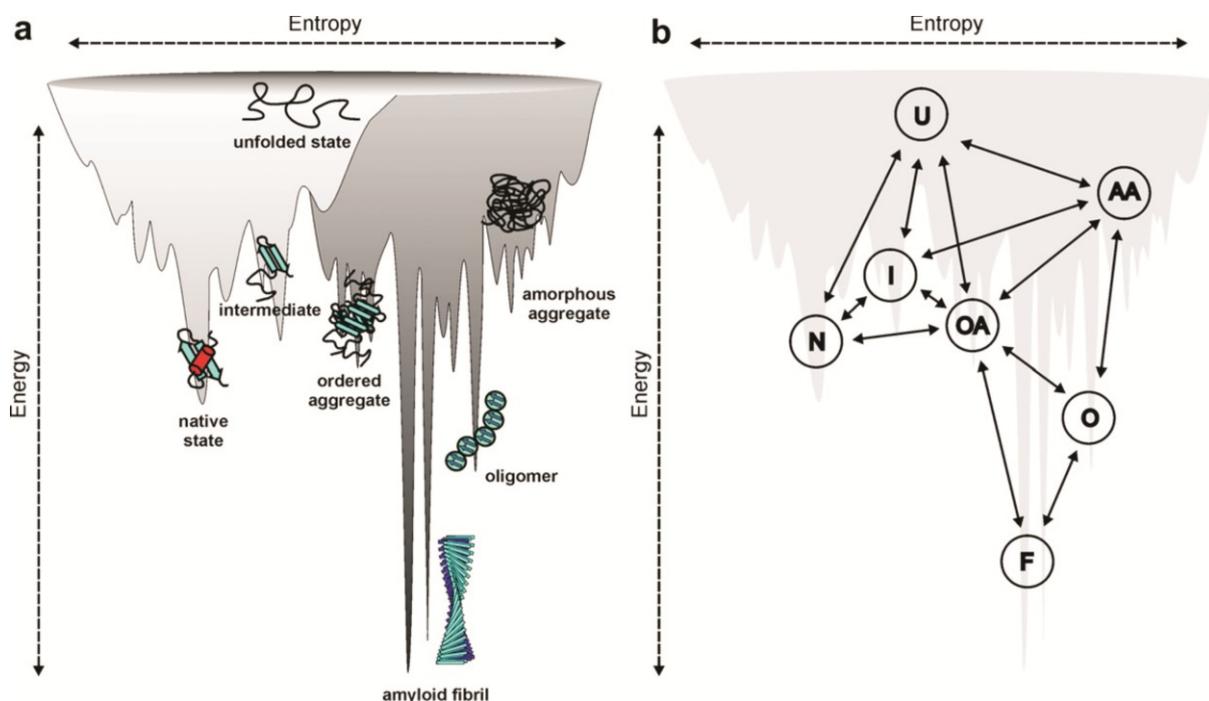


Abbildung 1.1: Faltungstrichter für Proteinfaltung und Aggregation

(a) Illustration des Faltungstrichters, bei dem verschiedene Faltungsstadien und Aggregatzustände für Polypeptidketten aufgezeigt sind. Die hellgrauen Faltungsstadien zeigen den vereinfachten Proteinfaltungs-Trichter, die für die Faltung einer einzelnen Polypeptidkette zu einem funktionierenden Monomer steht. In dunklerem Grau ist der komplexere Faltungstrichter gezeigt der entsteht, wenn intermolekulare Wechselwirkungen berücksichtigt werden. (b) Mögliche Interaktionen: Als Pfeile sind die jeweils möglichen Übergänge von einer Protein- bzw. Aggregatisoform (Faltungsstadium) zu einer anderen dargestellt (Jahn *et al.*, 2008).

Während bei Monomeren der Faltungstrichter noch eine vereinfachte Darstellung aller Faltungsmöglichkeiten ermöglicht, ist der Komplexitätsgrad in der Zelle aufgrund von intermolekularen Wechselwirkungen (u.a. mit den Monomeren der gleichen Proteinspezies) erheblich (Clark, 2004; Gsponer *et al.*, 2006; Jahn *et al.*, 2005). Diese Wechselwirkungen resultieren in einer erhöhten Komplexität des Faltungstrichters (dunkelgrauen Teil in Abbildung 1.1) erkennbar ist. Somit wären amyloide Fibrillen thermodynamisch stabiler als die native Form (funktionelles Monomer). Obwohl die äußeren Bedingungen (z. B. Puffer) nicht verändert werden, können sich verschiedene Fibrillenmorphologien ausbilden (Jimenez *et al.*, 2002; Kad *et al.*, 2003).

Im vorgestellten Modell der Proteinfaltung ist vorgesehen, dass jegliches Protein bei den entsprechenden Bedingungen amyloide Fibrillen bilden kann. So wird angenommen, dass die Fibrillenkonformation einem Minimum der freien Energie bei allen Polypeptidketten entspricht (Guijarro *et al.*, 1998).

1.2.1 Amyloide Fibrillen

Der Proteinaggregationsprozess ist ein Übergang vom löslichen Ausgangszustand des Proteins hin zu unlöslichen Aggregaten, wie z. B. amyloiden Fibrillen. *In vitro* kann die Proteinaggregation durch eine Destabilisierung der nativen Proteinkonformation u.a. mittels pH-Wechsel, Mutationen oder denaturierender Agenzien initiiert werden, um eine Proteinaggregation in messbaren Zeiträumen untersuchen zu können (Chiti *et al.*, 1999; Colon *et al.*, 1992; McParland *et al.*, 2000). Dadurch werden die Möglichkeiten zu aggregationspezifischen intermolekularen Interaktionen erhöht. Die Destabilisierung der Proteinstruktur führt zu spezifischen Intermediaten, welche bei der Bildung von amyloiden Fibrillen eine entscheidende Rolle spielen (Apetri *et al.*, 2004; Jahn *et al.*, 2006; Uversky *et al.*, 2001). Aus diesen Vorstufen können sich Nukleationskeime bilden, an denen die Proteinmonomere konvertiert werden und sich amyloide Fibrillen bilden (Harper *et al.*, 1997).

In Abbildung 1.2 sind verschiedene Wege über unterschiedliche Nukleationskeime zur Bildung von Fibrillen dargestellt. Die Nukleationskeime können sich mittels „domain-swapping“ (ds), „strand-association“ (sa) „edge-edge-association“ (ee) oder „ β -strand-stacking“ (bs) ausbilden.

Die Nukleationskeime entstehen meist direkt aus dem intermediären Stadium. Allerdings beschreiben einige experimentelle Daten auch die Möglichkeit, dass sich die Fibrillenvorstufe aus einer Umlagerung von amorphen Aggregaten bilden können (Cerde-Costa *et al.*, 2007). Nachdem der Geschwindigkeits-limitierende Schritt der Keimbildung stattgefunden hat, schreitet das Aggregatwachstum schnell durch die Anlagerung weiterer Monomere voran. Dies hängt damit zusammen, dass die Bildung des Nukleationskeims thermodynamisch nicht begünstigt wird. Das Fibrillenwachstum ist nach der Bildung des Aggregationskeims thermodynamisch begünstigt (Gosal *et al.*, 2005; Modler *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2006).

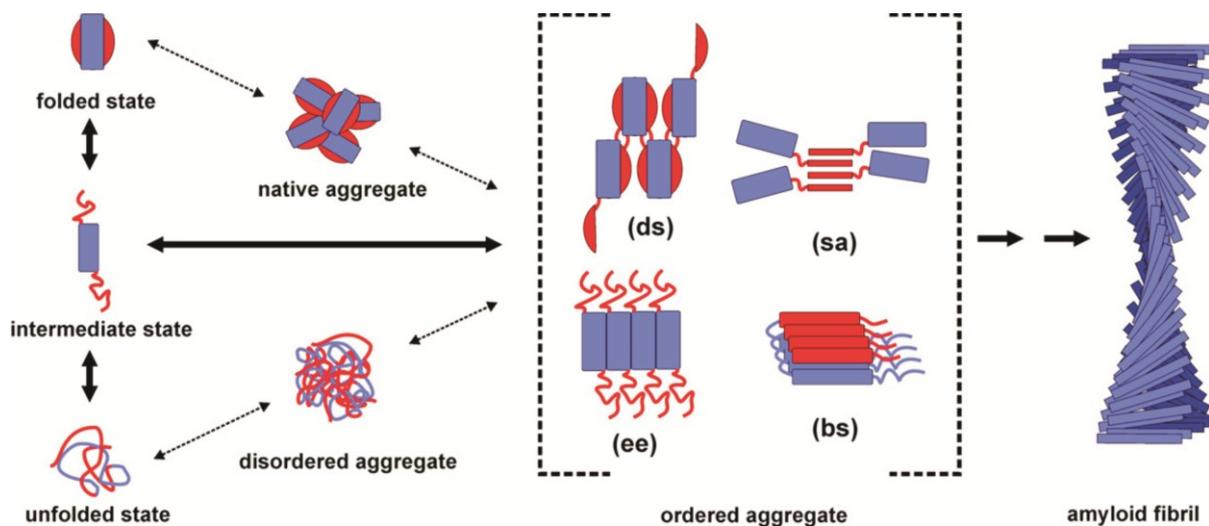


Abbildung 1.2: Mechanismen der Fibrillenbildung

Die Bildung von amyloiden Fibrillen erfolgt zumeist über teilweise denaturierte Intermediate. Diese Intermediate entstehen über partielle Denaturierung der nativen Struktur oder über die Bildung von ungefalteten amorphen Aggregaten. Nukleationskeime können sich über verschiedene Mechanismen wie domain swapping (ds), strand association (sa), edge-edge-association (ee) oder β-strand stacking (bs) bilden. Aus den Nukleationskeime bilden sich durch Rekrutierung von Monomeren zu amyloiden Fibrillen (Jahn *et al.*, 2008).

In vitro wurden verschiedene Intermediate während der Fibrillenbildung identifiziert, z.B. Oligomere und Protofibrillen (Lashuel *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 1997). Allerdings konnte bisher weder geklärt werden, welche von diesen Strukturen „on-pathway“ (auf dem Weg zu amyloiden Fibrillen) oder „off-pathway“ (nicht auf dem Weg zu amyloiden Fibrillen) liegen, bzw. welche toxisch sind. Aufgrund der Relevanz bei verschiedenen Krankheiten ist die Frage nach der toxischen Spezies eine der meist diskutierten auf diesem Gebiet (Caughey *et al.*, 2003; Kodali *et al.*, 2007). Es gibt Studien, die amyloide Fibrillen als toxische Spezies beschreiben (Novitskaya *et al.*, 2006). Allerdings mehren sich in den letzten Jahren die Argumente dafür, dass die verschiedenen

Vorstufen (Oligomere, Protofibrillen) die toxische Spezies sind (Glabe *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2004).

1.2.1.1 Struktur der amyloiden Fibrillen

Als Proteinstruktur in Amyloiden wurde bereits vor über 40 Jahren die „cross-beta“-Struktur beschrieben (Eanes *et al.*, 1968). Seit dieser Erstbeschreibung liegt die Aufklärung der Proteinstruktur, welche in amyloiden Fibrillen vorliegt, immer noch an der Grenze des methodisch Möglichen, obwohl in den letzten Jahrzehnten die Fortschritte auf diesem Gebiet enorm waren (Makin *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2005).

Die Definition für „Amyloid“ basiert auf empirischen Studien und vereint Daten aus verschiedenen Forschungsgebieten wie Röntgenbeugung, Elektronenmikroskopie (EM), Rasterkraftmikroskop (AFM) und Färbung mittels spezifischer Farbstoffe (siehe Kapitel 8.9 und 8.8) (Sipe *et al.*, 2000; Westermark *et al.*, 2005). Die für amyloide Strukturen charakteristischen Röntgenbeugungssignale werden als Reflektion bei 4.7 Å und einer diffusen Reflektion bei 10 Å beschrieben (Blake *et al.*, 1996). (Blake *et al.*, 1996). EM und AFM Studien zeigten, dass amyloide Fibrillen länglich und unverzweigt sind und einen Durchmesser von 7 bis 12 nm (70-120 Å) haben (Gosal *et al.*, 2006). In den letzten Jahren sind Methoden wie z.B. Festkörper-NMR (ssNMR, ss: solid state) entwickelt worden, die einen detaillierten Einblick in die strukturellen Charakteristika von Fibrillen erlauben (Heise, 2008).

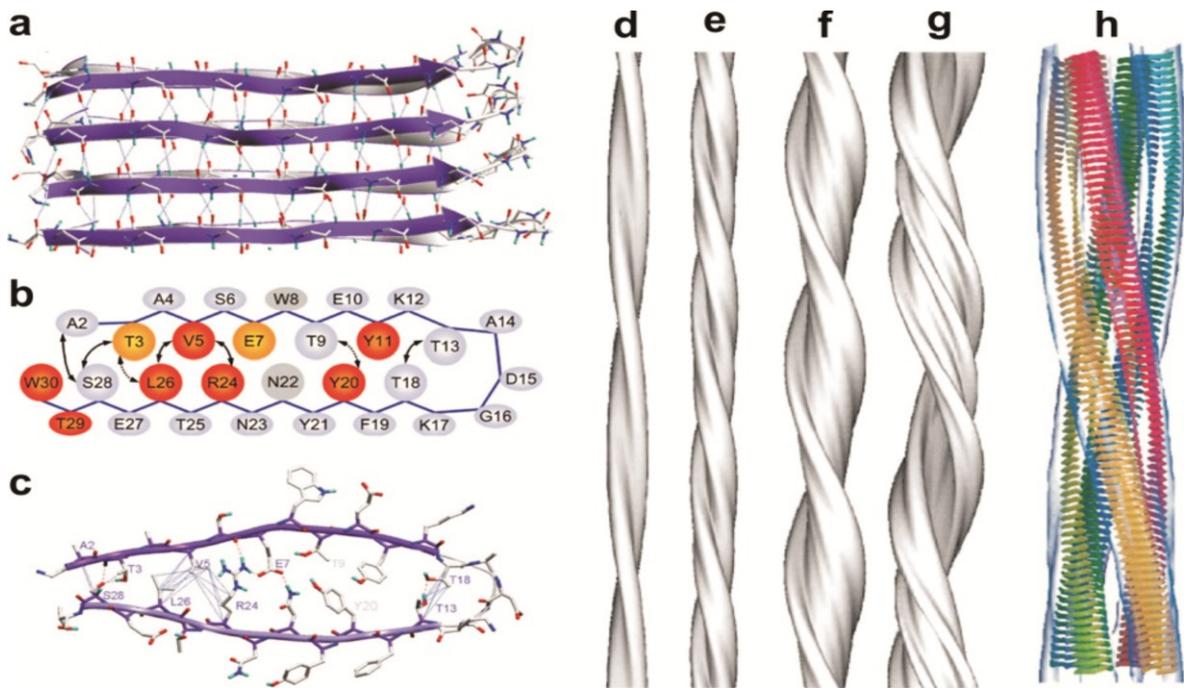


Abbildung 1.3: Strukturen amyloider Fibrillen

(a-c) Strukturmodelle von Protofilamenten: (a) Senkrechte Sicht auf die Fibrillenachse. Dargestellt sind β -sheet Wasserstoffbrücken. (b) Vereinfachte Darstellung der mittels ssNMR ermittelten Struktur eines β -Stranges. (c) Atommodell bei gleicher Sicht wie in b. (d-g) Oberflächenstruktur von Insulinfibrillen ermittelt mittels cryoEM mit jeweils zwei (d) vier (e) oder sechs (f, g) Protofilamenten. (h) Mögliches β -Strang Modell für Insulinfibrillen bestehend aus vier Protofilamenten (abgeändert aus (Ferguson *et al.*, 2006; Jimenez *et al.*, 2002)).

Ferguson und Mitarbeitern gelang es eine detaillierte Struktur der amyloiden Fibrillen zu bestimmen, die auch für $A\beta(1-40)$ vorgeschlagen wird (siehe Abbildung 1.3 a-c). Die β -Stränge der Protofilamente sind parallel und „in-register“ (Verzahnung der Aminosäurereste) entlang der Fibrillenachse angeordnet (siehe Abbildung 1.3 a). Dreidimensionale Strukturen von Fibrillen konnten aufgeklärt werden: Insulin, SH3-Proteindomäne und Prion-Protein (PrP) (Jimenez *et al.*, 1999; Jimenez *et al.*, 2002; Tattum *et al.*, 2006). Beispielhaft ist in Abbildung 1.3 d-g die Morphologie verschiedener Protofibrillen von Insulin abgebildet. Darauf aufbauend ist unter Abbildung 1.3 h ein Modell gezeigt, welches eine linkshändig gewundene Fibrille aus 4 Protofibrillensträngen mit relativ flachen beta-Faltblättern zeigt.

1.3 Transmissible spongiforme Enzephalopathien

Eine besondere Stellung unter den neurodegenerativen Erkrankungen, die mit amyloiden Ablagerungen einhergehen können, nehmen die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) ein. Darunter werden neurodegenerative Erkrankungen zusammengefasst, die sich neben der schwammartigen Veränderung des Hirngewebes besonders durch ihre Übertragbarkeit auszeichnen. Die erste beschriebene Krankheit, die heute zu den TSEs gezählt wird, ist die Traberkrankheit (Scrapie) bei Schafen. Scrapie ist bereits seit dem 18. Jahrhundert bekannt und wurde früh als ansteckend beschrieben. Der experimentelle Nachweis wurde 1936 erbracht, indem gesunde Schafe mit Hirn- bzw. Rückenmarksgewebe erkrankter Schafe infiziert wurden (Cuillè J., 1936). Zu einer molekularen Charakterisierung des Scrapie-Erregers kam es jedoch erst, nachdem die Übertragung von Scrapie auf die Maus als Modellsystem gelang (Chandler, 1961). Im Jahr 1966 wurde von Alper beobachtet, dass der Erreger gegenüber ionisierender und ultravioletter Strahlung resistent ist. Da durch diese Strahlung besonders Nukleinsäuren biologisch inaktiviert werden, wurde schon damals ein Fehlen von Nukleinsäuren angenommen (Alper *et al.*, 1966). Diese Beobachtung und das Fehlen jeglicher klassischer Immunantwort sprechen gegen einen viralen Erreger und führten zu den ersten Vermutungen hinsichtlich eines Proteins als möglichen Erreger (Alper *et al.*, 1967). Diese Arbeiten wurden von Stanley B. Prusiner fortgesetzt, dessen Arbeitsgruppe zeigen konnte, dass der Einsatz von nukleinsäuremodifizierenden oder -zerstörenden Verfahren keinen Einfluss auf die Infektiosität ausübt. Durch proteinerstörende oder -modifizierende Reagenzien, kam es jedoch zu einem Verlust an Infektiosität (Prusiner, 1982; Prusiner *et al.*, 1981). Bei der Aufreinigung des infektiösen Agens aus Hirngeweben infizierter Tiere, durch limitierten Proteinase K (PK) Proteolyse, stellte sich heraus, dass die Hauptkomponente des Erregers ein Protein war (Bolton *et al.*, 1982)). Dies führte 1982 zur Prägung des Begriffs 'Prion' (proteinaceous infectious particle) durch Prusiner. Seit dem Auftreten der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) Epidemie in den 80iger Jahren in Großbritannien besitzen TSEs eine große Aktualität. Als Ursache für das Auftreten von BSE gilt die Verfütterung von Scrapie-kontaminiertem Tiermehl an Rinder. Es wird angenommen, dass dadurch die Artenbarriere zwischen Schaf und Rind überwunden werden konnte. Es ist noch eine Vielzahl von weiteren TSEs bei Tieren bekannt. Beim Menschen wurden TSEs erstmals 1920 von Hans Gerhard Creutzfeldt und Alfons Jakob beschrieben (Creutzfeldt, 1920). Die frühen Fälle der Creutzfeldt-Jakob- Krankheit (CJD) wurden nicht mit

Scrapie oder anderen tierischen TSEs in eine systematische Gruppe eingeordnet. Erstmals fielen (Hadlow, 1959) Ähnlichkeiten zwischen Kuru, übertragen durch rituellen Kannibalismus in Neu Guinea, und Scrapie auf. Der experimentelle Nachweis einer Übertragbarkeit von Kuru gelang erstmals (Gajdusek, 1966), indem Kuru auf Primaten übertragen wurde. Später wurde die Übertragbarkeit auch für andere Prion-Krankheiten nachgewiesen. Der erste Fall einer Übertragung von Prionkrankheiten des Tieres auf den Menschen wurde im Rahmen des Auftretens einer neuen Variante von CJD im Zusammenhang mit der BSE-Epidemie 1996 in Großbritannien diskutiert (Collinge *et al.*, 1996).

1.4 Das Prion-Protein

Nachdem Hinweise auf einen proteinartigen Erreger als pathogene Spezies von Prionkrankheiten gefunden wurden, folgte die Suche nach dem infektiösen Protein. Die Gruppen von Prusiner und Weissmann entdeckten 1985, dass es sich um ein wirtseigenes Protein handelt (Oesch *et al.*, 1985), welches sowohl im gesunden wie auch im kranken Organismus vorkommt. Dieses bis dato unbekannte Protein wurde Prion-Protein genannt.

Die Primärstruktur des zellulären Prion-Proteins (PrP^C, C für cellular) besteht aus 253 Aminosäuren, wobei die N- und die C-terminalen Regionen je nach Spezies aus 27 bzw. 22/23 Aminosäuren langen Signalsequenzen bestehen (siehe Abbildung 1.4). Während der Prozessierung erfährt das Prion-Protein mehrere posttranslationale Veränderungen. Die N-terminale Signalsequenz wird im endoplasmatisches Retikulum (ER) abgespalten. Dort wird auch eine Disulfidbrücke und N-Glykosylierungen ausgebildet. An das Prion-Protein wird nach Abspaltung der C-terminalen Signalsequenz ein Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) C-terminal verknüpft. Die Sekundärstruktur des zellulären Prion-Proteins besteht aus einer kurzen antiparallelen β -Faltblattstruktur und drei α -Helices (Riek *et al.*, 1996).

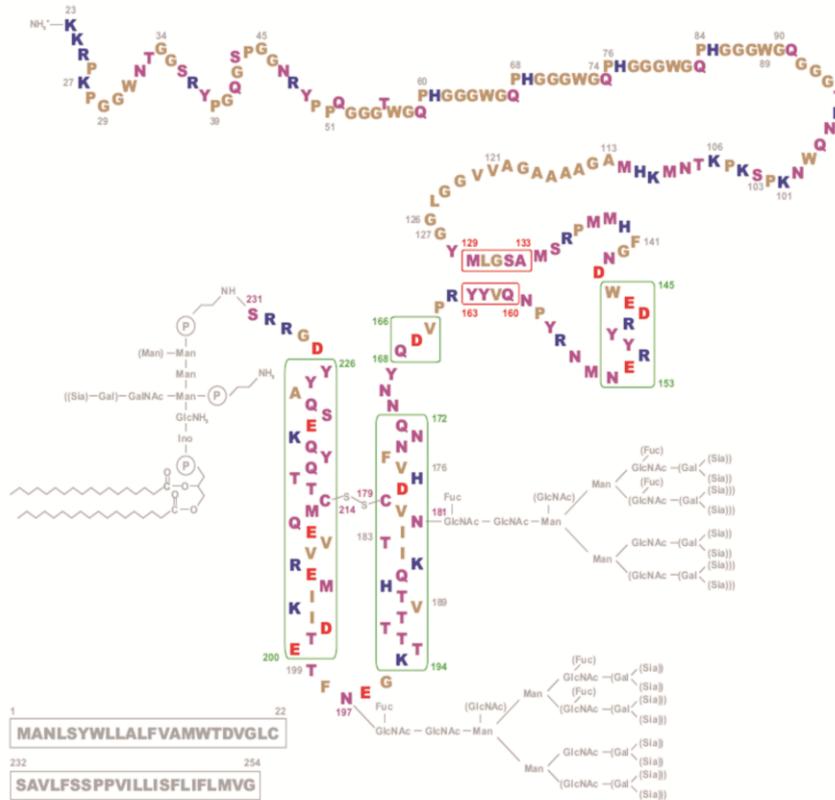


Abbildung 1.4: Modell des PrP^C

Zelluläres Prion-Protein des Syrian Goldhamsters (Schema verändert nach (Dumpitak, 2003)). α -helikale Struktur AS 145-153, 166-168, 200-226 (grün markiert); β -Faltblatt Struktur: AS 129-133, AS 163-160 (rot markiert); fünf Oktarepeats: AS 51-91; Disulfidbrücke: AS 179-214; N-Glykosylierungen: AS 181, 197; GPI-Anker: AS 231; Aminosäurefarbcode: negativ geladene AS = rot, positiv geladene AS = blau, neutral hydrophile AS = violett, hydrophobe AS = braun. Sekundärstrukturelemente nach (Donne *et al.*, 1997; James *et al.*, 1997); Oligosaccharidkomposition nach (Endo *et al.*, 1989; Rudd *et al.*, 1999) GPI-Ankerkomposition nach (Stahl *et al.*, 1992).

Das zelluläre Prion-Protein ist auf der Plasmamembran von u.a. Neuronen des ZNS lokalisiert. Daneben findet es sich auch auf Oligodendrozyten und Mikroglia-Zellen (Moser *et al.*, 1995). Innerhalb der Säugetiere, aber auch in anderen Tierklassen, ist es sehr weit verbreitet und hoch konserviert (Westaway *et al.*, 2002). Obwohl diese Eigenschaften auf eine fundamentale Funktion von PrP schließen lassen, ist die genaue Funktion von PrP nicht bekannt. PrP „knock-out“ Mäuse (PrP^{0/0}) entwickeln sich weitestgehend normal und zeigen keine klinischen Symptome (Bueler *et al.*, 1992).

Es ist anzunehmen, dass die Prion-Krankheiten nicht auf einen Verlust der biologischen Funktion von PrP^C (C für cellular) sondern vielmehr auf die Akkumulation von fehlgefaltetem PrP^{Sc} (infektiöse, fehlgefaltete Form; Sc für Scrapie) zurückzuführen sind. Des Weiteren stellte sich heraus, dass bei PrP^{0/0}-Mäusen eine Infektion nicht möglich ist (Bueler *et al.*, 1993), was bedeutet, dass PrP^C essentiell für eine Infektion durch Prionen ist.

Durch biochemische Untersuchungen wurde eine Vielzahl von Bindungspartnern von PrP^C identifiziert. PrP bindet über die Histidin-Reste der hochkonservierten Oktarepeat-Region (PHGGGWGQ) und über die Histidine der Aminosäure-Positionen 96 und 111 sehr selektiv Kupferionen (Jackson *et al.*, 2001). Darüber hinaus wird für das zelluläre Prion-Protein eine Rolle als Signalmolekül angenommen (Malaga-Trillo *et al.*, 2009a). Auch eine Rolle in der Embryonalentwicklung wird für PrP^C postuliert. So wird, dass PrP^C als Signalmolekül in der frühen Embryonalentwicklung bei der Zell-Zell-Kommunikation fungiert (Malaga-Trillo *et al.*, 2009b). In diesem Zusammenhang wurde eine Studie von Lauren *et al.* (Lauren *et al.*, 2009) veröffentlicht. Die Studie war darauf ausgelegt Bindungspartner für Abeta-Oligomere, die als toxische Spezies bei der Alzheimerischen Krankheit gelten, zu isolieren. Als Bindungspartner wurde PrP^C gefunden, welches eine Rolle im Internieren der Abeta-Oligomere zu haben scheint (Lauren *et al.*, 2009). So wurde für PrP^C eine Funktion bei der Pathogenese von Proteinfaltungskrankheiten vorgeschlagen.

1.5 Biochemische und biophysikalische Eigenschaften von PrP^{Sc} und PrP^C

Die zelluläre Form (PrP^C) und die infektiöse Form (PrP^{Sc}) des Prion-Proteins besitzen identische Aminosäuresequenzen (Oesch *et al.*, 1985). Jedoch musste sich die infektiöse Form PrP^{Sc} gegenüber PrP^C in den krankheitsassoziierten Eigenschaften unterscheiden. Als erstes Unterscheidungskriterium wurde die Stabilität gegen Proteinase K (PK) Proteolyse von PrP^{Sc} im Gegensatz zu der Sensitivität von PrP^C beschrieben (Hay *et al.*, 1987). Bei PrP^{Sc} kommt es zur Abspaltung der 68 N-terminalen Aminosäuren. Es stellte sich heraus, dass das Proteinase K-resistente Fragment (Aminosäuresequenz 90-231) von PrP^{Sc} amyloide Fibrillen bildet, die ihre Infektiosität beibehalten (PrP 27-30, prion rods) (Meyer *et al.*, 1986).

Tabelle 2: Vergleich der Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc} Formen

Eigenschaft	PrP^C	PrP^{Sc}
Infektiosität	Nicht infektiös	Infektiös
Sekundärstruktur	β -Faltblatt: 3 % α -Helix: 42 % random coil: 23 % β -turn: 32 %	β -Faltblatt: 54 % α -Helix: 21 % random coil: 16 % β -turn: 9 %
Verdauung durch Proteinase K	Vollständige Degradation	C-terminal resistent
Löslichkeit	Löslich in milden Detergenzien	Unlöslich
Aggregationszustand	Monomer	Oligomer/Aggregat

Die Bildung von PrP^{Sc} geht einher mit der Umfaltung des PrP^C-Monomers. Dabei konvertiert das überwiegend α -helikale monomere PrP^C zu PrP^{Sc}, welches eine β -Faltblatt-reichen Sekundärstruktur aufweist, und aggregiert. PrP^{Sc} besitzt einen α -helikalen Anteil von ca. 21 % und einen β -Faltblatt Anteil von 54 % ((Pan *et al.*, 1993); vgl. Tabelle 2). Studien mit dem Ziel diese Umfaltung wieder umzukehren, zeigten, dass mit verminderter β -Struktur und gesteigerter Löslichkeit auch die Infektiosität zurückging (Riesner *et al.*, 1996).

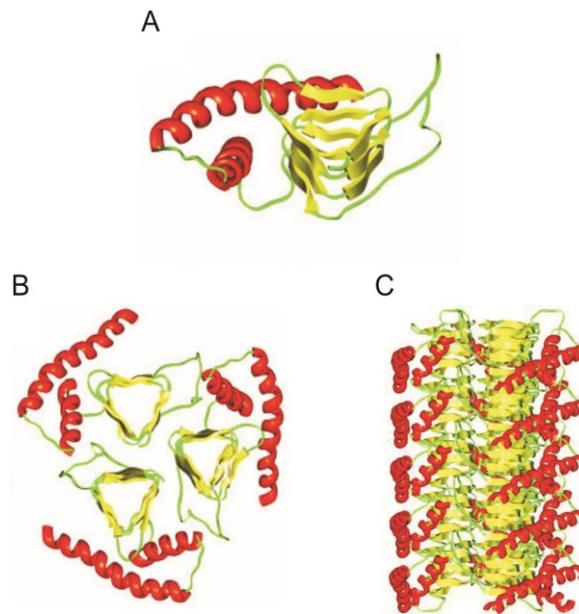


Abbildung 1.5: Strukturmodell von PrP^{Sc}

A: Strukturmodell der monomeren Protein-Untereinheit des PrP27-30 Moleküls B: Trimer des PrP27-30 Moleküls. Stapelung der Trimere führen zur Fibrillenbildung. C: Modell der amyloiden Fibrillen (Prion-rods) (Abbildungen nach Govaerts *et al.* 2004.)

Die Strukturaufklärung des PrP^{Sc}s wird durch die Unlöslichkeit besonders erschwert. Ein Modell von PrP^{Sc} basiert auf computergestützter Auswertung von elektronenmikroskopischen Daten (Govaerts *et al.*, 2004) (Wille *et al.*, 2002). Das rekonstruierte Strukturmodell, welches die von PrP27-30 gewonnenen Daten der Kristallaufnahmen zusammenfasst, ist unter Abbildung 1.5 gezeigt. So besteht eine Fibrillen-Untereinheit aus einem PrP^{Sc}-Trimer, welches nach innen geneigt ist. Die PrP^{Sc}-Einheiten besitzen eine linksgängige β-Helix, (Abbildung 1.5 A/B). Die Trimere bilden die Untereinheit der amyloiden Fibrillen (Abbildung 1.5 C). Allerdings wurde noch nicht abschließend geklärt, ob diese Formen des PrP der infektiösen und/oder toxischen Form des PrP entsprechen. Desweiteren sind bei infektiösen PrP^{Sc}-Aufreinigungen noch nicht-proteinöse Sekundärfaktoren enthalten, wie z.B. das Prion-Scaffold (ein dem Glykogen ähnliches Polysaccharid) oder Lipiden (Dumpitak *et al.*, 2005). Auch kovalent gebundene Saccharide (Advanced Glycation Endproducts) sind u.a. mit infektiösen PrP^{Sc}-Aufreinigungen assoziiert (siehe Veröffentlichung 5).

1.6 Modelle zur Replikation

Trotz der experimentellen Daten, welche die „protein-only“-Hypothese unterstützen (Legname *et al.*, 2004; Saborio *et al.*, 2001), bleibt der Amplifikationsmechanismus unklar. Besonders erschwerend ist die multivalente Charakteristik der Prion-Protein-Replikation. Ein etwaiges Modell muss sowohl beantworten, wie sich ein nur aus Protein bestehender Krankheitserreger in Abwesenheit von codierender Nukleinsäure replizieren kann, und darüber hinaus das Auftreten sporadischer, familiärer und infektiöser Formen der Krankheit erklären können (siehe Kapitel 1.3).

Um die „protein-only“-Hypothese zu erklären, werden drei Modelle diskutiert: Das „Heterodimer-Modell“ (Cohen *et al.*, 1994), das „kooperative Prusiner-Modell“ (Eigen, 1996) sowie das Modell der „keiminduzierten Aggregation“ (Come *et al.*, 1993; Jarrett *et al.*, 1993). Die Grundlage aller Modelle ist die Fähigkeit des PrP^{Sc}, die Umwandlung von zellulären PrP^C in PrP^{Sc} zu katalysieren (Prusiner *et al.*, 1990). Das von Cohen und Prusiner postulierte Heterodimermodell (Abbildung 1.6 A) geht von einem Gleichgewicht zwischen PrP^C und einer leicht destabilisierten Form PrP* aus, welches auf Seiten des PrP^C liegt (Cohen *et al.*, 1994). Nur PrP* kann mit PrP^{Sc} interagieren, wodurch ein heterodimerer Zwischenzustand entsteht. Daran schließt sich die Umwandlung von PrP* in PrP^{Sc} an. Aus dem Heterodimer wird so ein PrP^{Sc}-Homodimer, welches nach Dissoziation weitere Umwandlungen katalysieren kann. Bei diesem Modell handelt es sich um eine lineare Autokatalyse, die zu einer exponentiell ansteigenden Bildung von PrP^{Sc} führt. Das Gleichgewicht zwischen PrP^C und PrP^{Sc} muss auf der Seite von PrP^{Sc} liegen, da sonst keine treibende Kraft für den katalytischen Umsatz vorhanden wäre. Darauf aufbauend formulierte Eigen das kooperative Prusiner Modell. Als Grundlage dienten Berechnungen, wodurch die spontane Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} extrem langsam verlaufen muss, da ansonsten der katalytische Effekt für ein PrP^{Sc}-Molekül zu hoch wäre und der PrP^{Sc}-Gehalt auch ohne Infektion schnell ansteigen würde (Eigen, 1996). Mehrere PrP^{Sc}-Moleküle müssen kooperativ zusammenwirken, um PrP^C umzuwandeln. Damit ist der katalytische Effekt eines einzelnen PrP^{Sc}-Moleküls geringer als im Heterodimer-Modell. Das Gleichgewicht zwischen PrP^C und PrP^{Sc} liegt wieder auf der Seite von PrP^{Sc}, aber die nicht-katalytische Bildung von PrP^{Sc} ist so langsam, dass PrP^{Sc} schneller abgebaut als spontan gebildet wird. Das dritte Modell ist die keiminduzierte Aggregation von Lansbury (in Abbildung 1.6 B). Im Gegensatz zu den ersten beiden Modellen liegt hier das Gleichgewicht auf der Seite des zellulären PrPs (Come

et al., 1993; Jarrett *et al.*, 1993). Diesem Modell nach muss zunächst ein Nukleationskeim gebildet werden oder exogen z.B. durch eine Infektion zugegeben werden, damit die Umwandlung von zellulärem PrP in PrP^{Sc} thermodynamisch begünstigt wird. Es kommt zu einem schnellen Wachstum der Aggregate. Für eine Ausbreitung der Infektion ist ein anschließender Zerfall der entstandenen Aggregate nötig, wodurch neue Keime entstehen.

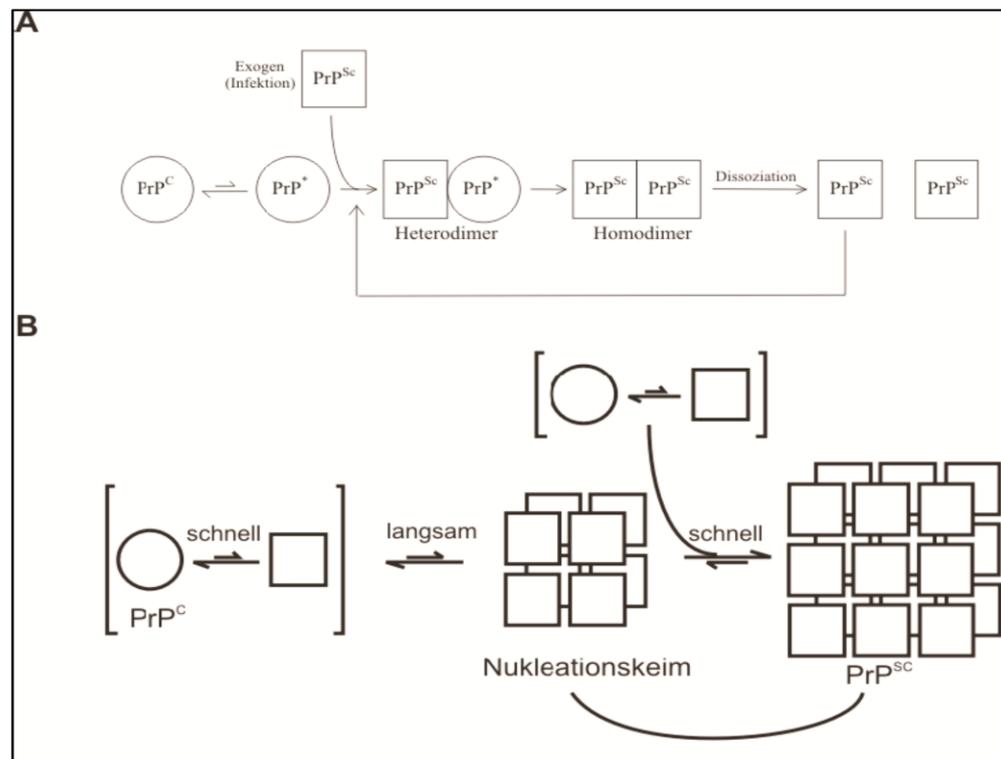


Abbildung 1.6: Konversionsmodelle

A: Heterodimermodell: PrP^{Sc} bindet an eine destabilisierte Form von PrP^C (PrP^{*}). Dadurch bildet sich Heterodimer. Die Umwandlung von PrP^{*} zu PrP^{Sc} wird induziert, und es entsteht ein Homodimer. Nach Dissoziation stehen zwei PrP^{Sc}-Monomere zur Katalyse weiterer Umwandlungen bereit (verändert nach (Cohen *et al.*, 1994). **B:** Keiminduzierte Aggregation: Dieses Modell setzt die Bildung eines Nukleationskeimes voraus. Hiernach wird die Umwandlung in PrP^{Sc} thermodynamisch begünstigt. (Come *et al.*, 1993; Jarrett *et al.*, 1993).

Aufbauend auf diesen Modellen stellte Eigen im Jahr 2001 ein Modell zur Replikation von Prionen in Folge einer Infektion vor (Eigen, 2001). Nach diesem Modell replizieren sich die vorhandenen infektiösen PrP^{Sc}-Einheiten in zwei aufeinander folgenden Schritten (Abbildung 1.7). Wenn die PrP^{Sc}-Ketten eine bestimmte kritische Größe aufweisen, binden PrP^C-Moleküle an die Enden dieser Ketten. Durch diese Wechselwirkung wird gebundenes PrP^C in die pathogene Form umgewandelt. Dadurch kommt es im ersten Schritt zu einem Kettenwachstum. Im zweiten Schritt werden die Aggregate fragmentiert. Der Kettenbruch in Kombination mit

nachfolgender erneuter Anlagerung von PrP^{C} führt zu einer exponentiellen Vermehrung der infektiösen PrP^{Sc} -Einheiten.

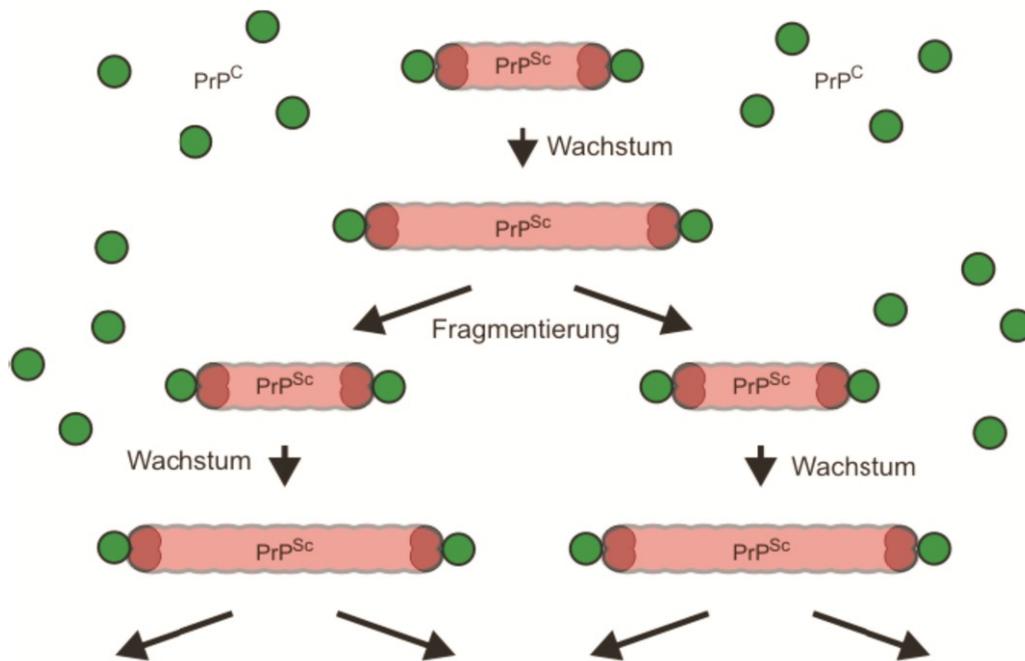


Abbildung 1.7: Modell der Prion Amplifikation

Die Vermehrung von PrP^{Sc} erfolgt in zwei Schritten: 1. Wachstum der PrP^{Sc} -Ketten durch Anlagerung von PrP^{C} und Umwandlung in die pathogene Form. 2. Spaltung der gewachsenen Aggregate gefolgt von erneutem Kettenwachstum (verändert nach (Eigen, 2001)).

Dieses Modell bildet auch die Grundlage zur Prionreplikation *in vitro* mittels PMCA (protein misfolding cyclic amplification) (Saborio *et al.*, 2001). Das Prinzip, auf dem PMCA beruht, ist das gleiche wie das in Abbildung 1.7 gezeigte und beruht auf dem Prinzip der keiminduzierten Aggregation (siehe oben). In diesem System werden die PrP^{Sc} -Keime durch Hirnhomogenat infizierter Tiere eingebracht (Abbildung 1.7). Mit der Zugabe von Hirnhomogenat gesunder Tiere wird dann PrP^{C} , als Substrat, zugeführt. In Anwesenheit von Detergenzien kommt es zu einer Konversion von PrP^{C} und damit zu dem von Eigen postuliertem Aggregatwachstum. Die Spaltung der Aggregate wird im Anschluss daran mittels Ultraschallbehandlung der Proben herbeigeführt. Durch die Einführung von Inkubations-/Ultraschallzyklen kommt es immer wieder abwechselnd zur Aggregatspaltung gefolgt von erneuter Anlagerung von PrP^{C} und Aggregatwachstum, und damit zu der von Eigen beschriebenen exponentiellen Amplifikation von PrP^{Sc} . Der Nachweis der Konversion erfolgt anhand der partiellen proteolytischen Resistenz

von PrP^{Sc} in Kombination mit immunologischem Nachweis. Es konnte gezeigt werden, dass ohne die Ultraschallbehandlung zwar auch eine Amplifikation von PrP^{Sc} stattfindet, diese jedoch bald zum Erliegen kommt, da hier deutlich geringere Mengen an neugebildetem PrP (27-30) detektiert wurden (Lucassen *et al.*, 2003). Parallel zu diesen Arbeiten wurde in unserer Arbeitsgruppe ein ähnliches Amplifikationssystem entwickelt (Stohr *et al.*, 2008). Allerdings wurde es dahingehend verbessert, dass anstatt das gesamte Hirnhomogenat zu benutzen nur minimale Komponenten eingesetzt wurden. So wurde im SDS-vermittelten Konversionssystem die Amplifikation auf aufgereinigtes PrP^{Sc} und rekombinantes PrP reduziert (siehe Kapitel 1.7).

1.7 *In vitro* Konversion des Prion-Proteins

Zur Verifizierung der „protein-only“ Hypothese müsste Infektiosität nur mit PrP *in vitro* rekonstruiert werden können. Ein Ansatz zur *de novo*-Generierung von Infektiosität ist die spontane Konversion von zellulären oder rekombinanten PrP zu infektiösen PrP^{Sc}. Der andere wäre die keiminduzierte Konversion mit einem PrP^{Sc}-Keim. Dabei stellt der erste Ansatz ein Modell für die spontane Ätiologie von Prion-Krankheiten da, und der zweite Ansatz den Fall der Infektion.

Es sind einige Konversionssysteme entwickelt worden, die zum einen die spontane Konversion und zum anderen die keiminduzierte Konversion nachstellen. Bei der spontanen Konversion von PrP haben die ersten Modellsysteme einige aber nicht alle Charakteristika von PrP^{Sc} nachbilden können (Jackson *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003; Post *et al.*, 1998; Swietnicki *et al.*, 2000). Jedoch zeigte bisher erst ein einziges spontanes Konversionssystem die *de novo*-Bildung von Infektiosität. Dabei wurde rekombinantes murines PrP (89-231) mittels Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl) in eine fibrilläre Form konvertiert. Die amyloiden Fibrillen zeigten in transgenen Mäusen, die das PrP-Fragment der Sequenz 89-231 überexprimierten, einen geringen Infektionstiter (Legname *et al.*, 2004; Legname *et al.*, 2005). In der zweiten Passage entfaltet sich jedoch der gleiche Titer, welcher auch bei natürlichen Prionen auftritt. Somit konnte erstmals eine Korrelation zwischen amyloiden Fibrillen und Infektiosität gezeigt werden. Allerdings konnten mittels dieses Ansatzes keine Wildtyp Mäuse infiziert werden.

Andere Konversionssysteme verfolgen die Strategie, *de novo*-Infektiosität mittels PrP^{Sc} als katalytischen Keim zu generieren. Anfangs konnte nur die Resistenz gegen PK-Proteolyse der neu gebildeten PrP-Isoform, nicht aber deren Infektiosität nachgewiesen werden (Caughey *et al.*, 1995). Eine Weiterentwicklung stellten die Arbeiten von Soto dar, der die sogenannte „protein misfolding cyclic amplification“ (PMCA) entwickelte (Saborio *et al.*, 2001). Dabei wird PrP^{Sc}-enthaltendes Hirnhomogenat infizierter Tiere mit Hirnhomogenaten gesunder Tiere verdünnt und PrP^{Sc} amplifiziert. Serielle Amplifikations- und Verdünnungszyklen wurden angewandt, um eine hohe Amplifikationseffizienz erzielen zu können und um rechnerisch ausschließen zu können, dass im letzten Zyklus noch infektiöses Startmaterial vorhanden ist (Castilla *et al.*, 2005b). Tierversuche mit diesen Proben zeigten, dass *de novo*-Infektiosität generiert wurde (Castilla *et al.*, 2005a). Allerdings wird bei dieser Methode nicht nur PrP verwendet, so dass alle Faktoren, die im Hirngewebe vorhanden sind, bei der *de novo* Generierung von Infektiosität eine Rolle spielen könnten.

Das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte PrP-Konversionssystem basiert auf dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) (Post *et al.*, 1998; Riesner *et al.*, 1996). SDS verändert in geringen Konzentrationen die Konformation des Prion-Proteins (Post *et al.*, 1998). Andere Arbeitsgruppen benutzen ebenfalls SDS, um eine Konformationsveränderung bei Proteinen zu induzieren (Stefani, 2003; Xiong *et al.*, 2001). Bei Variation der SDS-Konzentration zwischen 0,2 % und 0,005 % zeigt rekombinantes Syrian Hamster PrP verschiedene reversible Konformationsübergänge (siehe Abbildung 1.8). Die aggregierte Form von rek SHaPrP(AS: 90-231) zeigte aber weder amyloide Fibrillen noch Infektiosität. Die so entstandenen PrP-Aggregate wiesen amorphe Charakteristika auf. Das SDS-Konversionssystem führt erst durch die Zugabe von Natriumchlorid (NaCl) zu amyloiden Fibrillen (Leffers *et al.*, 2005; Panza *et al.*, 2008; Stohr *et al.*, 2008).

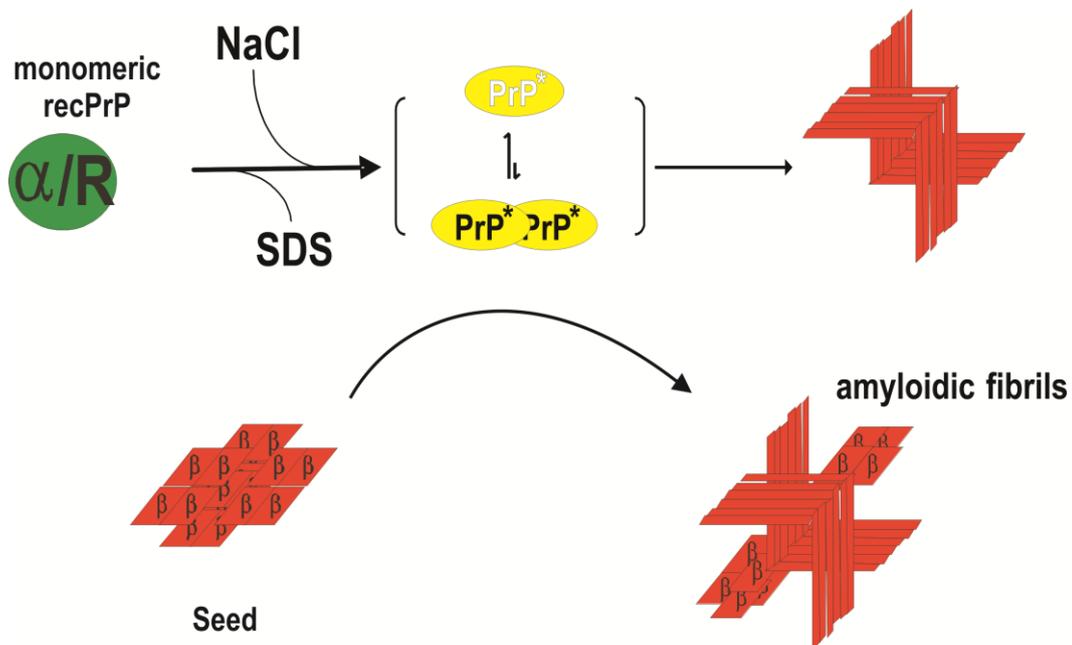


Abbildung 1.8: *In vitro* SDS-Konversion

Durch die Verdünnung von SDS wird eine Änderung der Sekundärstruktur von α -helikal zu einem β -sheet dominierten Struktur erreicht. Dies geht einher mit einer gesteigerten Unlöslichkeit und Aggregation von PrP. Durch die Zugabe von NaCl in das *in vitro* Konversionssystem wird die Bildung von amyloiden Fibrillen induziert. Zur keiminduzierten Konversion kann zusätzlich noch ein exogener Keim hinzugegeben werden, der die Fibrillenbildung katalysiert, und somit von einigen Wochen auf nur einige Stunden reduziert.

1.8 Spezies-Barriere

1.8.1 Molekulare Mechanismen der Spezies-Barriere

Es ist bekannt, dass sich Prionkrankheiten nicht nur innerhalb einer Spezies ausbreiten, sondern, dass es zur Transmission zwischen verschiedenen Spezies kommen kann (Interspezies). So wurden verschiedene Interspezies Transmissionen, die aus der Natur bekannt sind, experimentell nachgewiesen. Demgegenüber kann auch eine Spezies-Barriere der Transmission entgegenstehen, wie z.B. bei Syrian Hamster Scrapie auf Mäuse (zur Übersicht siehe (Beringue *et al.*, 2008)). Ein besonderes Augenmerk bei der Interspezies-Transmission wird auf die molekulare Konformation von PrP^{Sc} gelegt.

In zellfreien Konversionsassays wurden mittels verschiedener Ansätzen versucht, die Eigenschaften der Spezies-Barriere *in vitro* nachzustellen. Aufbauend auf Erkenntnissen aus der *in vitro* Konversion wird dazu ein Zwei-Stufen-Mechanismus abgeleitet (DebBurman *et al.*, 1997) (Horiuchi *et al.*, 1999). Der erste Schritt ist die sequenzspezifische Bindung von PrP^C an PrP^{Sc} (DebBurman *et al.*, 1997) (Rigter *et al.*, 2005). Der zweite Schritt ist die geschwindigkeitsbestimmende Konversion der PrP^C- zur PrP^{Sc}-Isoform. (Callahan *et al.*, 2001), (DebBurman *et al.*, 1997), (Horiuchi *et al.*, 1999), (Rigter *et al.*, 2005). Darauf aufbauend könnte die Spezies-Barriere auf einer Limitierung dieses Prozesses basieren. So könnte bei einer Spezies-Barriere die Bindung von PrP^C an PrP^{Sc} aufgrund von Aminosäuresequenzunterschieden zwischen den Spezies auf molekularer Ebene verhindert werden. Eine weitere Hypothese wäre, dass die Bindung zwar stattfindet, die Konversion jedoch verhindert wird.

1.8.2 Keiminduzierte PrP-Aggregationsstudien

Die Systeme, die am besten geeignet sind die molekularen Mechanismen der keiminduzierten PrP-Aggregation zu untersuchen, sind sogenannte Seeding-Assays mit definierten Komponenten. Als Substrat wird meist rekombinant exprimiertes PrP eingesetzt und als Keim z.B. amyloide Fibrillen aus rekombinantem PrP (rekPrP). Diese auf Fibrillenbildung basierende Systeme werden in der Literatur als „nucleation-dependent-nucleation-process“ beschrieben (Baskakov *et al.*, 2007), (Noinville *et al.*, 2008), (Surewicz *et al.*, 2006). Surewicz und Kollegen adaptierten dieses System für rekPrP der Aminosäuresequenz 23 bis 144 und stellten auf dieser Grundlage verschiedene Prion Varianten mittels verschiedener Fibrillenmorphologien nach. Die durch Fibrillenkeime entstandenen neuen Fibrillen nahmen die Morphologien der als Keim eingesetzten Fibrillen an. Die neu entstandenen Fibrillen besitzen somit die Eigenschaft der Keime (aus rekPrP einer anderen Spezies), obwohl beide unterschiedliche Aminosäuresequenzen haben. Somit entsprechen sie nicht mehr den spontan generierten Fibrillen der Spezies (Jones *et al.*, 2005). Diese Studie wurde dahingehend erweitert, dass Punktmutationen an Position 138 und 139 eingefügt wurden und das PrP somit durch die veränderte Aminosäuresequenz einer anderen Spezies ähnelt. So wurde beim Hamster PrP eine Punktmutation eingefügt, so dass diese Aminosäureposition die der humanen PrP-Sequenz

entspricht. Wird dieses Konstrukt als Substrat eingesetzt, so verhält es sich zu verschiedenen Keimen nicht mehr wie Syrian Hamster PrP, sondern wie humanes PrP, was die Bedeutung von einzelnen Sequenzpositionen bei Spezies-Barrieren unterstreicht.

Das molekulare Artenbarriere-Konzept (siehe Abbildung 1.9) basiert darauf, dass ein Protein multiple Aggregatmorphologien aufgrund von Missfaltung und anschließender Aggregation einnehmen kann. Eine Punktmutation würde hiernach das Spektrum der möglichen Konformationen verändern. Demnach wäre eine Spezies-Barriere darin begründet, dass es aufgrund der Sequenzunterschiede des PrP zwischen den Spezies und der darin begründeten möglichen PrP^{Sc}-Morphologien keine Möglichkeit zur Rekrutierung von PrP^C der anderen Spezies gibt (Abbildung 1.9).

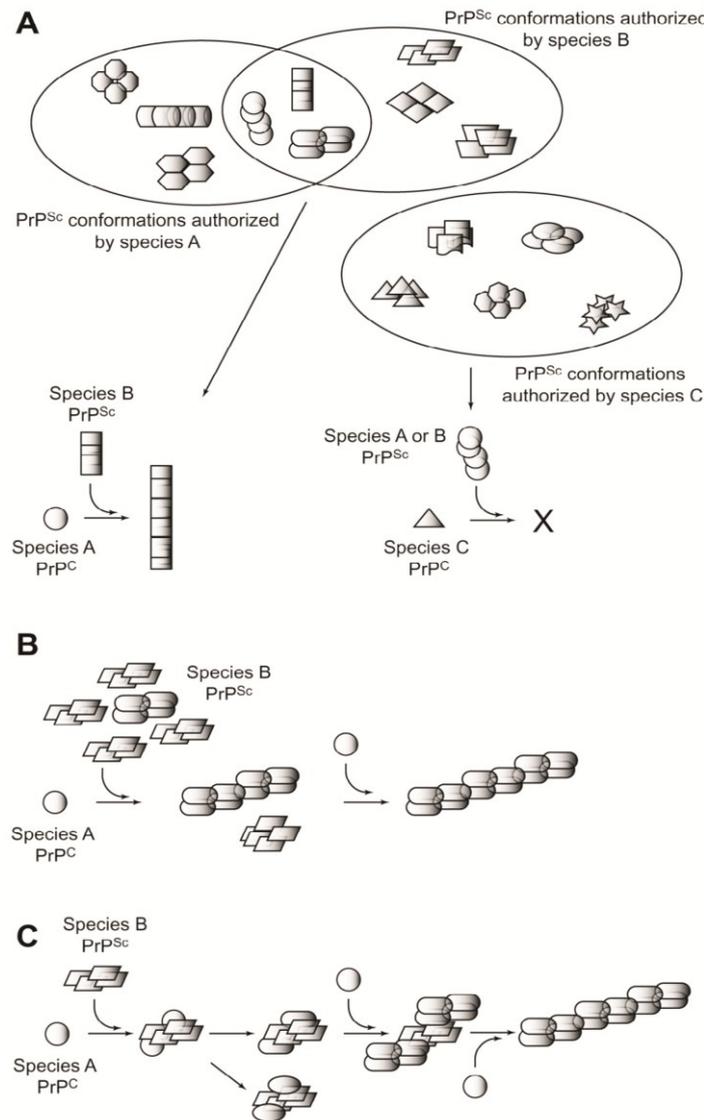


Abbildung 1.9: : Molekulares Modell der Spezies-Barriere auf Proteinebene

(A) Konformationsmöglichkeiten von PrP^{Sc} der Spezies A, B oder C und mögliche Überlappungen. Eine Krankheitsübertragung von Spezies B zu Spezies A wäre demnach möglich, da Spezies A Konformationsvarianten mit Spezies B teilt. Das Gegenteil wäre der Fall, wenn Spezies C mit Spezies A oder B interagieren sollte, da dort keine gemeinsamen Konformationsvarianten auftreten können. Eine Spezies-Barriere wäre liegt vor. (B) Stamm Phänotyp ändert sich durch die Replikation eines geringen Anteils der PrP^{Sc}-Konformation im Organismus, dadurch Selektion der für den jeweiligen Organismus kompatiblen Konformation. (C) Neue Generierung eines Stamms durch molekulare Interaktion zwischen PrP^{Sc} und PrP^C zweier Spezies. Dadurch können neue Eigenschaften entstehen die vorher weder im PrP^{Sc} von Spezies A oder B möglich waren (nach (Beringue *et al.*, 2008)).

Wenn die PrP^{Sc}-Konformation dem Spektrum der PrP^C-Konformationsmöglichkeiten entspricht resultiert dies in einer geringen Spezies-Barriere, da PrP^C und PrP^{Sc} interagieren können und PrP^C zur PrP^{Sc}-Konformation umfaltet. Es können anfänglich auch verschiedene PrP^{Sc}-

Konformationen nebeneinander vorhanden sein, welche aber aufgrund einer geringeren Amplifikationsrate oder einer erhöhten Instabilität für die Übertragung nicht relevant sind (Collinge *et al.*, 2007), (Beringue *et al.*, 2008), (Kimberlin *et al.*, 1978). Der Vollständigkeit halber muss erwähnt werden, dass obwohl eine Vielzahl der Charakteristika von Prionen mittels Proteineigenschaften erklärt werden können, auch zelluläre Faktoren eine Rolle bei der PrP-Konversion spielen könnten. So ist z.B. die Degradierungsrate des PrP^{Sc} für die Ausbreitung wichtig (Yedidia *et al.*, 2001). Darüber hinaus können Chaperone als wichtiger zellulärer Faktor in diesen Prozess involviert sein (DeBurman *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 2001).

1.8.3 Einfluss der PrP-Aminosäuresequenz auf die Spezies-Barriere

Verschiedene Spezies besitzen verschiedene Anfälligkeit für Prion-Krankheiten. Auch in der gleichen Spezies findet man aufgrund von Polymorphismen des Prion-Gens verschiedene Anfälligkeiten. Für die Spezies Schaf ist bekannt, dass die Aminosäurepositionen 136, 154, 171 (Goldmann, 2008; Goldmann *et al.*, 1990) einen entscheidenden Einfluss auf die Suszeptibilität für Prion-Krankheiten haben. So sind Tiere, welche in der Prionsequenz an Positionen 136/154/171 die Aminosäuren A/R/Q oder V/R/Q aufweisen sehr anfällig, wohingegen die, welche die Kombination A/R/R ausweisen weniger anfällig sind (Belt *et al.*, 1995; Elsen *et al.*, 1999; Groschup *et al.*, 2007). Diese Beobachtung konnte durch Zellkulturstudien und zellfreie Assays bestätigt werden (Bossers *et al.*, 1997; Sabuncu *et al.*, 2003). Ein Polymorphismus der Prionproteinsequenz ist auch beim Menschen bekannt und manifestiert sich an Position 129 mit dem Polymorphismus M/V (Hasnain *et al.*, 2001).

Bei der Spezies-Barriere wurde die Bedeutung der speziesspezifischen PrP-Sequenz von der Arbeitsgruppe von Scott mit Hamster und Maus untersucht (Scott *et al.*, 1989). Wildtyp-Mäuse können nicht mit Hamster-Scrapie infiziert werden. Diese Speziesbarriere konnte dadurch überwunden werden, dass in transgenen Mäusen das Hamster PrP exprimiert wurde (Kimberlin *et al.*, 1978). So wurden die Mäuse durch die jeweilige PrP-Expression infizierbar für Prionkrankheiten von Schaf Scrapie (Crozet *et al.*, 2001; Vilotte *et al.*, 2001; Westaway *et al.*, 1994), Rind (Beringue *et al.*, 2006; Buschmann *et al.*, 2006; Buschmann *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 1999), Mensch (Asante *et al.*, 2002; Telling *et al.*, 1995), Cervide (Bueler *et al.*, 1993; Green *et al.*, 2008; LaFauci *et al.*, 2006) und Nerz (Windl *et al.*, 2005). Dies ist ein starkes Indiz dafür,

dass speziesspezifische zelluläre Faktoren, bei der Spezies Barriere eine untergeordnete Rolle spielen.

1.9 Fragestellung

Der Konversion von zellulärem Prion-Protein (PrP^C) zu mit der Prion-Krankheit assoziierten, fehlgefalteten Isoform (PrP^{Sc}) wird eine entscheidende Rolle bei der Prion-Krankheit zugesprochen. Die PrP-Fehlfaltung kann ohne exogenen Keim vonstattengehen (spontane oder genetische Ätiologie), oder durch einen exogenen PrP^{Sc}-Keim beschleunigt werden (infektiöse Ätiologie). Um die Konversion von PrP nachzustellen wurde in unserer Arbeitsgruppe ein *in vitro*-Konversionssystem etabliert, in welchem ausschließlich aufgereinigtes rekombinant exprimiertes PrP in einem Sodiumdodecylsulfat (SDS)-haltigen Puffer eingesetzt wird (siehe Kapitel 1.7). Durch die Verdünnung des denaturierenden Detergenz SDS von 0,2 % auf 0,01 % wird die Faltung von monomeren und strukturell α -helikal dominierten rekPrP in eine β -faltblatt reiche und aggregierte Isoform begünstigt (Jansen *et al.*, 2001). Durch die Zugabe von 250 mM NaCl ist es möglich die Übergangsstrukturen so zu stabilisieren, dass amyloide Fibrillen ausgebildet werden. Amyloide Fibrillen gelten als die Morphologie, die der infektiösen und pathologischen Isoform am ähnlichsten ist (siehe Kapitel 1.6). Nach einer Inkubationszeit von mehreren Wochen (bei 37°C und schütteln) ist es somit möglich, dass rek-PrP Monomere spontan zu amyloiden Fibrillen konvertieren. Diese *in vitro*-Aggregation ist ein Modellsystem für die spontane Ätiologie von Prionkrankheiten. Durch die Zugabe von NaPTA-gefälltem PrP^{Sc} (siehe Kapitel 8.3) wird die infektiöse Ätiologie nachgestellt, da hier die Konversion mittels eines exogenen PrP^{Sc}-Keim beschleunigt wird (Veröffentlichung 1: „Mechanismus of prion protein assembly into amyloid“).

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag darauf, dass in unserem Institut von Jan Stöhr und Nicole Weinmann etablierte spontane und keimabhängige Konversionssystem, welches für die Spezies Hamster untersucht wurde, auf weitere Spezies, wie Rind (Veröffentlichung 2: „Spontaneous and BSE-prion seeded amyloid formation of full length recombinant bovine prion protein“), Schaf und Maus zu erweitern. Mittels Kombinationen von PrP^{Sc}-Keim (Donor) und rekPrP-Substrat (Host) sollte darüber hinaus ermittelt werden, ob zwischen verschiedenen Spezies die Nachstellung von Interspezies-Transmission und Interspezies-Barriere ausschließlich mit proteinösen Komponenten auf molekularer Ebene möglich ist (Veröffentlichung 3: „Molecular interactions between prions as seeds and recombinant prion-proteins as substrates resemble the biological interspecies barrier *in vitro*“). Zusätzlich sollte der Einfluss von verschiedenen nicht-

Protein-Faktoren auf die rekPrP-Konversion untersucht werden. Es sollte das Aggregationsverhalten von rekPrP in Anwesenheit von Glykogen (als Modell für das Prion-Scaffold) (Veröffentlichung 4: „Aggregation and Amyloid Fibril Formation of the Prion Protein is Accelerated in the Presence of Glycogen“) und von Advanced-Glycation-Endproducts untersucht werden (Veröffentlichung 5: „Influence of the Maillard reaction to prion protein misfolding and aggregation“).

2 Ergebnisse

2.1 Mechanismus zur Amyloidbildung des Syrian Hamster Prion-Proteins

Veröffentlichung 1: Mechanisms of prion protein assembly into amyloid

Jan Stöhr, Nicole Weinmann, Holger Wille, Tina Kaimann, Luitgard Nagel-Steger, Eva Birkmann, Giannantonio Panza, Stanley B. Prusiner, Manfred Eigen and Detlev Riesner

Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 105; no. 7; s. 2409-2414

Basierend auf dem SDS-Konversionssystem für monomeres PrP (Jansen *et al.*, 2001) (Post *et al.*, 1998) wurde in der im Anhang angefügten Arbeit (siehe Veröffentlichung 1) für rekombinantes Syrian Hamster Prion Protein der Aminosäuresequenz 90-231 (SHaPrP) die spontane und die keiminduzierte Konversion etabliert. Die spontane Fibrillogenese erfolgte ohne exogenen Keim im Konversionspuffer (10 mM NaPi pH 7,4, 0,03% SDS und 250 mM NaCl) bei konstantem Schütteln (37°C) über einen Zeitraum von 6 Wochen. In der maßgeblich von Jan Stöhr und Nicole Weinmann durchgeführten Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Ausgangszustand des PrPs (pre-amyloid state), der zu amyloiden Fibrillen führt, eine alpha-helikal dominierte Sekundärstruktur mit random-coil Anteil besitzt. Eine weitere Analyse des pre-amyloid-Zustandes mittels analytischer Ultrazentrifugation zeigte ein Gleichgewicht zwischen PrP-Monomeren und -Dimeren (33% zu 66%) (Veröffentlichung 1; Fig. 1 A/B). Nach 6 Wochen Inkubationszeit wurden Fibrillen, welche die typischen unverzweigten „twisted“ Strukturen aufwiesen, durch elektronenmikroskopische Aufnahmen verifiziert (Veröffentlichung 1; Abb. 1 A/B). Eine weitergehende Untersuchung der fibrillären Strukturen durch den amyloidspezifischen Farbstoff ThT (siehe Kapitel 8.9.1.) zeigte den amyloiden Charakter der Fibrillen (siehe Veröffentlichung 1 Abb. 2 B).

Eine Erweiterung des spontanen PrP-Konversionssystem (Arbeiten durchgeführt von Nicole Weinmann) stellt die Einführung eines exogenen Keimes (PrP^{Sc}) dar. Durch die Anwesenheit eines Aggregationskeimes verkürzt sich die Konversionszeit von mehreren Wochen auf einige Stunden (siehe Veröffentlichung 1 Abb. 3 A). Als Keim wurde NaPTA-gefälltes PrP^{Sc}, isoliert aus Hirngewebe Scrapie infizierten Syrian Hamster eingesetzt (Positiv) (siehe Kapitel 8.3). Als Kontrolle diente Hirngewebe nicht erkrankter Hamster, welches einer analogen NaPTA-Fällung unterzogen wurde (Negativkontrolle). In Abbildung 3 A (Veröffentlichung 1) ist die Kinetik der keiminduzierten Amyloidbildung gezeigt, welche mittels amyloidspezifischer ThT-Fluoreszenzerhöhung verfolgt wurde. In der Negativkontrolle findet im Untersuchungszeitraum keine Amyloidbildung statt. Die spezifische Wechselwirkung zwischen SHaPrP^{Sc}-Keim und SHaPrP-Substrat wurde mittels elektronenmikroskopischen Aufnahmen validiert (Veröffentlichung 1; Fig. 3 C/D).

2.2 Spontane Amyloidbildung von bovinem, ovinem und murinem PrP

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag darauf die spontane und keiminduzierte Amyloidbildung auf verschiedene Spezies zu übertragen.

In Veröffentlichung 2 sind die Ergebnisse der spontanen und der keiminduzierten Amyloidbildung von rekombinantem bovinen PrP(25-241) (BovPrP) beschrieben.

Veröffentlichung 2: Spontaneous and BSE-prion seeded amyloid formation of full length recombinant bovine prion protein

Giannantonio Panza, Jan Stöhr, Christian Dumpitak, Dimitrios Papathanassiou, Jürgen Weiß, Detlev Riesner, Dieter Willbold, Eva Birkmann

Biochemical and Biophysical Research Communications; vol. 373; no. 4; s. 493-497

In Veröffentlichung 3 sind die die Ergebnisse zur spontanen und Keiminduzierten Amyloidbildung von rekombinantem ovinen PrP(25-233) (OvPrP) und murinem PrP(89-231) (MuPrP) beschrieben.

Veröffentlichung 3: Molecular interactions between prions as seeds and recombinant prion-proteins as substrates resemble the biological interspecies barrier *in vitro*

Giannantonio Panza, Lars Lueers, Jürgen Weiß, Detlev Riesner, Dieter Willbold and Eva Birkmann

Manuskript eingereicht.

2.2.1 Amyloidbildungsbedingungen

Aufgrund der BSE-Epidemie in Großbritannien in den 1980-90 Jahren ist die Charakterisierung der Bildung von amyloiden Fibrillen von bovinem PrP von besonderem Interesse. Ein kritischer Punkt bei der Adaption des SDS-basierten Konversionssystems ist die Etablierung der SDS-Konzentration, in dem das rekPrP spontan Fibrillen bildet. Um die geeignete SDS-Konzentration zu bestimmen, bei der rekPrP amyloide Fibrillen bildet, wurde im Konversionspuffer (10 mM NaPi pH 7,4, 250 mM NaCl) die SDS-Konzentration zwischen 0,01 und 0,05% SDS variiert und rekPrP der verschiedenen Spezies unter konstantem Schütteln (650 rpm) bei 37°C über mehrere Wochen inkubiert. Die Amyloidbildung wurde mittels der amyloidspezifischen ThT-Fluoreszenzerhöhung verfolgt (siehe Kapitel 8.9.1). Für BovPrP wurde nach 1 Woche Inkubation bei einer SDS-Konzentration von 0,02% Amyloidbildung detektiert (siehe Veröffentlichung 2; Abb. 2 A). Sowohl bei höheren als auch bei niedrigeren SDS-Konzentrationen kam es nicht zu einer Fluoreszenzerhöhung, was gegen eine Bildung von amyloiden Fibrillen im Untersuchungszeitraum von 7 Wochen spricht.

Die Verifizierung des amyloiden Charakters der gebildeten Strukturen erfolgte zusätzlich durch den amyloidspezifischen Farbstoff Kongorot (siehe Kapitel 8.9.3). Als Kontrolle wurden amorphe rekPrP-Aggregate herangezogen. Die für Amyloide charakteristische Doppelbrechung

unter polarisiertem Licht trat bei BovPrP nur in den Proben auf, die auch eine erhöhte ThT-Fluoreszenz aufwiesen. Der fibrilläre Charakter wurde analog zum SHaPrP des vorherigen Kapitels mittels Elektronenmikroskopie bestimmt (siehe Veröffentlichung 2; Abb. 2 B/C). Auch hier sind die charakteristischen unverzweigten amyloiden Fibrillen sichtbar.

Analog zur Volllänge-BovPrP bildeten sich bei OvPrP bei 0,02% SDS amyloide Strukturen nach 3 Wochen. In niedrigeren bzw. höheren SDS-Konzentrationen konnte im Untersuchungszeitraum von 4 Wochen keine amyloidspezifische Fluoreszenzerhöhung von Thioflavin T nachgewiesen werden (siehe Veröffentlichung 3 Abb. 1). Die Verifizierung der Fibrillenstruktur erfolgte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen (siehe Veröffentlichung 3, Abb. 1). Bei MuPrP wurde Amyloidbildung in einem Konzentrationsbereich von 0,02 bis 0,04 % SDS beobachtet. Bereits nach 1 Woche war ein erhöhtes ThT-Fluoreszenzsignal von MuPrP messbar. Der höchste Amyloidanteil konnte bei 0,04 % SDS nachgewiesen werden. Für die weiteren Versuche mit MuPrP wurde im Folgenden die SDS-Konzentration von 0,04 % SDS gewählt (siehe Veröffentlichung 3).

2.2.2 Analyse der pre-amyloiden PrP-Struktur

Zur Ermittlung welche pre-amyloide PrP-Ausgangsstruktur die Konversion zu amyloiden Fibrillen begünstigt, wurde die Sekundärstruktur des PrPs im pre-amyloiden Stadium mittels Circular-Dichroismus (CD) (Kapitel 8.6) ermittelt. Das Molekulargewicht und damit der Oligomerisierungsgrad wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation (AUZ) (Kapitel 8.7.1) bestimmt. Ein Vergleich der Sekundärstruktur von BovPrP bei verschiedenen SDS-Konzentrationen ist in Abbildung 1 (Veröffentlichung 2) dargestellt. In 0,01% und 0,02% SDS liegt eine α -helikal/ β -Faltblatt-dominierte Sekundärstruktur vor, wohingegen bei höheren SDS-Konzentrationen eine α -helikal/random-coil dominierte Sekundärstruktur erkennbar ist. Ausschließlich die Inkubation von BovPrP in 0,02 % SDS führte zu amyloiden Fibrillen. Diese pre-amyloide Struktur wurde mit anderen pre-amyloiden Sekundärstrukturen verschiedener PrP-Spezies verglichen (siehe Veröffentlichung 2 Abbildung 1). Das N-terminal verkürzte BovPrP(102-241) und die Volllänge-SHaPrP(23-231) zeigten eine α -helikal/random-coil

dominierte Sekundärstruktur, wie sie schon für SHaPrP(90-231) beschrieben wurde (Veröffentlichung 1 Fig. 1 B).

Die Sekundärstrukturanalyse des pre-amyloiden Stadiums von OvPrP und MuPrP zeigten α -helikal/random-coil dominierte Sekundärstrukturen. Die Sekundärstruktur von OvPrP und MuPrP weist im Vergleich zu SHaPrP höhere random-coil Anteile auf.

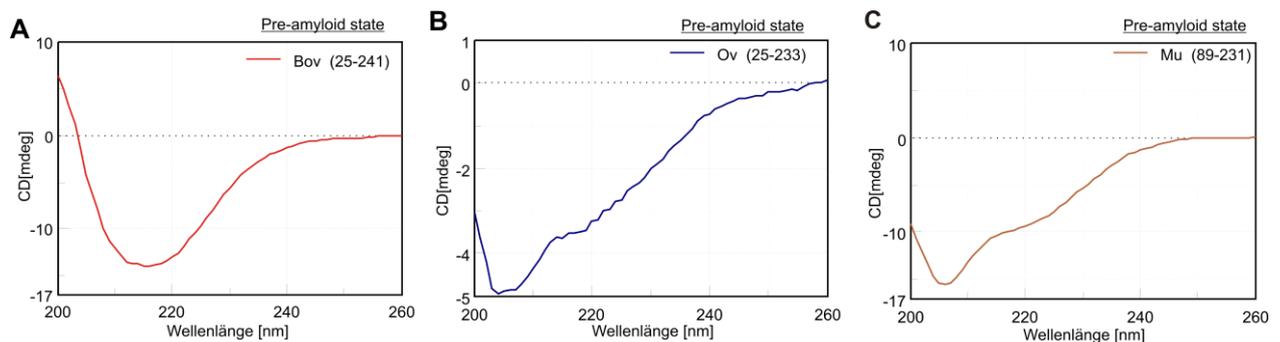


Abbildung 2.1: Analyse der Sekundärstruktur

CD-Spektren wurden direkt nach dem Einstellen der SDS Konzentration gemessen, die endgültige Proteinkonzentration betrug 150 ng/ μ l in 10 mM NaPi pH 7.4 und 250 mM NaCl. **A** Pre-amyloid state von BovPrP in 0,02 % SDS. **B** Pre-amyloid state von OvPrP in 0,02 % SDS **C** Pre-amyloid state von MuPrP in 0,04% SDS.

Die weitergehende Untersuchung der pre-amyloiden PrP-Ausgangsstruktur erfolgte mit der Methode der analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) (siehe Kapitel 8.7.1). Durch die Bestimmung des Molekulargewichts des pre-amyloiden Stadiums von BovPrP und OvPrP, konnte jeweils eine Zwei-Komponenten-Verteilung bestimmt werden. Analog zu SHaPrP(90-231) besteht ein Monomer-Dimer Gleichgewicht von 33% Monomer und 66% Dimer.

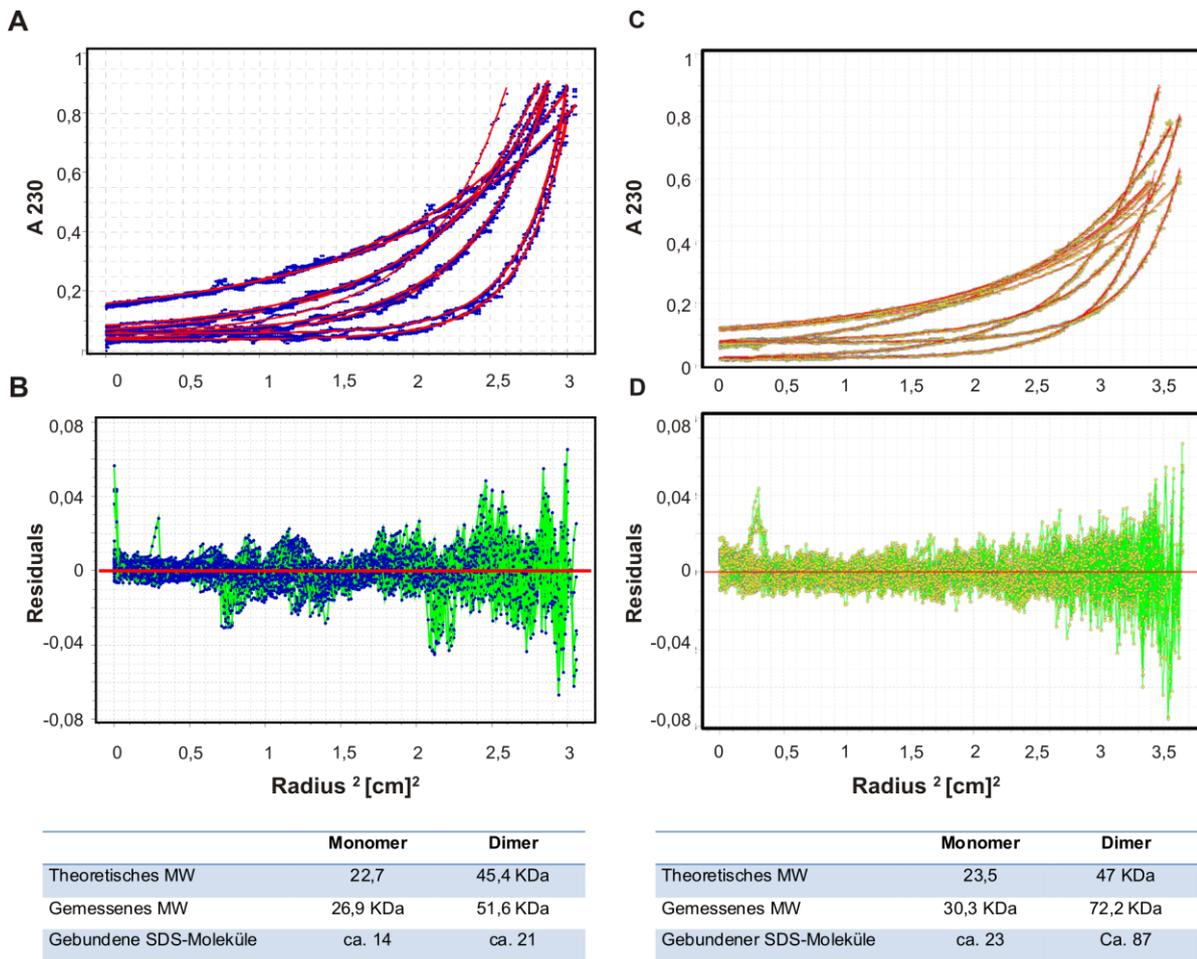


Abbildung 2.2: Oligomerisierungsgrad des pre-amyloid Stadiums von OvPrP und BovPrP

A/B 40 ng/μl OvPrP nach 5 tägiger Inkubation und **(C/D)** BovPrP nach 2 tägiger Inkubation bei 37°C (650 rpm) in 0,02 % SDS, 10 mM NaPi; 250 mM NaCl wurden mittels AUZ analysiert. **A/C** Verschiedene Konzentrationsprofile der Messläufe bei gegebenen Drehzahlen nach Einstellung des jeweiligen Gleichgewichtes zwischen Diffusion und Sedimentation. **B/D** Abweichungen der gefitteten Werte zu den ermittelten Daten.

2.3 Keiminduzierte Fibrillogenese

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PrP^{Sc}-Keiminduzierte Fibrillogenese von rekPrP auf die Spezies Rind, Maus und Schaf adaptiert. Durch Zugabe von, mittels NaPTA-Fällung aus Hirngewebe voraufgereinigtem PrP^{Sc} als Keim (siehe Kapitel 8.3), findet eine Beschleunigung der rekPrP-Amyloidbildung im Vergleich zum nicht keiminduzierten Fall statt. Als Kontrolle wurde

Hirngewebe gesunder Tiere analog behandelt und als Keim eingesetzt. In diesem Fall wurde die Amyloidbildung nicht beschleunigt (siehe Veröffentlichung 1).

Nachdem die Bedingungen für die spontanen Amyloidbildung von rekPrP der verschiedenen Spezies durch Einstellen der SDS-Konzentrationen etabliert werden konnten, wurden analog zur keiminduzierten Amyloidbildung von SHaPrP (Veröffentlichung 1) die keiminduzierten Amyloidbildungen mit rekPrP der anderen Spezies durchgeführt (siehe Kapitel 8.9.2). Im Fall von BovPrP kam es analog zur spontanen Amyloidbildung nur in 0,02 % SDS zu einer beschleunigten ThT-vermittelten Fluoreszenzerhöhung nach PrP^{Sc}-Keimzugabe (Abbildung 2.3 A). Die Lag-Phase ist von mehreren Wochen auf wenige Stunden verkürzt. Die Amyloidbildung ist spezifisch für BovPrP^{Sc} da diese bei der Negativkontrolle (PTA-gefälltem Keim aufgereinigt aus gesundem bovinem Hirngewebe) nur minimal ist (Veröffentlichung 2).

Um den eingesetzten BovPrP^{Sc}-Keim in Bezug auf die Stabilität gegenüber Proteolyse mit Proteinase K (PK) zu charakterisieren, wurde das NaPTA-Präzipitat aus Hirngewebe von BSE-infizierten Rindern und gesunden Kontrolltieren eine Proteolyse mit PK unterzogen. Anschließend wurden die Proben mittels Western Blot und immunologischem Nachweis untersucht (siehe Veröffentlichung 2). In vielen Studien wurde gezeigt, dass die infektiöse und pathologische PrP^{Sc}-Isoform PK-resistent ist und daher nicht vollständig durch PK abgebaut werden kann (siehe Kapitel 11). Die Western Blot Analyse zeigt, dass das hier verwendete BovPrP^{Sc} nur einen geringen Anteil an PK-resistentem BovPrP^{Sc} aufweist. Dies weist darauf hin, dass das in der keiminduzierten Amyloidbildung eingesetzte PrP^{Sc} zum überwiegenden Teil aus PK-sensitiven PrP^{Sc} besteht.

Die Struktur des pre-amyloiden Stadiums von BovPrP ist, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, SDS-konzentrationsabhängig. In Abbildung 2.3 B ist die keiminduzierte Amyloidbildung bei verschiedenen SDS-Konzentrationen, und somit bei verschiedenen BovPrP Ausgangsstrukturen, dargestellt (siehe Kapitel 8.9.2). An der für die spontane Amyloidbildung optimalen SDS-Konzentration von 0,02 % SDS ist eine PrP^{Sc} vermittelte Amyloidbildung des BovPrP erkennbar (ThT-Fluoreszenzerhöhung). Diese bleibt bei der Negativkontrolle aus. Bei den SDS-Konzentrationen von 0,03 bis 0,05 % SDS ist keine amyloidvermittelte ThT Fluoreszenzerhöhung auszumachen (pos. und neg.). Die niedrigere SDS Konzentration von 0,01 zeigt ebenfalls keine PrP^{Sc} spezifische Amyloidbildung. Hier ist in beiden Ansätzen eine ähnlich hohe Fluoreszenz sichtbar, was auf einen unspezifischen Effekt schließen lässt. Daher hängt die optimale keiminduzierte Amyloidbildung unter anderem von der BovPrP-Ausgangsstruktur ab.

Die keiminduzierte Konversion mittels PrP^{Sc}-Keim wurde analog zur Spezies Rind auf die Spezies Maus und Schaf übertragen. Aus den Versuchen mit BovPrP war bekannt, dass die Pufferbedingungen, die zur spontanen Amyloidbildung führen, auch für die keiminduzierte Amyloidbildung geeignet waren. In Abbildung 2.3 C, D ist analog zur BovPrP die keiminduzierte Amyloidbildung (ThT-Fluoreszenzerhöhung) von OvPrP und MuPrP dargestellt. Als Kontrolle wurde auch hier NaPTA-gefällter Keim aus Hirngewebe gesunder Kontrolltiere eingesetzt (neg.).

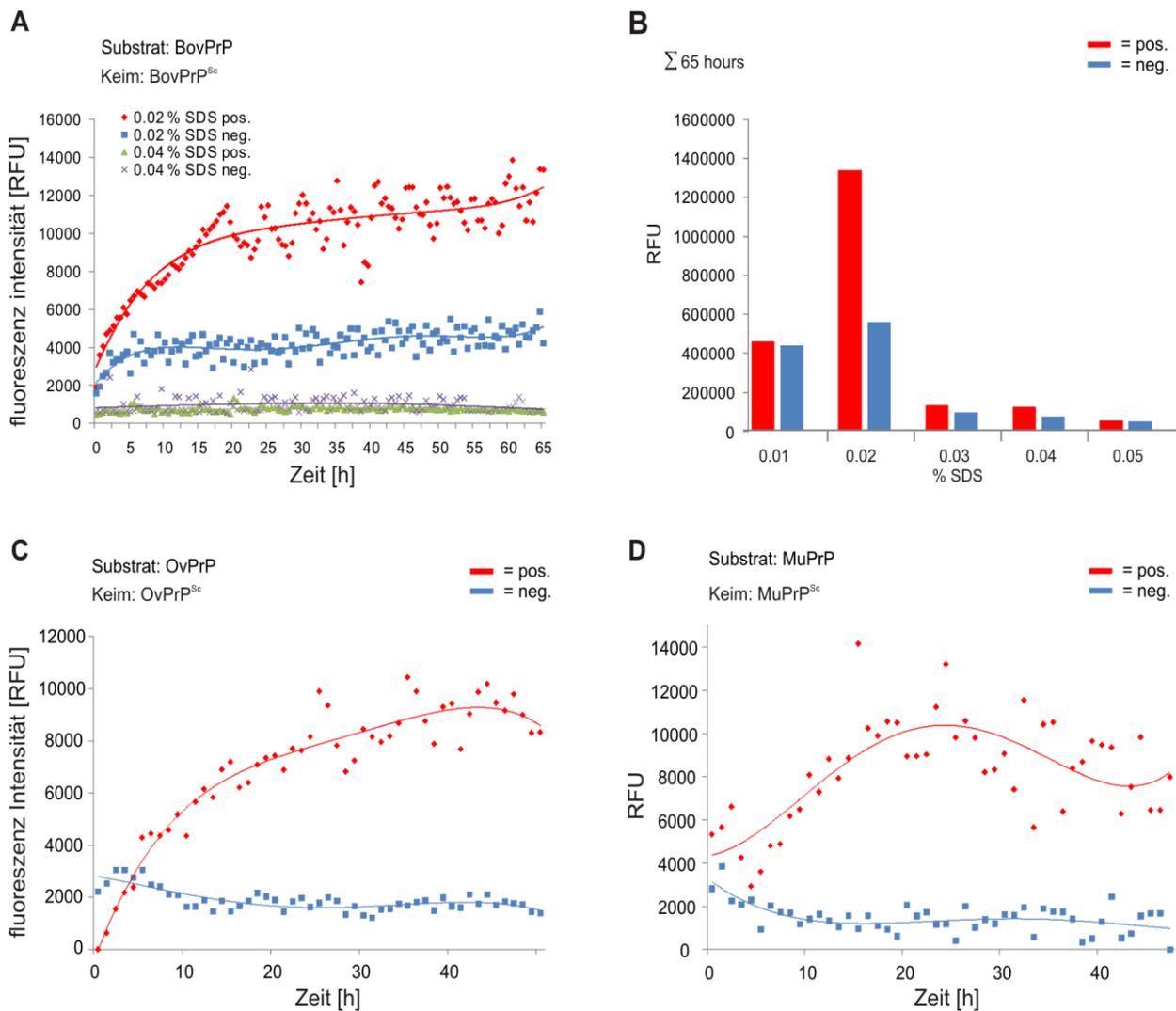


Abbildung 2.3: Intraspezies PrP^{Sc}-keiminduzierte Amyloidbildung von BovPrP, OvPrP und MuPrP

A Amyloidbildung von BovPrP (80 ng/ μ l) detektiert mittels ThT-Fluoreszenz-Assay mit BovPrP^{Sc} als Keim (10 mM NaPi pH 7,4; 250 mM NaCl bei 37°C). Messung alle 30 min. (MW von 495-505 nm der Emission bei einer Excitation von 445 nm). **B** Die verschiedenen Relativen Fluoreszenz Einheiten (RFU) sind für die verschiedenen SDS-Konzentrationen bei BovPrP und BovPrP^{Sc} aufgetragen (MW von 495-505 nm der Emission bei einer Excitation von 445 nm). **C** Amyloidbildung von OvPrP (40 ng/ μ l) OvPrP^{Sc} als Keim in 0,02 % SDS. Messung jede Stunde durchgeführt. **D** Amyloidbildung von MuPrP (30 ng/ μ l) mit MuPrP^{Sc} als Keim (0,04 % SDS). (Polynomische Ausgleichskurve durch die Datenpunkte berechnet).

Abbildung 2.3 C zeigt die OvPrP^{Sc} spezifische Amyloidbildung (rote Linie) von OvPrP. Die einzelnen Datenpunkte entsprechen einer Fluoreszenzmessung zu einem definierten Zeitpunkt. Durch Polynomische Regression wurde eine Ausgleichskurve berechnet (siehe Kapitel 8.11). Im Vergleich zur Amyloidbildung mittels PrP^{Sc}-Keim zeigt die Kontrolle keine Amyloidbildung (blaue Linie). Die Pufferbedingungen sind analog zur spontanen amyloiden Fibrillogenese auf 0,02% SDS eingestellt. Die OvPrP-Konzentration erwies sich bei 40 ng/μl (ca. 1,8 mM) als ideal. Bei der MuPrP^{Sc}-vermittelten Amyloidbildung von MuPrP (Abbildung 2.3 B) liegt die SDS-Konzentration, auch hier eingestellt nach der spontanen amyloiden Fibrillogenese, bei 0,04 % SDS. Die Konzentration wurde bei MuPrP auf 30 ng/μl eingestellt, was analog zu OvPrP ca. 1,8 mM entspricht. Auch hier zeigt die Kontrolle keine Amyloidbildung (blaue Linie).

2.4 Molekulare Spezies-Barriere

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die Transmission, bzw. die Barriere einer Transmission, zwischen verschiedenen Spezies auf molekularer Ebene nachzustellen und zu untersuchen. Dazu wurde die keiminduzierte Amyloidbildung von rekPrP genutzt (Kap. 2.3). In diesem System wurde rekPrP-Substrat und PrP^{Sc}-Keim verschiedener Spezies kombiniert. Dies stellt den Fall der Übertragung von Prionkrankheiten zwischen verschiedenen Spezies dar. Es wurden verschiedene, experimentell verifizierte Interspezies Transmissionen/Barrieren untersucht. Dazu wurden die Pufferbedingungen gemäß den Resultaten aus Kapitel 2.3 auf die Substrat(rekPrP)–Konversionsbedingungen eingestellt, bei denen zuvor eine keiminduzierte Beschleunigung der Amyloidbildung für die entsprechende Spezies gezeigt werden konnte.

Die keiminduzierte Amyloidbildung wurde, wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, gemessen. Allerdings wurden zur besseren Übersicht die Fluoreszenz-Werte der Plateau-Phase (24-48 Std.) in einem Balkendiagramm aufsummiert (Abbildung 2.4 A und Veröffentlichung 5). Exemplarisch ist die zugrundeliegende Kinetik der Interspezies-Transmission für SHaPrP^{Sc}-Keim und für OvPrP-Substrat gezeigt (Abbildung 2.4 B). Analog zur keiminduzierten Amyloidbildung innerhalb einer Spezies (Intraspezies) (siehe Kapitel 2.3) zeigt die *in vitro* Nachstellung der Transmission zwischen unterschiedlichen Spezies, für die bekannt ist, dass *in vivo* eine Übertragung möglich ist, einen ähnlichen Kurvenverlauf der keiminduzierten

Amyloidbildung auf (vgl. Abbildung 2.3 und Abbildung 2.4 B). Untersucht wurden die Kombination von OvPrP^{Sc} und SHaPrP, OvPrP^{Sc} und BovPrP, SHaPrP^{Sc} und OvPrP, SHaPrP^{Sc} und BovPrP und abschließend BovPrP^{Sc} und OvPrP. Für diese Interspezies Transmission ist bekannt, dass *es in vivo* zu einer Übertragung von Prionkrankheiten zwischen diesen Spezies kommen kann. Darunter ist auch die für den Ausbruch der Bovinen Prion-Krankheit verantwortlich gemachte Übertragung von Schaf Scrapie auf Rinder (siehe Kapitel 1.8). Bei allen fünf *in vitro*-Ansätzen ist die ThT-Fluoreszenzzunahme in Anwesenheit von PrP^{Sc} im Vergleich zur Kontrolle stark erhöht. Die absolute Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Spezies-Kombinationen wird dadurch limitiert, dass die Substratkonzentrationen und die SDS-Konzentrationen jeweils den Amyloidbedingungen angepasst wurden, welche optimal für die Amyloidbildungen sind (siehe Kapitel 2.3). Im Gegensatz zu den Spezies-Kombinationen, bei denen eine *in vivo* Übertragbarkeit beschrieben wurde, bleibt eine keiminduzierte Amyloidbildung für die Kombinationen BovPrP^{Sc}/SHaPrP und SHaPrP^{Sc}/MuPrP, aus. MuPrP zeigt nach Zugabe von SHaPrP^{Sc} über einen Zeitraum von 48 h keine Erhöhung des Amyloidanteils (Abbildung 2.4 C). *In vivo* Studien zeigten, dass es nicht möglich ist Mäuse mit Scrapie aus Syrian Hamster zu infizieren (Kimberlin *et al.*, 1978). Somit konnte sowohl die Interspezies-Transmission als auch die Interspezies-Barriere auf molekularer Ebene ausschließlich mit aufgereinigten proteinösen Komponenten nachgestellt werden.

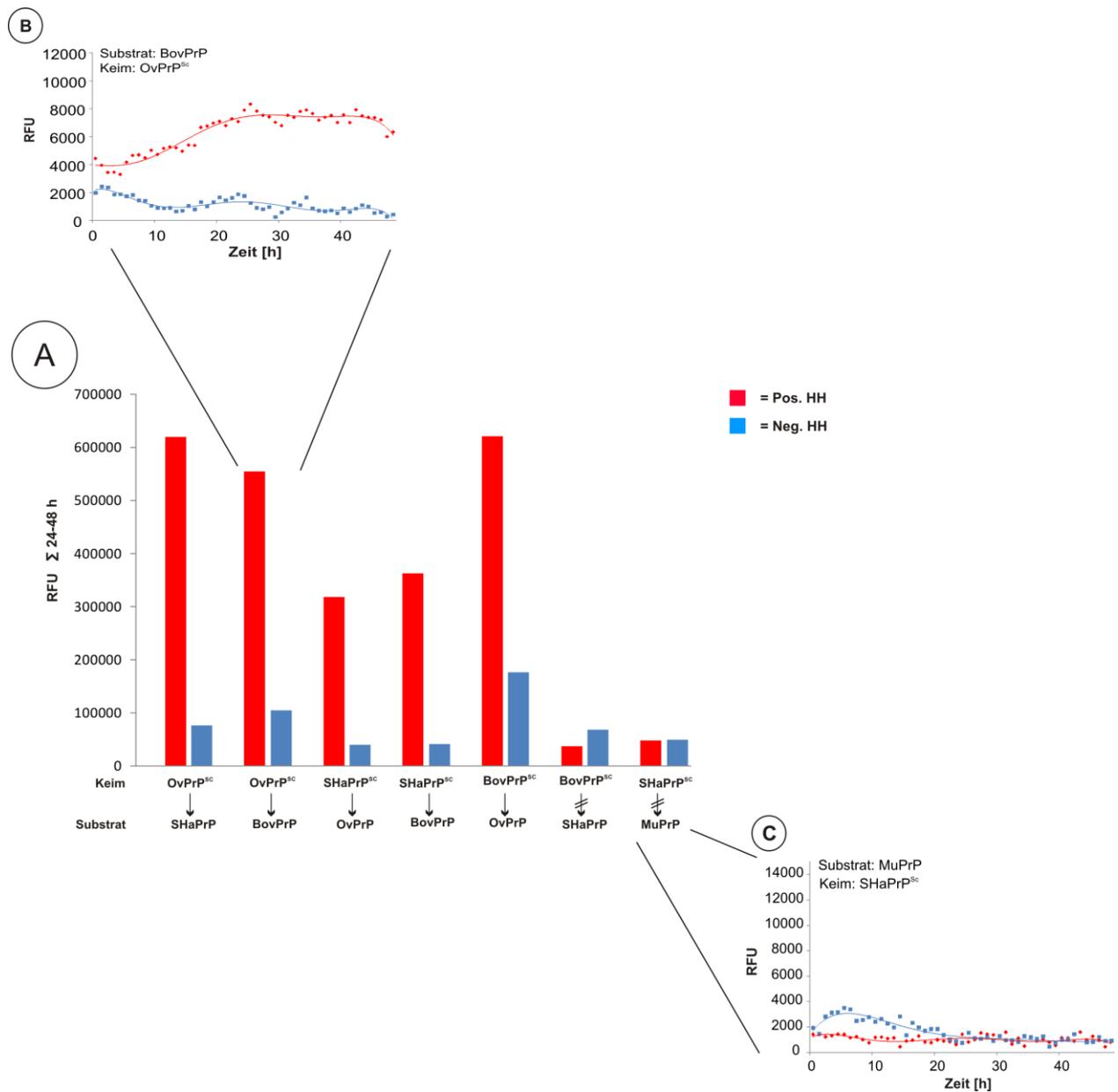


Abbildung 2.4: Nachstellung der Interspezies-Transmission und -Barriere *in vitro*

A Die Amyloidbildung von rekPrP wurde mittels Thioflavin T Fluoreszenzmessung über 48 Std. verfolgt, indem alle 60 min die Mittelwerte der Fluoreszenz (λ_{em} von 495-505 nm bei λ_{ex} 445 nm) analysiert wurden. Die Fluoreszenzwerte des Zeitraums von 24 bis 48 Std (Plateauphase) wurden summiert. Der Puffer und die rekPrP Konzentration entsprechen denen der Keiminduzierten Intraspezies Amyloidbildung. Die Spezies von Substrat und Keim sind im Diagramm ausgewiesen. **B** Kinetik der keiminduzierten Amyloidbildung von OvPrP, welches mit SHaPrP^{Sc} versetzt wurde als Beispiel der Interspezies Transmission. **C** Kinetik keiminduzierten Amyloidbildung MuPrP welches mit SHaPrP^{Sc} versetzt wurde, als Beispiel für eine Spezies-Barriere.

2.5 Einfluss von Sekundärfaktoren auf die PrP-Aggregation

2.5.1 Amyloidbildung von rekPrP in Gegenwart von Glykogen

Veröffentlichung 4: Aggregation and Amyloid Fibril Formation of the Prion Protein is Accelerated in the Presence of Glycogen

Giannantonio Panza, Jan Stöhr, Eva Birkmann, Detlev Riesner, Dieter Willbold, Otto Baba, Tatsuo Terashima and Christian Dumpitak

Rejuvenation Research; vol. 11; no. 2; s. 365-369

Mit Hilfe des SDS-basierten *in vitro* Konversionssystems für rekPrP sollte der Einfluss von Sekundärfaktoren auf die Amyloidbildung analysiert werden. Als Sekundärfaktor wurde das Polysaccharid (Glykogen) untersucht, da Polysaccharide in natürlichen Prionen detektiert wurden und daher von besonderem Interesse sind (Dumpitak *et al.*, 2005). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Veröffentlichung 4 dargestellt. Beide Proben wurden bei 37 °C im Konversionspuffer über ca. 20 h gemessen. Über den gemessenen Zeitverlauf zeigte die Probe mit dem spontanen rekPrP Ansatz ohne Glykogen keinerlei ThT spezifische Fluoreszenzerhöhung. Im Gegensatz dazu zeigt die Probe mit Glykogen eine Fluoreszenzerhöhung nach ca. 5 h, was einer Beschleunigung der Amyloidbildung des rekPrP in Gegenwart von Glykogen entspricht. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Glykogen die spontane Amyloidbildung von SHaPrP der Vollängensequenz wie auch der N-terminal verkürzten Form beschleunigt (Abb. 1 G, Veröffentlichung 4).

2.5.2 Einfluss von Advanced Glycation Endproducts auf die rekPrP Aggregation

Veröffentlichung 5: Influence of the Maillard reaction to prion protein misfolding and aggregation

Giannantonio Panza, Christian Dumpitak and Eva Birkmann

Rejuvenation Research ID: REJ-2009-0954 (Manuskript "in press")

„Advanced glycation endproducts“ (AGE) entstehen durch die Maillard-Reaktion, eine Reaktion zwischen freien Aminogruppen von Proteinen und reduzierenden Zuckern und stellen somit kovalent gebundene Proteinmodifikationen dar. In diesem Teil der Arbeit wurde der Einfluss von AGEs auf das Aggregationsverhalten von SHaPrP(29-231) untersucht. Dazu wurde SHaPrP *in vitro* AGE-modifiziert. AGE-modifiziertes sowie nicht modifiziertes PrP wurde im SDS-basierten Konversionssystem untersucht. Die AGEs beeinflussen SHaPrP dahingehend, dass die Amyloidbildung verhindert wird, aber keine gesteigerte Unlöslichkeit im Vergleich zum nicht AGE-modifizierten Versuchsansatz auftritt (siehe Veröffentlichung 5 Abb. 1 D/E).

Zusammenfassend beeinflusst die Aggregation von Proteinen sowohl Sekundärfaktoren, die nicht kovalent gebunden werden, als auch Proteinmodifikationen die nicht enzymatisch, über einer längeren Lebensdauer, kovalent ans Protein gebunden werden.

3 Diskussion

3.1 Rolle des pre-amlyoiden Struktur bei der Amyloidbildung von rekPrP

Neurodegenerative Erkrankungen, die mit Protein-Fehlfaltung einhergehen, haben als molekulare Besonderheit die Konversion eines zellulären Proteins in eine pathologische Isoform (siehe Kapitel 1.1). Bei Prionerkrankungen ist die Konversion von zellulären PrP zur krankheitsassoziierten Isoform PrP^{Sc} das essentielle molekulare Ereignis. Das besondere bei Prionkrankheiten ist die Übertragbarkeit auch zwischen verschiedenen Spezies. Bei einer Infektion von PrP^{Sc} wird PrP^C mittels struktureller Konversion in die PrP^{Sc}-Konformation überführt (siehe Kapitel 1.6).

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Grundlagen der PrP-Konversion und insbesondere der PrP^{Sc}-Keimvermittelten Konversion von PrP^C untersucht. Die Prion-vermittelte Konversion von zellulären PrP, wurde mittels aufgereinigter Einzelkomponenten nachgestellt. Die Amyloidbildung von rekPrP wurde durch keiminduzierte Amplifikation mit aufgereinigtem PrP^{Sc} beschleunigt. Dies ist ein Model für den Infektionsfall. Die Sekundärstruktur des löslichen pre-amlyoiden Stadiums von rekPrP von verschiedenen Spezies wurde vergleichend untersucht (siehe). Bei Hamster, Maus und Schaf wies die Struktur des pre-amlyoiden Stadiums von rekPrP eine α -helikal/random coil dominierte Sekundärstruktur auf (siehe Veröffentlichung 1, 4). Im Gegensatz dazu weist die Sekundärstruktur des pre-amlyoid-Stadiums von BovPrP eine β -Faltblatt-dominierte Struktur auf. Die N-terminal verkürzte Form des BovPrP(102-241) zeigte wiederum ein α -helikal/random coil dominierte Sekundärstruktur. Dieser Vergleich zeigte, dass der Strukturunterschied sowohl auf die Vollängensequenz des Prion-Proteins als auch auf die Aminosäureunterschiede zwischen den Spezies zurückführbar ist (siehe Veröffentlichung 2). Für alle mittels AUZ analysierten Spezies konnte ein Monomer-Dimer Gleichgewicht für den pre-amlyoiden Zustand von rekPrP gezeigt werden (siehe Veröffentlichung 1) (siehe Kapitel 2.2.2).

Der „pre-amlyoid-state“ ist auch für die keimabhängige Amyloidbildung von rekPrP von entscheidender Bedeutung. Mittels Variation der SDS-Konzentration bei der keimabhängigen Amyloidbildung von BovPrP (siehe Veröffentlichung 2) konnte gezeigt werden, dass die Bildung

von amyloiden Fibrillen nur dann stattfindet, wenn der zuvor beschriebene „pre-amyloid-state“ vorlag. Lag dieser nicht vor, konnte keine beschleunigte keiminduzierte Amyloidbildung erreicht werden.

3.2 Ausbildung der Spezies-Barriere ist auf molekularer Protein-Ebene möglich

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Spezies-Barriere auf molekularer Ebene. Dazu wurde die keimvermittelte Amyloidbildung dahingehend variiert, dass PrP-Substrat und PrP^{Sc}-Keim von verschiedenen Spezies kombiniert wurden. *In vivo* sind sowohl Transmissionen als auch Übertragungsbarrieren der Prionkrankheit zwischen verschiedenen Spezies bekannt. Die Möglichkeit dass die Ausbildung einer Transmission bzw. einer Barriere auf molekularer Ebene vermittelt wird, ist Thema verschiedener Untersuchungen gewesen. Darunter sind neben PMCA (Soto *et al.*, 2002), welches allerdings mit unaufgereinigtem Hirnhomogenat arbeitet, besonders die Arbeiten von Surewicz und Kollegen zu nennen (Surewicz *et al.*, 2006). Dabei gelang es die Vermittlung der Übertragungsbarriere *in vitro* zwischen amyloiden Fibrillen aus rekPrP hergestellt, und Monomeren (nur kleinere Aminosäureabschnitte (23-144) der PrP-Volllänge) verschiedener Spezies nachzustellen. Einschränkend muss man anmerken, dass diese Daten mit Volllänge-PrP nicht reproduziert werden konnten, wobei der experimentelle Ansatz unverändert blieb (Makarava *et al.*, 2007).

Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz beruht ebenfalls auf der molekularen Interaktion von proteinösen Keim und rekPrP-Substrat. Allerdings ist der Keim aus dem Hirn erkrankter Tiere mittels NaPTA-Fällung aufgereinigt. Somit ist ein Vorteil dieses *in vitro*-Systems dass der Aggregationskeim natürlichem PrP^{Sc} sehr nahe kommt (siehe Kapitel 8.3). Die Konversion fand, wie schon oben erläutert, nur unter definierten Pufferbedingungen statt, wobei besonders die SDS-Konzentration als entscheidender Faktor für die keiminduzierte Konversion zu nennen ist.

Tabelle 3: Interspezies-Transmission und -Barriere

Intraspezies Transmission: + // Interspezies Transmission + // Interspezies Barriere - // Interspezies Transmission mit Transgenen Tieren (+)

A *In vivo*

	Bov recPrP	Ov recPrP	SHa recPrP	Mu recPrP
BovPrP ^{Sc}	+	+	-	+
OvPrP ^{Sc}	+	+	+	+
SHaPrP ^{Sc}	(+)	(+)	+	-
MuPrP ^{Sc}	(+)	(+)	+	+

B *In vitro*

	Bov recPrP	Ov recPrP	SHa recPrP	Mu recPrP
BovPrP ^{Sc}	+	+	-	n.d.
OvPrP ^{Sc}	+	+	+	n.d.
SHaPrP ^{Sc}	+	+	+	-
MuPrP ^{Sc}	n.d.	n.d.	n.d.	+

In der Tabelle 3 A sind die *in vivo* bestätigten Spezies-Barrieren und -Transmissionen von Prionkrankheiten zusammengefasst. Die Transmission von Maus und Syrian Hamster Scrapie auf Rinder und Schafe sind allerdings nur mit transgenen Mäusen als Wirt etabliert (siehe Kapitel 1.8.3). Besonders beachtenswert sind die Spezies-Barrieren von BSE auf Syrian Hamster und von Hamster-Scrapie auf Mäuse. Die verschiedenen Transmissionen bzw. Barrieren konnte im *in vitro* Konversionssystem nachgestellt werden (siehe Tabelle 3 B). Somit ist es gelungen die Übertragung und die Übertragungsbarriere, mittels des für die Prionkrankheit verantwortlichen Faktors (PrP^{Sc}), und durch Konversion von rekPrP auf molekularer Ebene nachzustellen. Die keiminduzierte Amyloidbildung konnte somit auf dem „nucleation-dependent nucleation process“ zurückgeführt werden (Kapitel 1.6). Aus diesen Experimenten kann man nun verschiedene Rückschlüsse auf die Prion-Eigenschaften ziehen: (i) die Fähigkeit als Aggregationskeim zu agieren ist von der PrP^{Sc} Konformation abhängig, (ii) die Interaktion von Seed und PrP-Monomeren hängt von den möglichen Übergangsstrukturen des monomeren PrPs sowie der Keim-Konformation ab, (iii) ist eine Interaktion von Seed und PrP-Monomer möglich, hängt die mögliche Amplifikation des Keims durch PrP Konversion davon ab, ob das PrP die Keim-Konformation annehmen kann oder nicht. Diese Fähigkeit bestimmt, ob eine

Konversionsbarriere entsteht, oder eine Transmission möglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit, konnte das Phänomen der Spezies-Barriere oder der Interspezies-Transmission auf eine molekulare Ebene eingeschränkt werden. Dies schließt nicht aus, dass zelluläre Prozesse die Artenbarriere unterstützen oder einschränken können, aber essentiell scheint die reine PrP^C PrP^{Sc}-Interaktion zu sein. Dies steht im Einklang mit der „Protein-only-Hypothese“ (Prusiner *et al.*, 1980). Diese Ergebnisse werden durch Beobachtungen einer Protein-konformationvermittelten Ausbreitung bzw. Barriere auch vom Feld der „Hefe-Prionen“ bestärkt (Chien *et al.*, 2004).

3.3 Einfluss von nicht-Protein Faktoren auf die Amyloidbildung

Nach der Protein-only Hypothese besteht der Erreger der Prionkrankheit ausschließlich aus proteinösen Bestandteilen. Spätestens seitdem Infektiosität mittels ausschließlich rekombinantem MuPrP erreicht wurde (Legname *et al.*, 2004), scheint diese Hypothese bewiesen zu sein. Bei dieser Studie konnte allerdings der Infektions-Titer von natürlichem Prionerreger nicht erreicht werden. Durch die Addition einzelner Faktoren zu rekPrP gelang es Supattapone RNAs bestimmter Größe als wichtigen Kofaktor für die Infektiosität zu bestimmen (Geoghegan *et al.*, 2007). Da verschiedene Sekundärfaktoren zur Ausbildung der Prionkrankheit nicht unabdingbar zu sein scheinen (Legname *et al.*, 2004) aber als Verstärker auftreten könnten (Geoghegan *et al.*, 2007) wurde in Veröffentlichung 4 und in Veröffentlichung 5 der Einfluss von nicht-Protein-Faktoren auf das Aggregationsverhalten von rekPrP untersucht. So beschleunigt Glykogen, als ein Modell für das bei der Aufreinigung von Prionen koaufgereinigte Prion-Scaffold, die Amyloidbildung des rekPrP (siehe Veröffentlichung 4). Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass Glykogen als Aggregationskeim die Konversion von PrP fördert. Im Gegensatz dazu scheinen kovalent gebundene AGEs (advanced glycation endproducts) die PrP-Amyloidbildung zu verhindern (siehe Veröffentlichung 5). Dies steht im Einklang damit, dass in Prionpräparationen weniger AGE-Modifikationen nachgewiesen wurden als in PrP^C-Präparationen. Zudem wurde kürzlich über die desinfizierende Wirkung der Maillard-Reaktion auf Prioninfektiosität berichtet (Suyama *et al.*, 2007).

3.4 Keiminduzierte Amyloidbildung zur Diagnose von Proteinfehlfaltungs-Krankheiten: Ein Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die spontan und die keiminduziert beschleunigte Amyloidbildung von Syrian Hamster PrP auf die Spezies; Schaf, Rind und Maus übertragen werden. Darüber hinaus konnte auf molekularer Ebene die Bedeutung der keiminduzierten Konversion auf die Interspezies Barriere untersucht werden. Neben den bereits in dieser Arbeit untersuchten Spezies sind die Übertragungen des Systems auf humanem PrP von besonderem Interesse, um zu untersuchen von welcher Spezies ein Gefahrenpotential für Menschen ausgeht. Eine aktuelle Gefahrenquelle stellt z.B. die mögliche Übertragung von CWD (chronic wasting disease) durch Verzehr von kontaminiertem Material dar. In weitergehenden Arbeiten könnte man durch die Wahl von cervidem PrP^{Sc} und HuPrP als Substrat diese wichtige Interspezies Wechselwirkung auf molekularer Ebene untersuchen. Durch die Möglichkeit die Untersuchungen auf verschiedene Spezies auszuweiten, könnte man darüber hinaus mögliche Zwischenwirte identifizieren.

Neben dem Ansatz die keiminduzierte Amyloidbildung von PrP zur Untersuchung der molekularen Faktoren der Interspezies Barriere einzusetzen, ist als weiteres Einsatzgebiet die Diagnose von Prionerkrankungen und von Proteinfehlfaltungskrankheiten im Allgemeinen denkbar. Dabei könnte die beschleunigte Amyloidbildung von rekPrP in Anwesenheit von PrP^{Sc} als diagnostischer Marker herangezogen werden. Detektiert wird die Bildung von amyloiden Fibrillen spezifisch mittels Thioflavin T. Der Vorteil dieser Detektion ist das Thioflavin T in Abwesenheit von amyloiden Strukturen eine sehr geringe Fluoreszenz hat, nur in Anwesenheit von amyloiden Strukturen ist eine Fluoreszenzerhöhung detektierbar. Dieses Prinzip wurde in abgewandelter Form bereits zum Nachweis von A β -Aggregaten angewandt (Pitschke *et al.*, 1998) und sollte somit zur Diagnostik der Alzheimerischen Demenz dienen. Vorarbeiten zu einer Detektion von Aggregaten durch keiminduzierte Amyloidbildung, wurden mittels FCS (Fluoreszenz Korrelation Spektroskopie) mit Insulin in amyloider Form durchgeführt. Eine Übertragung dieses Prinzips auf PrP^{Sc} und rekPrP als Substrat ist in naher Zukunft geplant. Theoretisch ist dieses System für jegliche Krankheit anwendbar bei der Proteinaggregation eine entscheidende Rolle spielt.

4 Zusammenfassung

Prionen sind Erreger von Prionkrankheiten, von denen Menschen und Tieren betroffen sein können. Prionkrankheiten sind fatale neurodegenerative Erkrankungen, die eine infektiöse, spontane oder genetische Ätiologie aufweisen können. Der Hauptbestandteil von Prionen ist die krankheitsassoziierte Isoform des Prion-Proteins (PrP^{Sc}). Das Prion-Protein ist ein wirtseigenes Protein, welches auch im gesunden Organismus exprimiert wird (PrP^{C}). Das zentrale molekulare Ereignis bei Prionkrankheiten ist die Konversion des überwiegend α -helikalen, PK-sensitiven, monomeren und nicht infektiösen PrP^{C} zum β -Faltblatt-dominierten, teilweise PK-resistenten, aggregierte und infektiösen PrP^{Sc} . Diese strukturelle Konversion kann anhand eines auf Natriumdodecylsulfat (SDS) und NaCl basierten *in vitro*-Konversionssystem mittels rekombinanten PrPs simuliert werden. Nach mehrwöchiger Inkubationszeit bilden sich fibrilläre PrP-Aggregate, die in vielen Eigenschaften PrP^{Sc} ähneln. Diese spontane Fibrillenbildung ist ein Modellsystem für die spontane Krankheits-Ätiologie. Bei Zugabe eines externen PrP^{Sc} -Keimes erfolgt die Fibrillenbildung innerhalb weniger Stunden. Dies ist ein Modellsystem für die infektiöse Ätiologie.

Ziel dieser Arbeit war es, das *in vitro*-Konversionssystem sowohl für die spontane als auch für die keiminduzierte Fibrillogenese auf verschiedene PrP-Sequenzen verschiedener Spezies zu übertragen. Darüber hinaus sollte, durch Kombination von PrP^{Sc} -Keim und rekombinanten PrP mit der Sequenz verschiedener Spezies das Phänomen der Spezies-Barriere bzw. der Interspezies Transmission von Prionkrankheiten auf molekularer Ebene analysiert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das *in vitro*-Konversionssystem auf die homogenen Systeme Rind, Schaf und Maus anwendbar ist. Die Eigenschaften des „pre-amyloid-state“ von rekPrP der verschiedenen Spezies wurden mittels Circular-Dichroismus und analytischer Ultrazentrifugation untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass nur bestimmte Intermediate (bei definierten SDS-Konzentrationen) zu amyloiden Fibrillen führen. Die amyloide Charakter der Aggregate wurde mit den amyloidspezifischen Farbstoffen Thioflavin T (ThT) und Kongorot nachgewiesen und die fibrilläre Morphologie mittels elektronenmikroskopischen Aufnahmen verifiziert. Durch Variation von PrP^{Sc} -Keimen und rekPrP-Substrat aus verschiedenen Spezies konnte die Interspezies-Barriere bzw. Transmission auf molekularer Ebene nachgestellt werden.

Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Spezies Barriere bzw. Transmission auf molekularer Ebene von den Protein-Konformationen abhängt.

5 Summary

Prions are the causative agents of prion diseases that affect humans and animals. Prion diseases are fatal neurodegenerative diseases with an infectious, spontaneous or genetic etiology. The main component of prions is the disease-associated isoform of the prion-protein (PrP^{Sc}). The prion-protein is a host encoded cellular protein (PrP^C). The molecular key event in prion diseases is the conversion of the predominantly α -helical, PK-sensitive, monomeric and non-infectious PrP^C to β -sheet dominated, partially proteinase K-resistant, aggregated and infectious PrP^{Sc}. The konformational conversion of PrP can be simulated in a sodium dodecyl sulfate (SDS) and NaCl-based *in vitro* conversion system using recombinant PrP. After several weeks of incubation fibrillar PrP aggregates are formed, which are in many properties similar to PrP^{Sc}. This spontaneous fibril formation is a model system for the spontaneous disease etiology. With the addition of an external PrP^{Sc}-seed the amyloid fibrils formation is accelerated to hours, which is a model system for infectious etiology.

The aim of this study was to transfer the *in vitro* conversion system for both the spontaneous as well as for the seed-induced amyloid formation to different PrP sequences of different species. Moreover, the phenomena of species barrier and interspecies transmission of prion diseases should be analyzed at the molecular level by a combination of PrP^{Sc}-seed and recombinant PrP from a different species.

In this study it was shown that the *in vitro* conversion system is applicable to the homogenous species systems of cattle, sheep and mouse. The properties of the pre-amyloid state of recPrP of the different species were examined using circular dichroism and analytical ultracentrifugation. It was shown that only a particular intermediate state (within defined concentrations of SDS) results to amyloid fibrils. The amyloid character of the aggregates was verified with the amyloid-specific dyes Thioflavin T (ThT) and Congo red, and fibrillar morphology was verified using electron microscopy. By variation of PrP^{Sc}-seed and recPrP-substrate from different species, the interspecies transmission or barrier could be simulated on the molecular level for the first time. Therefore the primary recognition of PrP^{Sc} and PrP^C is a direct molecular interaction;

cellular factors might help, but only in increasing the pre-existing interaction This leads to the conclusion that the species barrier and/or species transmission depends on the protein conformation.

6 Literaturverzeichnis

- A.R. Dinner, A.S., L.J. Smith, C.M. Dobson, M. Karplus,. 2000. Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends Biochem. Sci.* 25:331-339.
- Alper, T., W.A. Cramp, D.A. Haig, and M.C. Clarke. 1967. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature.* 214:764-6.
- Alper, T., D.A. Haig, and M.C. Clarke. 1966. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun.* 22:278-84.
- Apetri, A.C., K. Surewicz, and W.K. Surewicz. 2004. The effect of disease-associated mutations on the folding pathway of human prion protein. *J Biol Chem.* 279:18008-14.
- Arai, M., and K. Kuwajima. 2000. Role of the molten globule state in protein folding. *Adv Protein Chem.* 53:209-82.
- Asante, E.A., J.M. Linehan, M. Desbruslais, S. Joiner, I. Gowland, A.L. Wood, J. Welch, A.F. Hill, S.E. Lloyd, J.D. Wadsworth, and J. Collinge. 2002. BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J.* 21:6358-66.
- Baskakov, I.V., and L. Breydo. 2007. Converting the prion protein: what makes the protein infectious. *Biochim Biophys Acta.* 1772:692-703.
- Belt, P.B., I.H. Muileman, B.E. Schreuder, J. Bos-de Ruijter, A.L. Gielkens, and M.A. Smits. 1995. Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol.* 76 (Pt 3):509-17.
- Beringue, V., A. Bencsik, A. Le Dur, F. Reine, T.L. Lai, N. Chenais, G. Tilly, A.G. Biacabe, T. Baron, J.L. Vilotte, and H. Laude. 2006. Isolation from cattle of a prion strain distinct from that causing bovine spongiform encephalopathy. *PLoS Pathog.* 2:e112.
- Beringue, V., J.L. Vilotte, and H. Laude. 2008. Prion agent diversity and species barrier. *Vet Res.* 39:47.
- Biancalana, M., K. Makabe, A. Koide, and S. Koide. 2009. Molecular mechanism of thioflavin-T binding to the surface of beta-rich peptide self-assemblies. *J Mol Biol.* 385:1052-63.
- Birkmann, E., O. Schafer, N. Weinmann, C. Dumpitak, M. Beekes, R. Jackman, L. Thorne, and D. Riesner. 2006. Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion. *Biol Chem.* 387:95-102.
- Blake, C., and L. Serpell. 1996. Synchrotron X-ray studies suggest that the core of the transthyretin amyloid fibril is a continuous beta-sheet helix. *Structure.* 4:989-98.

- Bolton, D.C., M.P. McKinley, and S.B. Prusiner. 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*. 218:1309-11.
- Bossers, A., P. Belt, G.J. Raymond, B. Caughey, R. de Vries, and M.A. Smits. 1997. Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:4931-6.
- Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R.A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, and C. Weissmann. 1993. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*. 73:1339-47.
- Bueler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H.P. Lipp, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, M. Aguet, and C. Weissmann. 1992. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*. 356:577-82.
- Buschmann, A., A. Gretzschel, A.G. Biacabe, K. Schiebel, C. Corona, C. Hoffmann, M. Eiden, T. Baron, C. Casalone, and M.H. Groschup. 2006. Atypical BSE in Germany--proof of transmissibility and biochemical characterization. *Vet Microbiol*. 117:103-16.
- Buschmann, A., and M.H. Groschup. 2005. Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis*. 192:934-42.
- Callahan, M.A., L. Xiong, and B. Caughey. 2001. Reversibility of scrapie-associated prion protein aggregation. *J Biol Chem*. 276:28022-8.
- Castilla, J., P. Saa, C. Hetz, and C. Soto. 2005a. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*. 121:195-206.
- Castilla, J., P. Saa, and C. Soto. 2005b. Detection of prions in blood. *Nat Med*. 11:982-5.
- Caughey, B., D.A. Kocisko, G.J. Raymond, and P.T. Lansbury, Jr. 1995. Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem Biol*. 2:807-17.
- Caughey, B., and P.T. Lansbury. 2003. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci*. 26:267-98.
- Cerda-Costa, N., A. Esteras-Chopo, F.X. Aviles, L. Serrano, and V. Villegas. 2007. Early kinetics of amyloid fibril formation reveals conformational reorganisation of initial aggregates. *J Mol Biol*. 366:1351-63.
- Chandler, R.L. 1961. Encephalopathy in mice produced by oculation with Scrapie brain material. *Lancet*. 1:1378-1379.
- Chien, P., J.S. Weissman, and A.H. DePace. 2004. Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annu Rev Biochem*. 73:617-56.

- Chiti, F., P. Webster, N. Taddei, A. Clark, M. Stefani, G. Ramponi, and C.M. Dobson. 1999. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:3590-4.
- Clark, P.L. 2004. Protein folding in the cell: reshaping the folding funnel. *Trends Biochem Sci.* 29:527-34.
- Cohen, F.E., K.M. Pan, Z. Huang, M. Baldwin, R.J. Fletterick, and S.B. Prusiner. 1994. Structural clues to prion replication. *Science.* 264:530-1.
- Collinge, J., and A.R. Clarke. 2007. A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science.* 318:930-6.
- Collinge, J., and M. Rossor. 1996. A new variant of prion disease. *Lancet.* 347:916-7.
- Colon, W., and J.W. Kelly. 1992. Partial denaturation of transthyretin is sufficient for amyloid fibril formation in vitro. *Biochemistry.* 31:8654-60.
- Come, J.H., P.E. Fraser, and P.T. Lansbury, Jr. 1993. A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:5959-63.
- Creutzfeldt, H.G. 1920. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol Psychatry.* 57:1-18.
- Crozet, C., F. Flamant, A. Bencsik, D. Aubert, J. Samarut, and T. Baron. 2001. Efficient transmission of two different sheep scrapie isolates in transgenic mice expressing the ovine PrP gene. *J Virol.* 75:5328-34.
- Cuillè J., C.P.-L. 1936. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *Comptes Rendus Acad. Sci.* 203:1552-1554.
- DeBurman, S.K., G.J. Raymond, B. Caughey, and S. Lindquist. 1997. Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:13938-43.
- Demeler, B., and H. Saber. 1998. Determination of molecular parameters by fitting sedimentation data to finite-element solutions of the Lamm equation. *Biophys J.* 74:444-54.
- Dill, K.A., and H.S. Chan. 1997. From Levinthal to pathways to funnels. *Nat Struct Biol.* 4:10-9.
- Donne, D.G., J.H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T.L. James, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, P.E. Wright, and H.J. Dyson. 1997. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:13452-7.
- Dumpitak. 2003. Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Polysacchariden und alterungsassozierten Proteinmodifikationen bei Prionen. *Inaugural-Dissertation.*

- Dumpitak, C., M. Beekes, N. Weinmann, S. Metzger, K.F. Winklhofer, J. Tatzelt, and D. Riesner. 2005. The polysaccharide scaffold of PrP 27-30 is a common compound of natural prions and consists of alpha-linked polyglucose. *Biol Chem.* 386:1149-55.
- Eanes, E.D., and G.G. Glenner. 1968. X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem.* 16:673-7.
- Eigen, M. 1996. Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys Chem.* 63:A1-18.
- Eigen, M. 2001. BSE und das Prionen-Problem. *Spektrum der Wissenschaft*:40-49.
- Elsen, J.M., Y. Amigues, F. Schelcher, V. Ducrocq, O. Andreoletti, F. Eychenne, J.V. Khang, J.P. Poivey, F. Lantier, and J.L. Laplanche. 1999. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol.* 144:431-45.
- Endo, T., D. Groth, S.B. Prusiner, and A. Kobata. 1989. Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry.* 28:8380-8.
- Ferguson, N., J. Becker, H. Tidow, S. Tremmel, T.D. Sharpe, G. Krause, J. Flinders, M. Petrovich, J. Berriman, H. Oschkinat, and A.R. Fersht. 2006. General structural motifs of amyloid protofilaments. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:16248-53.
- Gajdusek, D.C.e.a. 1966. Attempts to demonstrate a transmissible agent in kuru, Amyotrophic Lateral Sklerosis (ALS), and other sub-acute and chronic nervous system degenerations of man. *Nature.* 209:794-796.
- Geoghegan, J.C., P.A. Valdes, N.R. Orem, N.R. Deleault, R.A. Williamson, B.T. Harris, and S. Supattapone. 2007. Selective incorporation of polyanionic molecules into hamster prions. *J Biol Chem.* 282:36341-53.
- Glabe, C.G., and R. Kaye. 2006. Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis. *Neurology.* 66:S74-8.
- Glenner, G.G. 1980. Amyloid deposits and amyloidosis. The beta-fibrilloses (first of two parts). *N Engl J Med.* 302:1283-92.
- Glenner, G.G., and W.D. Terry. 1974. Characterization of amyloid. *Annu Rev Med.* 25:131-5.
- Goldmann, W. 2008. PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet Res.* 39:30.
- Goldmann, W., N. Hunter, J.D. Foster, J.M. Salbaum, K. Beyreuther, and J. Hope. 1990. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:2476-80.
- Gosal, W.S., I.J. Morten, E.W. Hewitt, D.A. Smith, N.H. Thomson, and S.E. Radford. 2005. Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid. *J Mol Biol.* 351:850-64.

- Gosal, W.S., S.L. Myers, S.E. Radford, and N.H. Thomson. 2006. Amyloid under the atomic force microscope. *Protein Pept Lett.* 13:261-70.
- Govaerts, C., H. Wille, S.B. Prusiner, and F.E. Cohen. 2004. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:8342-7.
- Green, K.M., S.R. Browning, T.S. Seward, J.E. Jewell, D.L. Ross, M.A. Green, E.S. Williams, E.A. Hoover, and G.C. Telling. 2008. The elk PRNP codon 132 polymorphism controls cervid and scrapie prion propagation. *J Gen Virol.* 89:598-608.
- Greenfield, N.F., G. D. 1969. Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry.* 8 4108-4116.
- Groschup, M.H., C. Lacroux, A. Buschmann, G. Luhken, J. Mathey, M. Eiden, S. Lugan, C. Hoffmann, J.C. Espinosa, T. Baron, J.M. Torres, G. Erhardt, and O. Andreoletti. 2007. Classic scrapie in sheep with the ARR/ARR prion genotype in Germany and France. *Emerg Infect Dis.* 13:1201-7.
- Gsponer, J., and M. Vendruscolo. 2006. Theoretical approaches to protein aggregation. *Protein Pept Lett.* 13:287-93.
- Guijarro, J.I., M. Sunde, J.A. Jones, I.D. Campbell, and C.M. Dobson. 1998. Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:4224-8.
- Hadlow, W.J. 1959. Scrapie and kuru. *Lancet.* ii:289-290.
- Harper, J.D., and P.T. Lansbury, Jr. 1997. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem.* 66:385-407.
- Hasnain, S.S., L.M. Murphy, R.W. Strange, J.G. Grossmann, A.R. Clarke, G.S. Jackson, and J. Collinge. 2001. XAFS study of the high-affinity copper-binding site of human PrP(91-231) and its low-resolution structure in solution. *J Mol Biol.* 311:467-73.
- Hay, B., R.A. Barry, I. Lieberburg, S.B. Prusiner, and V.R. Lingappa. 1987. Biogenesis and transmembrane orientation of the cellular isoform of the scrapie prion protein [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1987 May;7(5):2035]. *Mol Cell Biol.* 7:914-20.
- Heise, H. 2008. Solid-state NMR spectroscopy of amyloid proteins. *ChemBiochem.* 9:179-89.
- Hjelmeland, L.M., and A. Chrambach. 1984. Solubilization of functional membrane proteins. *Methods Enzymol.* 104:305-18.
- Horiuchi, M., and B. Caughey. 1999. Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *EMBO J.* 18:3193-203.
- Hornemann, S., C. Korth, B. Oesch, R. Riek, G. Wider, K. Wuthrich, and R. Glockshuber. 1997. Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Lett.* 413:277-81.

- Jackson, G.S., L.L. Hosszu, A. Power, A.F. Hill, J. Kenney, H. Saibil, C.J. Craven, J.P. Waltho, A.R. Clarke, and J. Collinge. 1999. Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science*. 283:1935-7.
- Jackson, G.S., I. Murray, L.L. Hosszu, N. Gibbs, J.P. Waltho, A.R. Clarke, and J. Collinge. 2001. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:8531-5.
- Jahn, T.R., M.J. Parker, S.W. Homans, and S.E. Radford. 2006. Amyloid formation under physiological conditions proceeds via a native-like folding intermediate. *Nat Struct Mol Biol*. 13:195-201.
- Jahn, T.R., and S.E. Radford. 2005. The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J*. 272:5962-70.
- Jahn, T.R., and S.E. Radford. 2008. Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways. *Arch Biochem Biophys*. 469:100-17.
- James, T.L., H. Liu, N.B. Ulyanov, S. Farr-Jones, H. Zhang, D.G. Donne, K. Kaneko, D. Groth, I. Mehlhorn, S.B. Prusiner, and F.E. Cohen. 1997. Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:10086-91.
- Jansen, K., O. Schafer, E. Birkmann, K. Post, H. Serban, S.B. Prusiner, and D. Riesner. 2001. Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. *Biol Chem*. 382:683-91.
- Jarrett, J.T., and P.T. Lansbury, Jr. 1993. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*. 73:1055-8.
- Jimenez, J.L., J.I. Gujjarro, E. Orlova, J. Zurdo, C.M. Dobson, M. Sunde, and H.R. Saibil. 1999. Cryo-electron microscopy structure of an SH3 amyloid fibril and model of the molecular packing. *EMBO J*. 18:815-21.
- Jimenez, J.L., E.J. Nettleton, M. Bouchard, C.V. Robinson, C.M. Dobson, and H.R. Saibil. 2002. The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:9196-201.
- Jones, E.M., and W.K. Surewicz. 2005. Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell*. 121:63-72.
- Kad, N.M., S.L. Myers, D.P. Smith, D.A. Smith, S.E. Radford, and N.H. Thomson. 2003. Hierarchical assembly of beta2-microglobulin amyloid in vitro revealed by atomic force microscopy. *J Mol Biol*. 330:785-97.
- Kimberlin, R.H., and C.A. Walker. 1978. Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J Gen Virol*. 39:487-96.

- Klunk, W.E., J.W. Pettegrew, and D.J. Abraham. 1989. Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J Histochem Cytochem.* 37:1273-81.
- Kodali, R., and R. Wetzel. 2007. Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. *Curr Opin Struct Biol.* 17:48-57.
- Krebs, M.R., E.H. Bromley, and A.M. Donald. 2005. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J Struct Biol.* 149:30-7.
- LaFauci, G., R.I. Carp, H.C. Meeker, X. Ye, J.I. Kim, M. Natelli, M. Cedeno, R.B. Petersen, R. Kascsak, and R. Rubenstein. 2006. Passage of chronic wasting disease prion into transgenic mice expressing Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) PrPC. *J Gen Virol.* 87:3773-80.
- Lashuel, H.A., D. Hartley, B.M. Petre, T. Walz, and P.T. Lansbury, Jr. 2002. Neurodegenerative disease: amyloid pores from pathogenic mutations. *Nature.* 418:291.
- Lauren, J., D.A. Gimbel, H.B. Nygaard, J.W. Gilbert, and S.M. Strittmatter. 2009. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers. *Nature.* 457:1128-32.
- Lee, K.S., R. Linden, M.A. Prado, R.R. Brentani, and V.R. Martins. 2003. Towards cellular receptors for prions. *Rev Med Virol.* 13:399-408.
- Leffers, K.W., H. Wille, J. Stohr, E. Junger, S.B. Prusiner, and D. Riesner. 2005. Assembly of natural and recombinant prion protein into fibrils. *Biol Chem.* 386:569-80.
- Legname, G., I.V. Baskakov, H.O. Nguyen, D. Riesner, F.E. Cohen, S.J. DeArmond, and S.B. Prusiner. 2004. Synthetic mammalian prions. *Science.* 305:673-6.
- Legname, G., H.O. Nguyen, I.V. Baskakov, F.E. Cohen, S.J. Dearmond, and S.B. Prusiner. 2005. Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:2168-73.
- LeVine, H., 3rd. 1993. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* 2:404-10.
- LeVine, H., 3rd. 1999. Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.* 309:274-84.
- Levinthal, C. 1968. Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.* . 65:44-45.
- Lucassen, R., K. Nishina, and S. Supattapone. 2003. In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl groups. *Biochemistry.* 42:4127-35.
- Makarava, N., C.I. Lee, V.G. Ostapchenko, and I.V. Baskakov. 2007. Highly promiscuous nature of prion polymerization. *J Biol Chem.* 282:36704-13.
- Makin, O.S., and L.C. Serpell. 2005. Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.* 272:5950-61.

- Malaga-Trillo, E., and E. Sempou. 2009a. PrPs: Proteins with a purpose: Lessons from the zebrafish. *Prion*. 3.
- Malaga-Trillo, E., G.P. Solis, Y. Schrock, C. Geiss, L. Luncz, V. Thomanetz, and C.A. Stuermer. 2009b. Regulation of Embryonic Cell Adhesion by the Prion Protein. *PLoS Biol*. 7:e55.
- McParland, V.J., N.M. Kad, A.P. Kalverda, A. Brown, P. Kirwin-Jones, M.G. Hunter, M. Sunde, and S.E. Radford. 2000. Partially unfolded states of beta(2)-microglobulin and amyloid formation in vitro. *Biochemistry*. 39:8735-46.
- Mehlhorn, I., D. Groth, J. Stockel, B. Moffat, D. Reilly, D. Yansura, W.S. Willett, M. Baldwin, R. Fletterick, F.E. Cohen, R. Vandlen, D. Henner, and S.B. Prusiner. 1996. High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry*. 35:5528-37.
- Meyer, R.K., M.P. McKinley, K.A. Bowman, M.B. Braunfeld, R.A. Barry, and S.B. Prusiner. 1986. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83:2310-4.
- Modler, A.J., K. Gast, G. Lutsch, and G. Damaschun. 2003. Assembly of amyloid protofibrils via critical oligomers--a novel pathway of amyloid formation. *J Mol Biol*. 325:135-48.
- Moser, M., R.J. Colello, U. Pott, and B. Oesch. 1995. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron*. 14:509-17.
- Naiki, H., K. Higuchi, M. Hosokawa, and T. Takeda. 1989. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem*. 177:244-9.
- Naiki, H., K. Higuchi, K. Matsushima, A. Shimada, W.H. Chen, M. Hosokawa, and T. Takeda. 1990. Fluorometric examination of tissue amyloid fibrils in murine senile amyloidosis: use of the fluorescent indicator, thioflavine T. *Lab Invest*. 62:768-73.
- Nelson, R., M.R. Sawaya, M. Balbirnie, A.O. Madsen, C. Riek, R. Grothe, and D. Eisenberg. 2005. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature*. 435:773-8.
- Noinville, S., J.F. Chich, and H. Rezaei. 2008. Misfolding of the prion protein: linking biophysical and biological approaches. *Vet Res*. 39:48.
- Novitskaya, V., O.V. Bocharova, I. Bronstein, and I.V. Baskakov. 2006. Amyloid fibrils of mammalian prion protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons. *J Biol Chem*. 281:13828-36.
- Oesch, B., D. Westaway, M. Walchli, M.P. McKinley, S.B. Kent, R. Aebersold, R.A. Barry, P. Tempst, D.B. Teplow, L.E. Hood, and et al. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*. 40:735-46.
- P.G. Wolynes, J.N.O., D. Thirumalai. 1995. Navigating the folding routes. *Science*. 267:1619-1620.

- Pan, K.M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R.J. Fletterick, F.E. Cohen, and et al. 1993. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:10962-6.
- Panza, G., J. Stohr, C. Dumpitak, D. Papathanassiou, J. Weiss, D. Riesner, D. Willbold, and E. Birkmann. 2008. Spontaneous and BSE-prion-seeded amyloid formation of full length recombinant bovine prion protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 373:493-7.
- Pauling, L.C., R.B. 1998. Configurations of polypeptide chains with favoured orientations around single bonds: two new pleated sheets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, . 37, 729–740.
- Paulson, H.L. 1999. Protein fate in neurodegenerative proteinopathies: polyglutamine diseases join the (mis)fold. *Am J Hum Genet*. 64:339-45.
- Pitschke, M., R. Prior, M. Haupt, and D. Riesner. 1998. Detection of single amyloid beta-protein aggregates in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's patients by fluorescence correlation spectroscopy. *Nat Med*. 4:832-4.
- Post, K., M. Pitschke, O. Schafer, H. Wille, T.R. Appel, D. Kirsch, I. Mehlhorn, H. Serban, S.B. Prusiner, and D. Riesner. 1998. Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. *Biol Chem*. 379:1307-17.
- Prusiner, S.B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 216:136-44.
- Prusiner, S.B., D.F. Groth, S.P. Cochran, F.R. Masiarz, M.P. McKinley, and H.M. Martinez. 1980. Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry*. 19:4883-91.
- Prusiner, S.B., D.F. Groth, M.P. McKinley, S.P. Cochran, K.A. Bowman, and K.C. Kasper. 1981. Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78:4606-10.
- Prusiner, S.B., M. Scott, D. Foster, K.M. Pan, D. Groth, C. Mirenda, M. Torchia, S.L. Yang, D. Serban, G.A. Carlson, and et al. 1990. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*. 63:673-86.
- Puchtler, H., and F. Sweat. 1962. Amidoblack as a stain for hemoglobin. *Arch Pathol*. 73:245-9.
- Riek, R., S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, and K. Wuthrich. 1996. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature*. 382:180-2.
- Riesner, D., K. Kellings, K. Post, H. Wille, H. Serban, D. Groth, M.A. Baldwin, and S.B. Prusiner. 1996. Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *J Virol*. 70:1714-22.
- Rigter, A., and A. Bossers. 2005. Sheep scrapie susceptibility-linked polymorphisms do not modulate the initial binding of cellular to disease-associated prion protein prior to conversion. *J Gen Virol*. 86:2627-34.

- Rudd, P.M., T. Endo, C. Colominas, D. Groth, S.F. Wheeler, D.J. Harvey, M.R. Wormald, H. Serban, S.B. Prusiner, A. Kobata, and R.A. Dwek. 1999. Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:13044-9.
- Saborio, G.P., B. Permanne, and C. Soto. 2001. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*. 411:810-3.
- Sabuncu, E., S. Petit, A. Le Dur, T. Lan Lai, J.L. Vilotte, H. Laude, and D. Vilette. 2003. PrP polymorphisms tightly control sheep prion replication in cultured cells. *J Virol*. 77:2696-700.
- Safar, J., H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F.E. Cohen, and S.B. Prusiner. 1998. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med*. 4:1157-65.
- Salemme, F. 1983. Structural properties of protein beta-sheets. *Prog Biophys Mol Biol*,. 42(2-3), 95-133.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning manual - 2nd edition. *Cold Spring Harbour Laboratory, New York*, .
- Scott, M., D. Foster, C. Miranda, D. Serban, F. Coufal, M. Walchli, M. Torchia, D. Groth, G. Carlson, S.J. DeArmond, and et al. 1989. Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*. 59:847-57.
- Scott, M.R., R. Will, J. Ironside, H.O. Nguyen, P. Tremblay, S.J. DeArmond, and S.B. Prusiner. 1999. Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:15137-42.
- Sipe, J.D., and A.S. Cohen. 2000. Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol*. 130:88-98.
- Smith, A.M., T.R. Jahn, A.E. Ashcroft, and S.E. Radford. 2006. Direct observation of oligomeric species formed in the early stages of amyloid fibril formation using electrospray ionisation mass spectrometry. *J Mol Biol*. 364:9-19.
- Soto, C., G.P. Saborio, and L. Anderes. 2002. Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends Neurosci*. 25:390-4.
- Stahl, N., M.A. Baldwin, R. Hecker, K.M. Pan, A.L. Burlingame, and S.B. Prusiner. 1992. Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry*. 31:5043-53.
- Steensma, D.P. 2001. "Congo" red. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*
- Stefani, M. 2003. What the use of disease-unrelated model proteins can tell us about the molecular basis of amyloid aggregation and toxicity. *Ital J Biochem*. 52:162-76.

- Stohr, J., N. Weinmann, H. Wille, T. Kaimann, L. Nagel-Steger, E. Birkmann, G. Panza, S.B. Prusiner, M. Eigen, and D. Riesner. 2008. Mechanisms of prion protein assembly into amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:2409-14.
- Surewicz, W.K., E.M. Jones, and A.C. Apetri. 2006. The emerging principles of mammalian prion propagation and transmissibility barriers: Insight from studies in vitro. *Acc Chem Res.* 39:654-62.
- Suyama, K., M. Yoshioka, M. Akagawa, Y. Murayama, H. Horii, M. Takata, T. Yokoyama, and S. Mohri. 2007. Prion inactivation by the Maillard reaction. *Biochem Biophys Res Commun.* 356:245-8.
- Swietnicki, W., M. Morillas, S.G. Chen, P. Gambetti, and W.K. Surewicz. 2000. Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP90-231. *Biochemistry.* 39:424-31.
- Tattum, M.H., S. Cohen-Krausz, K. Thumanu, C.W. Wharton, A. Khalili-Shirazi, G.S. Jackson, E.V. Orlova, J. Collinge, A.R. Clarke, and H.R. Saibil. 2006. Elongated oligomers assemble into mammalian PrP amyloid fibrils. *J Mol Biol.* 357:975-85.
- Telling, G.C., M. Scott, J. Mastrianni, R. Gabizon, M. Torchia, F.E. Cohen, S.J. DeArmond, and S.B. Prusiner. 1995. Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell.* 83:79-90.
- Tolnay, M., and A. Probst. 1999. REVIEW: tau protein pathology in Alzheimer's disease and related disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 25:171-87.
- Uversky, V.N., J. Li, and A.L. Fink. 2001. Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *J Biol Chem.* 276:44284-96.
- Vilotte, J.L., S. Soulier, R. Essalmani, M.G. Stinnakre, D. Vaiman, L. Lepourry, J.C. Da Silva, N. Besnard, M. Dawson, A. Buschmann, M. Groschup, S. Petit, M.F. Madelaine, S. Rakatobe, A. Le Dur, D. Vilette, and H. Laude. 2001. Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J Virol.* 75:5977-84.
- Voropai, E.S., Samtsov, M. P., Kaplevskii, K.N., A.A., Maskevich, V.I., Stepuro, O.I, Povarova, Kuznetsova, I.M., Turoverov, K.K., Fink, A.L & Uverskii,. 2003. Spectral Properties of Thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils. *J Appl Spectros.* 70:767-73.
- Walsh, D.M., A. Lomakin, G.B. Benedek, M.M. Condron, and D.B. Teplow. 1997. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Detection of a protofibrillar intermediate. *J Biol Chem.* 272:22364-72.
- Walsh, D.M., and D.J. Selkoe. 2004. Oligomers on the brain: the emerging role of soluble protein aggregates in neurodegeneration. *Protein Pept Lett.* 11:213-28.
- Westaway, D., and G.A. Carlson. 2002. Mammalian prion proteins: enigma, variation and vaccination. *Trends Biochem Sci.* 27:301-7.

- Westaway, D., S.J. DeArmond, J. Cayetano-Canlas, D. Groth, D. Foster, S.L. Yang, M. Torchia, G.A. Carlson, and S.B. Prusiner. 1994. Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell*. 76:117-29.
- Westermarck, P., M.D. Benson, J.N. Buxbaum, A.S. Cohen, B. Frangione, S. Ikeda, C.L. Masters, G. Merlini, M.J. Saraiva, and J.D. Sipe. 2005. Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclature Committee of the International Society of Amyloidosis. *Amyloid*. 12:1-4.
- Wille, H., M.D. Michelitsch, V. Guenebaut, S. Supattapone, A. Serban, F.E. Cohen, D.A. Agard, and S.B. Prusiner. 2002. Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:3563-8.
- Windl, O., M. Buchholz, A. Neubauer, W. Schulz-Schaeffer, M. Groschup, S. Walter, S. Arendt, M. Neumann, A.K. Voss, and H.A. Kretzschmar. 2005. Breaking an absolute species barrier: transgenic mice expressing the mink PrP gene are susceptible to transmissible mink encephalopathy. *J Virol*. 79:14971-5.
- Wong, C., L.W. Xiong, M. Horiuchi, L. Raymond, K. Wehrly, B. Chesebro, and B. Caughey. 2001. Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *EMBO J*. 20:377-86.
- Xiong, L.W., L.D. Raymond, S.F. Hayes, G.J. Raymond, and B. Caughey. 2001. Conformational change, aggregation and fibril formation induced by detergent treatments of cellular prion protein. *J Neurochem*. 79:669-78.
- Yedidia, Y., L. Horonchik, S. Tzaban, A. Yanai, and A. Taraboulos. 2001. Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *EMBO J*. 20:5383-91.

7 Anhang: Veröffentlichungen

§ 4 Abs. 1

An der folgenden wissenschaftlichen Publikation hatte Giannantonio Panza folgenden Anteil:

Aufreinigung und Charakterisierung des rekombinanten Prion-Proteins und Beiträge zur keiminduzierten Fibrillogenese.

Veröffentlichung 1: Mechanisms of prion protein assembly into amyloid

Jan Stöhr, Nicole Weinmann, Holger Wille, Tina Kaimann, Luitgard Nagel-Steger, Eva Birkmann, Giannantonio Panza, Stanley B. Prusiner, Manfred Eigen and Detlev Riesner

Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 105; no. 7; 2409-2414

Impact factor = 9,38

Mechanisms of prion protein assembly into amyloid

Jan Stöhr*, Nicole Weinmann*, Holger Wille^{†‡}, Tina Kaimann*, Luitgard Nagel-Steger*, Eva Birkmann*,
Giannantonio Panza*, Stanley B. Prusiner^{†§}, Manfred Eigen[¶], and Detlev Riesner[¶]

*Institut fuer Physikalische Biologie and Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum, Heinrich-Heine-Universität Duesseldorf, 40225 Duesseldorf, Germany; †Institute for Neurodegenerative Diseases, ‡Department of Neurology, and §Department of Biochemistry and Biophysics, University of California, San Francisco, CA 94143; and ¶Max-Planck-Institut fuer Biophysikalische Chemie, D-37077 Goettingen, Germany

Contributed by Manfred Eigen, December 21, 2007 (sent for review November 1, 2007)

The conversion of the α -helical, cellular isoform of the prion protein (PrP^C) to the insoluble, β -sheet-rich, infectious, disease-causing isoform (PrP^{Sc}) is the key event in prion diseases. In an earlier study, several forms of PrP were converted into a fibrillar state by using an *in vitro* conversion system consisting of low concentrations of SDS and 250 mM NaCl. Here, we characterize the structure of the fibril precursor state, that is, the soluble state under fibrillization conditions. CD spectroscopy, analytical ultracentrifugation, and chemical cross-linking indicate that the precursor state exists in a monomer-dimer equilibrium of partially denatured, α -helical PrP, with a well defined contact site of the subunits in the dimer. Using fluorescence with thioflavin T, we monitored and quantitatively described the kinetics of seeded fibril formation, including dependence of the reaction on substrate and seed concentrations. Exponential, seed-enhanced growth can be achieved in homogeneous solution, which can be enhanced by sonication. From these data, we propose a mechanistic model of fibrillization, including the presence of several intermediate structures. These studies also provide a simplified amplification system for prions.

dimer | seeding | fibril | precursor state

P rion diseases are fatal, neurodegenerative diseases that include Creutzfeldt-Jakob disease in humans, bovine spongiform encephalopathy (BSE), and scrapie in sheep. The key molecular event in prion diseases is the conformational change of a host-encoded prion protein, denoted as PrP^C, into the disease-causing isoform, PrP^{Sc} (1). Because prions do not contain any genetic information in the form of nucleic acid (2, 3), the information for prions is enciphered in the structure of the pathological isoform. Prion replication occurs by converting PrP^C to PrP^{Sc}; the pool of PrP^C is replenished by the cellular synthesis of PrP^C. Several mechanistic models have been proposed for this transfer of conformation, among them the heterodimer model (4), the cooperative model like an oligomeric enzyme (5), and the model of seeded polymerization (6). Most experimental data support the model of seeded polymerization. The transition of PrP^C into PrP^{Sc} can be induced *in vivo* either by an infection with prions, by spontaneous conversion, or by mutations in the sequence of PrP.

Regardless of the cause, the conformational change of PrP^C into PrP^{Sc} results in a fundamental change of its biophysical properties. PrP^C is membrane-bound, rich in α -helical secondary structure, soluble in mild detergents, and noninfectious, whereas PrP^{Sc} is β -sheet-rich, aggregated, and infectious (for review, see ref. 1). Proteinase K (PK) digests PrP^C completely but cleaves PrP^{Sc} specifically at residue 89 or 90 leaving the C terminus (amino acids 90–231) intact; this protease-resistant fragment is denoted PrP 27–30 and is fully infectious (7–10). If PK digestion is carried out in the presence of detergents, PrP 27–30 assembles into prion rods, which have the tinctorial properties of amyloid (11, 12).

To investigate the mechanism of prion formation, two different strategies have been pursued. In one approach, the spontaneous conversion of PrP^C or recombinant (rec) PrP in the absence of PrP^{Sc}, as in the sporadic form of prion disease, is investigated. In another approach, the PrP^{Sc}-dependent conversion of PrP, which simulates exogenous prion infection, is studied. Synthetic prions

were formed from amyloid recPrP(90–231), demonstrating that conversion of purified recPrP is sufficient for the generation of infectivity, albeit at very low titers (13, 14). Prion infectivity was also generated by protein-misfolding cyclic amplification (PMCA) in mixtures of cell extracts from brain tissue of infected and noninfected animals; by orders of magnitude, higher infectivity was obtained in the amplified samples compared with the seed used to initiate the amplification (15, 16). In a similar system, infectivity was generated also spontaneously (17).

In the present study, we examined the molecular mechanisms of spontaneous and seeded fibril formation. We identified a soluble amyloid-precursor (preamyloid) state and characterized it by analytical ultracentrifugation, chemical cross-linking, mass spectrometry, and circular dichroism. Using controlled and well defined conditions (buffers, solvents, recPrP, purified PrP^{Sc}, homogeneous incubation conditions), we quantified the kinetics of fibril formation by monitoring Thioflavin T (ThT) fluorescence. Addition of PrP^{Sc} seeds reduced the time for fibril formation from weeks to hours, and the lag phase of fibril formation depended on the recPrP concentration and on the PrP^{Sc} concentration. The sensitivity of the system could be enhanced to a detection limit of 6.5×10^{-7} brain equivalents (be) per μ l of PrP^{Sc}. From these data, we propose a mechanistic model of fibril formation.

Results

***In Vitro* Formation of a Preamyloid State and Amyloid Fibers.** Previously, we described an *in vitro* conversion system, in which different conformational states of recPrP could be established by varying the concentration of SDS (18). In a follow-up study, this system was optimized to produce amyloid fibrils from recombinant and natural PrP (19). Low concentrations of SDS (0.02–0.03%), 250 mM NaCl, and a neutral buffer are essential for fibril formation. In the present study, we found that recPrP exists in the absence of PrP^{Sc} in a preamyloid state, which is stable and soluble for >7 days. In the presence of PrP^{Sc} seeds, fibrillization is substantially accelerated: Fibrils formed within 24 h.

Analysis of the Preamyloid State. recPrP in the preamyloid state was characterized by analytical ultracentrifugation, CD spectroscopy, and chemical cross-linking.

Analytical Ultracentrifugation. A sedimentation-diffusion equilibrium of recPrP under conditions of the precursor state was established in the analytical ultracentrifuge at 15,000, at 23,300, at 27,000, and at 31,600 rpm (Fig. 1A). The data could be fitted satisfactorily assuming a two-component system. The data revealed two different species with apparent molecular masses of 22 kDa (33.3%) and 35.2

Author contributions: J.S. and N.W. contributed equally to this work; J.S., N.W., S.B.P., M.E., and D.R. designed research; J.S., N.W., H.W., T.K., L.N.-S., E.B., and G.P. performed research; J.S., N.W., H.W., T.K., L.N.-S., E.B., M.E., and D.R. analyzed data; and J.S., N.W., S.B.P., and D.R. wrote the paper.

Conflict of interest statement: S.B.P. and D.R. have financial interest in InPro Biotechnology, Inc.

To whom correspondence may be addressed. E-mail: eigen@gwdg.de or riesner@biophys.uni-duesseldorf.de.

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA

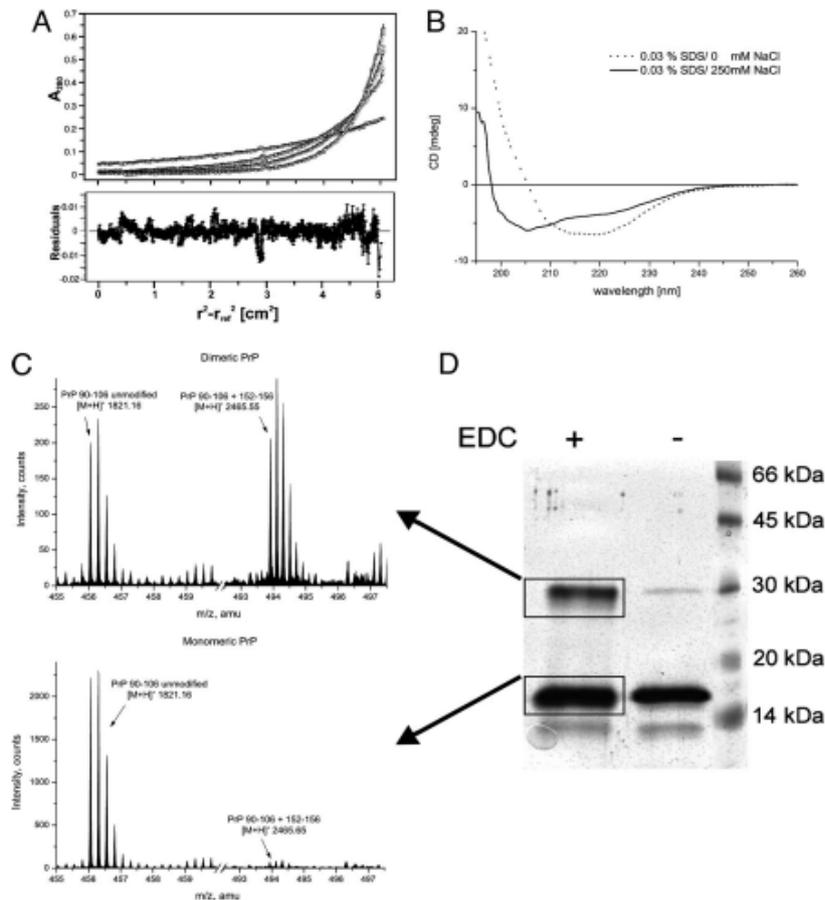


Fig. 1. Characteristics of the preamyloid state. (A) Sedimentation equilibrium centrifugation of recPrP after 7 days of incubation. (Upper) Experimental data overlaid by the fitted curves. (Lower) Residuals. (B) CD spectra of recPrP in the preamyloid state in the presence (solid line) and absence of NaCl (dotted line). (C) LC-ESI-MS spectra of cross-linked preamyloids digested with trypsin. In the preamyloid state, cross-linking of residues 90–106 and 152–156 was not observed in monomeric recPrP (Lower) but was seen in dimeric recPrP (Upper). (D) Analysis of the preamyloid state after cross-linking by gel electrophoresis.

kDa (66.6%), respectively. The molecular mass of recPrP (90–231) is 16.243 kDa, which would fit into 22 kDa as a monomer with 20 molecules of SDS bound if the partial specific volume of SDS was corrected. In a similar way, the second component of 35.2 kDa can be interpreted as a dimer of recPrP with 10 molecules of SDS bound. This interpretation is in good accordance with earlier data of monomeric recPrP-SDS and dimeric recPrP-SDS complexes, although those were obtained in the absence of NaCl (18).

CD Spectroscopy. In earlier studies, the secondary structure of recPrP in 0.03% SDS but without NaCl was determined to be a soluble β -sheet-rich structure that is prone to form amorphous aggregates (18). The addition of NaCl leads to a conformation composed of α -helical and random-coil secondary structures (Fig. 1B). This conformation, called “ α /random,” polymerizes into regular fibrils (Fig. 2A). Naturally, a stable PrP^C-like, α -helical structure has to denature partially to form fibrils.

Chemical Cross-linking of the Contact Sites in Dimeric Preamyloid recPrP. To determine the contact sites, we cross-linked recPrP in the preamyloid state by EDC, then analyzed the sample by fully denaturing PAGE and Coomassie staining (Fig. 1D). This procedure was used in earlier studies to determine the molecular contact sites in an α -helical dimeric state of recPrP stabilized by 0.06% SDS in the absence of NaCl (20). A cross-linked dimeric form of recPrP

was clearly detectable but in lower concentration compared with dimers in the absence of NaCl. The bands containing the recPrP monomer and dimer were cut out separately and the recPrP digested in-gel by trypsin. The samples were eluted from the gel, and the cross-linked peptides were identified by mass spectrometry according to a method described in ref. 20. In the monomeric band, no intramolecular contact sites were found, demonstrating that the N terminus in the preamyloid state is flexible. In the dimeric band, we found a contact site with cross-linked segments at residues 90–106 and 152–156 (Fig. 1C), which was also identified in earlier studies in the α -helical dimer (0.06% SDS, no NaCl).

Spontaneous Fibril Formation of recPrP. In the absence of PrP^{Sc} seeds, 80 ng/ μ l recPrP incubated with 0.03% SDS and 250 mM NaCl formed fibrils within 35 days, as described in ref. 19. Increasing the recPrP concentration to 300 ng/ μ l accelerated the formation of amyloid fibrils: Fibrils formed after 7 days of incubation. These fibrils were characterized by electron microscopy, ThT fluorescence, and digestion with PK. They showed the characteristic appearance of amyloid fibrils (Fig. 2A) and the typical increase in ThT fluorescence (Fig. 2B). PK digestion under harsh conditions (PrP:PK ratios of 1:20 and 1:50) revealed a protease-resistant fragment of 10–14 kDa, which remained stable even after 1 h of digestion (Fig. 2C). Whereas α -helical recPrP was degraded completely (Fig. 2D), PK digestion of mouse synthetic prions showed a roughly similar pattern of protease resistance (13, 21).

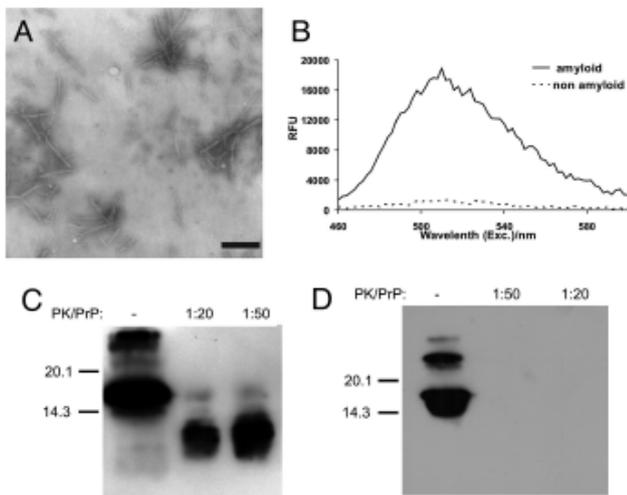


Fig. 2. Properties of recPrP amyloids. (A) Electron micrograph showing the typical structure of amyloid fibrils after 6 days of incubation. (Scale bar, 0.5 μ m.) (B) Amyloid formation of recPrP (solid line) was monitored by the change in ThT fluorescence. ThT was added to a final concentration of 5 μ M and a final protein concentration of 10 ng/ μ l. recPrP in 0.06% SDS (dotted line) is shown as a control. Protease digestion of recPrP amyloids (C) and α -helical recPrP (D) at 1:20 and 1:50 ratios (PrP:PK) demonstrate that amyloid formed from recPrP is protease-resistant. Apparent molecular masses based on the migration of protein standards are shown in kilodaltons.

PrP^{Sc}-Seeded Fibril Formation of recPrP. We analyzed the effect of PrP^{Sc} seeds on the mechanism and kinetics of fibril formation of recPrP. PrP^{Sc} seeds were prepared from the brain of an infected hamster by NaPTA precipitation (22), and negative controls were obtained in the same manner from noninfected brain tissue. To evaluate the kinetics quantitatively, we applied a homogeneous system, without the cyclic sonication of the PMCA system (15), but with thorough shaking. After resuspension in 10 mM NaPi, pH 7.2, the samples were adjusted to final concentrations of 0.025% SDS, 250 mM NaCl, and 80 ng/ μ l recPrP in a volume of 150–200 μ l. The formation of amyloid fibrils was monitored by ThT fluorescence in 96-well plates. Seeding the reaction with purified PrP^{Sc} reproducibly accelerated the formation of amyloid fibrils of recPrP.

By using 1.6×10^{-4} be/ μ l of PrP^{Sc} as seeds, an increase in fluorescence intensity was observed within hours of incubation, whereas control samples showed constant, low fluorescence for the duration of the experiment (Fig. 3A). The kinetics can be characterized by three stages: a clear lag phase, a steep increase phase, and a slow final increase of fluorescence intensity. This seeding effect and kinetic profile were also observed in later experiments (Fig. 4A and C), in which the late phase showed saturation. Thus, fibril formation of recPrP as assayed by ThT fluorescence depends critically on the presence of PrP^{Sc} seeds.

To confirm the fibrillar character of recPrP after seeding with PrP^{Sc}, we analyzed the newly formed structures by electron microscopy (Fig. 3C and D) and differential ultracentrifugation (data not shown). RecPrP incubated in presence of PrP^{Sc} seeds showed predominantly two structures: (i) a complex of newly formed fibrils grown onto the PrP^{Sc} seeds (Fig. 3C) and (ii) long fibrils, most likely detached from the PrP^{Sc} seeds (Fig. 3D). In comparison, the PrP^{Sc} seeds alone did not exhibit long, fibrillar structures (Fig. 3B), although short, fibrillar stretches might be present. Consecutive differential ultracentrifugation of recPrP after 24 h of seeded incubation resulted in a greater amount of recPrP in the pellet compared with negative controls (data not shown). Thus, these data indicate that amyloid fibrils, and not mere aggregates, were formed from the PrP^{Sc}-seeded reactions.

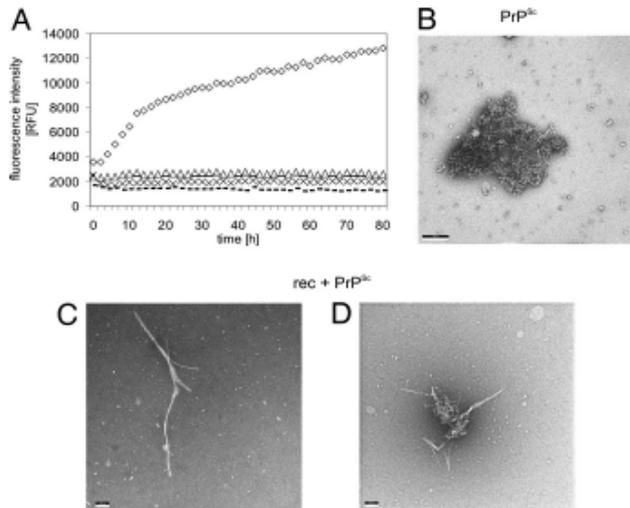


Fig. 3. Seeded fibril formation. (A) recPrP (80 ng/ μ l) seeded with purified PrP^{Sc} (diamonds) forms amyloid fibrils readily compared with controls: recPrP + uninfected 1.6×10^{-4} brain equivalents (be) per μ l (x); recPrP alone (triangles); purified PrP^{Sc} alone (dashes). Fibril formation was monitored by using the ThT fluorescence assay. Electron micrograph of PrP^{Sc} aggregates after NaPTA precipitation (B), fibrillar recPrP (C), and PrP^{Sc} aggregates combined with recPrP fibrils (D).

Concentration Dependence of PrP^{Sc}-Seeded Fibril Formation. To analyze the influence of the recPrP concentration on the seeded fibril formation, we performed the same experiment as described for Fig. 3A, but varied the recPrP concentration from 20 ng/ μ l to 160 ng/ μ l at a constant concentration of PrP^{Sc} seed (Fig. 4A). Concentrations exceeding 160 ng/ μ l could not be applied because spontaneous fibrillization was observed. With increasing concentrations of recPrP, the lag phase became shorter, the increase in the fluorescence signal was steeper, and the reaction saturated at a higher level. A quantitative evaluation is given in Discussion.

Having established that seeded formation depended on the concentration of recPrP, we examined whether the reaction depended on the concentration of the PrP^{Sc} seed as well. Determining the seed-concentration dependence enables us to quantify the fibril formation process and to establish the detection limit for PrP^{Sc}. We added varying concentrations of PrP^{Sc} seeds to 80 ng/ μ l of monomeric recPrP, and incubated the mixture under the same conditions as in Figs. 3A and 4A (Fig. 4C). With decreasing concentrations of PrP^{Sc} seeds, longer lag phases, slower increases in the fluorescence signals, and lower levels of saturation were observed. The lowest concentration of PrP^{Sc} seed that resulted in a clear seeding effect was 5.9×10^{-6} be/ μ l. At 1.9×10^{-6} be/ μ l and 6.5×10^{-7} be/ μ l, the two lowest PrP^{Sc} concentrations tested, the fluorescence signals did not increase significantly compared with controls. These data indicate the concentration dependence and the detection limit for PrP^{Sc}.

The detection limit could be further enhanced by sonication of the samples with a microtip (Bandelin sonopuls, Bandelin Electronic); samples were sonicated with 10 pulses of 0.1 s at 30% power every hour during 6 h of incubation at 37°C with continuous agitation (600 rpm) before starting measurement. Sonicated PrP^{Sc} seed at 1.9×10^{-6} be/ μ l resulted in an increase in the fluorescence intensity and a shortening of the lag phase (Fig. 4C, solid line) compared with the same concentration of PrP^{Sc} seed without sonication (Fig. 4C, open circle). Because our investigations focus on homogeneous incubation conditions, we chose to not pursue further the influence of sonication or other cyclic conditions.

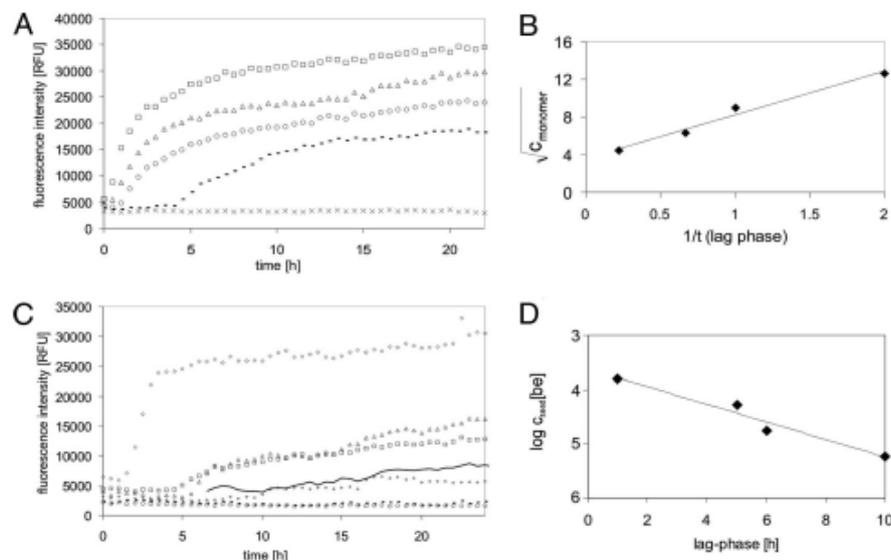


Fig. 4. Dependence of fibril formation on PrP-monomer and PrP^{Sc}-seed concentrations. Fibril formation of recPrP was monitored using ThT-fluorescence assay. (A) The formation of amyloid fibrils seeded with 1.6×10^{-4} be/μl PrP^{Sc} is enhanced with increasing concentrations of recPrP. The following recPrP concentrations were tested: 0 (x), 20 (dashes), 40 (circles), 80 (triangles), and 160 ng/μl (squares). (B) The duration of the lag phase before amyloid formation depends on C_{monomer} . (C) The formation of amyloid fibrils from 80 ng/μl of recPrP is less efficient with lower concentrations of PrP^{Sc} seed. The following concentrations of PrP^{Sc} seed were tested: 1.6×10^{-4} (diamonds), 5.3×10^{-5} (squares), 1.7×10^{-5} (triangles), 5.9×10^{-6} (pluses), 1.9×10^{-6} (circles), and 6.5×10^{-7} be/μl (dashed line). For different PrP^{Sc} concentrations, brain homogenates of infected hamsters were diluted into brain homogenates of healthy hamsters before PTA precipitation. Sonication of a sample of seeded with 1.9×10^{-6} be/μl PrP^{Sc} increased the detection limit (solid line). (D) The duration of the lag phase before amyloid formation depends on $C_{\text{PrP}^{\text{Sc}}}$.

Discussion

Since the discovery that mammalian synthetic prions could be formed from recombinantly expressed PrP(89–230) that was refolded into amyloid (13), particular attention has been drawn to the amyloid-forming pathway of PrP. We established conditions for amyloid formation [low concentration of SDS and 250 mM NaCl (19)]; recPrP in this so-called preamyloid state is soluble for at least 7 days before forming amyloid (Fig. 1).

The conditions were derived from our earlier studies of the conformational transitions of recPrP induced by varying the SDS concentration but in the absence of NaCl (19, 23). A very similar SDS-conversion system was also used successfully by other groups (24). Lowering the SDS concentration from 0.2% to 0.02%, recPrP is transformed from a monomeric, partially denatured and otherwise mainly α -helical structure through a dimer with an α -helical content similar to that of PrP^C and a soluble oligomeric, β -sheet-rich state to polymorphic, β -sheet-rich aggregates (25).

In a recent study (20), a structural model of the α -helical dimer was developed on the basis of chemical cross-linking data and molecular modeling. In that model, the segment 90–120, which is flexible in monomeric PrP as analyzed by NMR (26), is tightly ordered and partially involved in dimer formation. In comparison, the induction of the precursor state can be regarded as a NaCl-induced shift either from the dimeric α -helical state by simultaneously lowering the SDS concentration or from the oligomeric β -sheet-rich state at constant SDS concentration. The three structures mentioned earlier appear to be in an equilibrium, which can be shifted by both SDS and NaCl. For induction to the preamyloid state, the partially denaturing effect of NaCl on PrP appears to be essential as reported also by other groups (27). The preamyloid state is composed of monomeric and dimeric recPrP (Fig. 1A) and a contact site in the dimer was identified between the N-terminal amino group of Gly-90 (segment 90–106) of one PrP molecule and amino acid Glu-152 (segment 152–156) of the other. Comparison of the α -helical dimer described in ref. 20 and the preamyloid dimer

revealed two important differences. First, intramolecular cross-link sites exist in the α -helical dimer but not in the precursor dimer. Second, the preamyloid state described here and another denatured state identified previously by 0.2% SDS in the absence of NaCl (18) are likely not the same structures. In the earlier case, partial denaturation was acquired solely by SDS competing with internal hydrophobic interactions, whereas denaturation was obtained in the preamyloid state by a combination of some SDS competing with hydrophobic interactions and NaCl competing with hydrophilic interactions. Thus, the effect of NaCl cannot be attributed to the lowering of water activity and decrease in the solubility (“salting out”) of the polymer, as generally known, but instead, is ascribed to a conformational change.

The partial denaturation might actually be necessary for conversion of recPrP into amyloid structures; it presumably lowers the activation barrier. The preamyloid state described here and another denatured state identified previously by 0.2% SDS in the absence of NaCl (18) are likely not the same structures. In the earlier case, partial denaturation was acquired solely by SDS competing with internal hydrophobic interactions, whereas denaturation was obtained in the preamyloid state by a combination of some SDS competing with hydrophobic interactions and NaCl competing with hydrophilic interactions. Thus, the effect of NaCl cannot be attributed to the lowering of water activity and decrease in the solubility (“salting out”) of the polymer, as generally known, but instead, is ascribed to a conformational change.

Our experimental findings of the preamyloid state as a partially denatured monomer and dimer fit into a model that would form the structure derived from electron crystallographic studies of PrP (28). A monomer and dimer together could form a trimer complex, which is the structural subunit of the fibrils (Fig. 5A). The trimer would be the steady-state intermediate for fibril formation, which is by definition not present in measurable concentrations. Individual trimers can be stacked, and the gain in free energy from stacking would drive the growth of the fibril. Also, dimers and monomers might stack on the trimeric surface. At present, we cannot decide whether two (Fig. 5A) or more stacked trimers are required to form the stable nucleus, so that the decay of trimers is slower than the growth of fibrils.

The aim of our studies on fibril formation of recPrP was to develop a system for seeded amplification by using purified components only (recPrP, buffer, ions, and mild denaturants). The

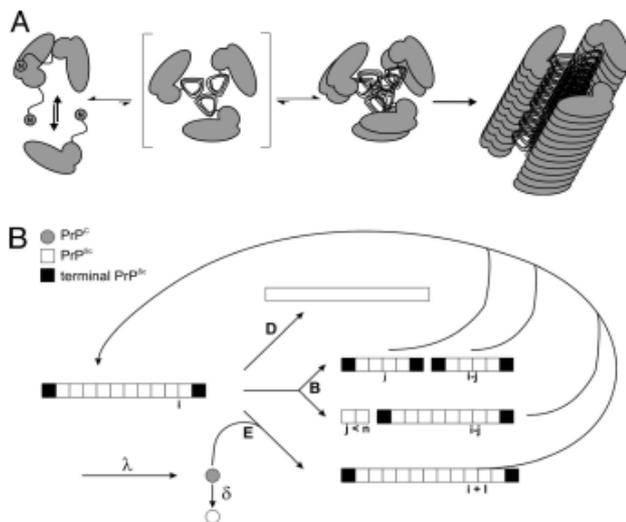


Fig. 5. Mechanistic models for PrP fibrillization. (A) A proposed mechanistic model depicts the preamyloid state in a monomer-dimer equilibrium, stationary state of trimer, stable nucleus of two trimers, and a growing fibril. (B) Reaction scheme of seeded fibrillization. For parameters, see text.

seeds, however, were naturally occurring PrP^{Sc} purified by PTA precipitation (22). Although we do not claim that no cellular factors are involved in prion infection, they are currently unknown and cannot be taken into account. Furthermore, homogeneous incubation conditions and constant rigorous shaking were applied instead of alternating incubation and sonication as in PMCA-based experiments (15, 17, 24). To differentiate amyloid formation from generalized polymorphic aggregation, we used the amyloid-specific dye ThT as a marker. Analyzing the aggregate formation by differential centrifugation, only a seed-dependent increase in aggregation was obtained, but a background of spontaneous aggregation could not be avoided. In this study, we compared spontaneous and seeded fibrillization and showed that the spontaneous process takes several weeks, whereas the seeded process approaches saturation within 1–2 days. We had to limit the concentration of recPrP to 80 ng/μl to guarantee clearly distinguishable incubation times for spontaneous and seeded fibrillization.

Masel and colleagues described prion amplification as a seed-dependent fibrillization process (29). They used a set of differential equations incorporating parameters for seed-dependent growth (Fig. 5B, reaction E), degradation (reaction D), and/or breakage of fibrils (reaction B), which diminishes or produces more seeds, respectively, as well as considering the synthesis (λ) and degradation of monomeric PrP (δ). We present the scheme in the form published by Eigen (30) (Fig. 5B); in that publication, the possibility to apply the amplification for the sensitive detection of prions was raised independently of the PMCA approach of Soto and colleagues (15). Obviously, the calculations apply to homogeneous solution conditions only, i.e., growth and breakage simultaneously.

The shape of the experimental curves of seeded fibrillization is in agreement with the scheme depicted in Fig. 5B. The lag phase followed by a steep increase is interpreted as an exponential growth in which both growth and generation of new seeds contribute to the curve; saturation is due to the limited monomer supply and competing reactions. The effect of breakage can be enhanced by sonication (compare curves of solid line and open circles in Fig. 4C). The incubation time defined by Masel and Jansen (29) as the duration required to create a well defined number of infectious particles corresponds to the *in vivo* lag phase, that is, a fixed, in our case, low level of fluorescence intensity. Because of a constant

breakage rate, we can assume a constant medium size of the fibrils so that the number of particles is proportional to the fluorescence intensity. Furthermore, the concentration of monomeric PrP is assumed as constant during the lag phase. These assumptions might hold less well for very long lag phases because of degradation, denaturation, or aggregation of PrP, but these cases are not discussed here. The scheme in Fig. 5B and the calculations of Masel and Jansen (29) imply that the lag-phase t_1 depends on concentration of seeds ($c_{\text{PrP}^{\text{Sc}}}$) and the concentration of monomeric PrP (c_{PrP}), respectively, as:

$$t_1 = C_1 \times \ln C_{\text{PrP}^{\text{Sc}}} + C_2 \sqrt{C_{\text{PrP}}} = C_3 + \frac{C_4}{t_1}$$

C_1, C_2, C_3 , and C_4 are constants that are not further evaluated here. The calculated dependence of the lag phase on substrate (C_{PrP}) and seed ($C_{\text{PrP}^{\text{Sc}}}$) (Fig. 4B and D) are in agreement with the fibrillization scheme in Fig. 5B. Thus, our analysis confirms the three features of the scheme: exponential growth, dependence on $c_{\text{PrP}^{\text{Sc}}}$, and dependence on c_{PrP} . Also, the influence of sonication is in qualitative agreement; sonication breaks fibrils, thereby increases the number of seeds, and leads to a shortening of the lag phase as observed experimentally. The limited set and accuracy of the data do not allow us to evaluate parameters like growth rate, degradation rate, etc. It is not possible to extrapolate the *in vitro* lag phase to the typical incubation time in hamster that is $\approx 10^3$ times longer for the equivalent ID₅₀. If one considers, however, lower effective PrP^C levels (10×) and a clearance factor of PrP^{Sc} of 100 (31) in hamster, one would expect similarly long incubation times.

However, it is more difficult to interpret quantitatively the saturation levels. If depletion of the PrP reservoir is the only cause for plateau, then saturation levels would be proportional to c_{PrP} . Although the saturation level increases with c_{PrP} , the increase is not linear. Three types of reactions compete with fibril formation: (i) degradation and denaturation of PrP, (ii) degradation of fibrils and (iii) formation of polymorphous aggregates. As mentioned earlier, experimental evidence argues for seed-independent formation of polymorphous aggregates, which might influence the fibrillization process, particularly at later times. One might argue that competing reactions have more influence in the seeded reactions with natural PrP^{Sc}, with components from brain homogenates, compared with spontaneous fibrillization reactions.

The fibrillization system consisting only of purified, well defined components might be used as an amplification step to aid in the diagnosis of prion disease. In this homogeneous system, with sonication of the samples before measurement, we achieved a detection limit of 1.9×10^{-6} bc/μl, which corresponds to titers of $\approx 10^3 \cdot 10^4$ ID₅₀ units, comparable to the most sensitive immunoblots (32). The method does not apply any PK digestion and can be adapted easily to prions from other species, including humans, because neither cellular brain extract from noninfected subjects nor human cell culture is needed. Despite these advantages, the homogeneous system we describe cannot attain the sensitivity of PMCA. The amplification efficiency might be further increased by using polyelectrolytes as reported by Supattapone and colleagues (17) or by using membranes as carriers for PrP and supports for the amplification.

We have to emphasize that in the present work we did not concentrate on the optimization of the diagnostic application. In a related study Prusiner and colleagues (33) described the application of a very similar technique, called amyloid seeding assay, for prion diagnosis. Under their solution conditions prions from different hosts and strains can be detected comparably well and clearly differentiated from β -amyloid seeds characteristic for Alzheimer's disease.

Our studies demonstrate a principal difficulty of employing amplification systems for disease diagnosis. Sensitivity is paramount, yet can be increased nearly indefinitely. Perhaps a prion

amplification system of intermediate sensitivity can be combined with a detection system of robust sensitivity. Alternatively, we have applied single-prion particle counting by surface-FIDA for diagnostic purposes (22, 34), which might be improved in the future by combination with an amplification system as described here.

Materials and Methods

Prion Proteins. The truncated form of recPrP of Syrian hamster residues 90–231 was used. It was expressed, purified, and refolded as described (25, 35). PrP^{Sc} was isolated to high purity by using a modified protocol of the NaP_{TA} precipitation method (22, 36). Differing from the protocol, an additional washing step in 10 mM NaPi was performed and the resulting pellet was resuspended in 10 mM NaPi by brief sonication.

Electron microscopy, Negative Stain. A droplet of 5–10 μ l containing the sample was placed on the grid and left to adsorb for 2 min. After adsorption to the grid surface, the sample was washed briefly (in 50 μ l of 0.1 and 0.01 M NH₄ acetate) and stained with 2% ammonium molybdate (in 50 μ l).

Circular Dichroism Spectroscopy. CD spectra were recorded with a J-715 spectropolarimeter (Jasco) in a 0.1-cm quartz cuvette at room temperature. The scanning speed was 50 nm/min with a step resolution of 1 nm. For each sample, 10 spectra were accumulated between 195 and 260 nm. The protein concentration was 100 ng/ μ l. Buffer spectra were subtracted from the respective protein spectra.

Analytical Ultracentrifugation. Sedimentation-diffusion equilibrium experiments were performed in a Beckman Optima XL-A analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter) applying standard 12-mm double-sector cells at 20°C. Protein concentration distributions were recorded with a radial step size of 0.001 cm by using absorption optics at a wavelength of 230 nm or 280 nm, depending on the protein concentration. The data were analyzed by using the Global Fit procedure, which is implemented in the UltraScan II software package (Version 5.0 for UNIX) of B. Demeler (University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX). The absorbance vs. square of the radius values was fitted to a model of two components (ideal, noninteracting) by using the Marquardt–Levenberg algorithm in the

UltraScan program. Calculation of molecular mass with bound SDS per PrP was performed by using the method of Casassa and Eisenberg (37) as described in ref. 18.

Digestion with PK. recPrP (3 μ g of α -helical or fibrillar) was diluted into 0.05 M Tris-HCl (pH 8.0)/100 mM NaCl/2.5 mM EDTA; then 60 ng or 150 ng of PK (for 1:20 and 1:50 PrP:PK ratios, respectively) was added. After 1 h of incubation, the reaction was stopped by addition of gel-loading buffer and heated to 95°C for 10 min.

SDS/PAGE and Western Blotting. SDS/PAGE (15%) and Western blotting were carried out according to the protocols as described in ref. 23. Anti-PrP monoclonal antibody R1 (38) was used.

Thioflavin T Assay. Fluorescence emission spectra of ThT were measured at a concentration of 5 μ M ThT in 150–200 μ l volumes in the absence or presence of 10 ng/ μ l recPrP. The spectra were recorded from 460 to 600 nm with a fixed excitation wavelength of 455 nm. Fibrilization kinetics were followed in 96-well plates as described in *Results*. For reevaluation, average intensity values from 495 to 505 nm were plotted over time. All measurements were performed in a Tecan sapphire plate reader (Tecan Group).

Chemical Cross-linking of Dimers and Monomers. Dimers of recPrP were induced by diluting the protein in 0.2% SDS to fibrilization conditions (0.03% SDS and 250 mM NaCl) and incubated overnight at 25°C to achieve equilibrium conditions. The bifunctional chemical cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) (Pierce) was used at a protein concentration of 6 μ M and a final concentration of 1 mM EDC for 2 h (further details in ref. 20).

In-gel Digestion of Dimers and Monomers, and Analysis of the Fragments by ESI/Q-TOF Mass Spectrometry. In-gel digestion and analysis of the fragments by mass spectrometry were performed as in ref. 20.

ACKNOWLEDGMENTS. This work was supported by grants of the Bundesministerium für Bildung und Forschung, Deutsche Forschungsgemeinschaft, and the EU-Network of Excellence (NeuroPrion). T.K. was a fellow of the Grunderstiftung.

- Prusiner SB (2007) in *Fields Virology* (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), 5th Ed, pp 3059–3091.
- Kellings K, Meyer N, Miranda C, Prusiner SB, Riesner D (1992) Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J Gen Virol* 73(Pt 4):1025–1029.
- Safer JG, et al. (2005) Search for a prion-specific nucleic acid. *J Virol* 79:10796–10806.
- Cohen FE, et al. (1994) Structural clues to prion replication. *Science* 264:530–531.
- Eigen M (1996) Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys Chem* 63:A1–A18.
- Harper JD, Lansbury PT, Jr (1997) Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: Mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* 66:385–407.
- McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35:57–62.
- Caughey B, Raymond GJ, Ernst D, Race RE (1991) N-terminal truncation of the scrapie-associated form of PrP by lysosomal protease(s): Implications regarding the site of conversion of PrP to the protease-resistant state. *J Virol* 65:6597–6603.
- Pen KM, et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:10962–10966.
- Safer J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr (1993) Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci* 2:2206–2216.
- Prusiner SB, et al. (1983) Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35:349–358.
- McKinley MP, et al. (1991) Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J Virol* 65:1340–1351.
- Legname G, et al. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science* 305:673–676.
- Legname G, et al. (2005) Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2168–2173.
- Saborio GP, Permanne B, Soto C (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411:810–813.
- Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C (2005) In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121:195–206.
- Deleault NR, Harris BT, Rees JR, Supattapone S (2007) From the Cover: Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:9741–9746.
- Leffers KW, et al. (2004) The structural transition of the prion protein into its pathogenic conformation is induced by unmasking hydrophobic sites. *J Mol Biol* 344:839–853.
- Leffers KW, et al. (2005) Assembly of natural and recombinant prion protein into fibrils. *Biol Chem* 386:569–580.
- Keimann T, et al. (2007) Molecular model of an α -helical prion protein dimer and its monomeric subunits as derived from chemical cross-linking and molecular modeling calculations. *J Mol Biol*, 10.1016/j.jmb.2007.11.035.
- Bocharova OV, Breydo L, Salnikow VV, Gill AC, Baskakov IV (2005) Synthetic prions generated in vitro are similar to a newly identified subpopulation of PrP^{Sc} from sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Protein Sci* 14:1222–1232.
- Birkmann E, et al. (2006) Detection of prion particles in samples of BSE, scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion. *Biol Chem* 387:95–102.
- Post K, et al. (1998) Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. *Biol Chem* 379:1307–1317.
- Aterashi R, et al. (2007) Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat Methods* 4:645–650.
- Jansen K, et al. (2001) Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. *Biol Chem* 382:683–691.
- Liu H, et al. (1999) Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90–231). *Biochemistry* 38:5362–5377.
- Apetri AC, Surewicz WK (2003) A typical effect of salts on the thermodynamic stability of human prion protein. *J Biol Chem* 278:22187–22192.
- Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE (2004) Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8342–8347.
- Mase I, Jansen VA (2004) Prion kinetics. *Biophys J* 87:728.
- Eigen M (2001) BSE und das Prionen-Problem. *Spek Wiss* 4:40–49.
- Safer JG, et al. (2005) Prion clearance in bigenic mice. *J Gen Virol* 86:2913–2923.
- Thomzig A, Kratzel C, Lenz G, Kruger D, Beekes M (2003) Widespread PrP^{Sc} accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. *EMBO Rep* 4:530–533.
- Colby DW, Zhang J, Wang S, Groth D, Legname G, Riesner D, Prusiner SB (2007) Prion detection by an amyloid seeding assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:20914–20919.
- Birkmann E, et al. (2007) Counting of single prion particles bound to a capture-antibody surface (surface-FIDA). *Vet Microbiol* 123:294–304.
- Mehlhorn I, et al. (1996) High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry* 35:5528–5537.
- Safer J, et al. (1998) Eight prion strains have Pr(Pr)^{Sc} molecules with different conformations. *Nat Med* 4:1157–1165.
- Casassa EF, Eisenberg H (1964) Thermodynamic analysis of multicomponent solutions. *Adv Protein Chem* 19:287–295.
- Williamson RA, et al. (1998) Mapping the prion protein using recombinant antibodies. *J Virol* 72:9413–9418.

§ 4 Abs. 1

An der folgenden wissenschaftlichen Publikation hatte Giannantonio Panza folgenden Anteil:

Durchführung des größten Teils der Experimente und maßgeblicher Anteil am Manuskript.

Veröffentlichung 2: Spontaneous and BSE-prion seeded amyloid formation of full length recombinant bovine prion protein

Giannantonio Panza, Jan Stöhr, Christian Dumpitak, Dimitrios Papathanassiou, Jürgen Weiß, Detlev Riesner, Dieter Willbold, Eva Birkmann

Biochemical and Biophysical Research Communications; vol. 373; no. 4; s. 493-497

Impact factor = 2,648



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc

Spontaneous and BSE-prion-seeded amyloid formation of full length recombinant bovine prion protein

Giannantonio Panza^a, Jan Stöhr^a, Christian Dumpitak^a, Dimitrios Papathanassiou^a, Jürgen Weiß^c, Detlev Riesner^a, Dieter Willbold^{a,b}, Eva Birkmann^{a,b,*}

^a Institut fuer Physikalische Biologie and Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum, Heinrich-Heine-Universität Duesseldorf, Universitätsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany

^b Institut für Neurowissenschaften und Biophysik (INB-2), Forschungszentrum Juelich, 52425 Juelich, Germany

^c Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie, Deutsches Diabetes-Zentrum DDZ, 40225 Duesseldorf, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2008

Available online 26 June 2008

Keywords:

BSE-prions

Seeded vs. spontaneous conversion

Amyloid fibrils

Pre-amyloid state

ABSTRACT

The conversion of the cellular isoform of the prion protein into the pathogenic isoform PrP^{Sc} is the key event in prion diseases. The disease can occur spontaneously genetically or by infection. In earlier studies we presented an *in vitro* conversion system which simulates the structural transition in recPrP by varying low concentrations of SDS at constant NaCl. In the present study we adopted the conversion system from experimental Scrapie in hamster to bovine recPrP and generated amyloid fibrils. The intermediate state which is optimal for fibril formation is a soluble, β -rich state. The system was extended using BSE-prions as seeds and led to an acceleration of fibril formation by orders of magnitude. This seeded amyloid formation assay avoids any PK-treatment, is therefore able to detect even PK-sensitive PrP^{Sc} and does not require cellular components.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Prion diseases are fatal neurodegenerative diseases including Creutzfeldt-Jakob disease in humans (CJD), bovine spongiform encephalopathy (BSE) and Scrapie in sheep. The appearance of a new phenotype variant CJD (vCJD) was linked to the consumption of products from BSE-afflicted cattle and has led to an epidemic of about 180 human victims [1]. Besides the transmissible form of human prion diseases also a sporadic and a familial etiology has been found. The major if not only compound of prions is the host encoded prion protein which can occur in a cellular isoform denoted as PrP^C and in the pathogenic isoform PrP^{Sc} [2]. Amplification of the agent occurs by converting the cellular isoform PrP^C into the pathological isoform PrP^{Sc} where PrP^{Sc} acts as template and catalyst. The pool of PrP^C as substrate for further conversion is refilled by the cellular synthesis of PrP^C [2]. PrP^C is membrane bound, α -helix-rich, soluble and sensitive to degradation by proteinases, whereas the refolded isoform PrP^{Sc} is β -sheet-rich, insoluble and partially resistant to degradation by proteinases [3]. When PrP^{Sc} is digested with proteinase K (PK), an N-terminal truncated form is generated which is designated PrP 27–30 consisting of residues 90–231 with an approximate molecular mass of 27–30 kDa. Currently the molecular mechanism of the PrP^C to PrP^{Sc} conversion is not known in detail. Several mechanistic mod-

els have been proposed for this conformational transition, among them the heterodimer model [4], i.e. an intermediate dimer of PrP^C and PrP^{Sc}, the cooperative model similar to a cooperative conformational change of an oligomeric enzyme [5,6], and the model of seeded polymerization [5,7,8]. The mechanism of conversion can be studied experimentally *in vitro* by so-called conversion systems which favor the formation of amyloid fibrils [9,10]. In one report infectivity could be generated using solely purified recombinant murine PrP (89–230) [11]. For the first time it was shown that conversion of recombinant prion protein is sufficient to generate *in vitro* infectivity, although the titer of infectivity was very low. Fibril formation of PrP *in vitro* may be achieved according to two different protocols. The conversion of recPrP in the absence of PrP^{Sc} as seed occurs after prolonged incubation; it might serve as a model for the sporadic forms of prion disease *in vivo*. As an alternative PrP fibril formation can be studied in the presence of PrP^{Sc} as a seed, and this mechanism would be equivalent to a prion infection.

In this work we adopt the recently published *in vitro* conversion assay developed for recombinant hamster PrP (90–231) (rec SHaPrP) in our group earlier [10], to full length recombinant bovine PrP (rec boVPrP). This amyloid forming assay is based on the well balanced concentrations of SDS and NaCl. It has been shown that an intermediate, partially denatured state of PrP favors fibril formation [10]. The system was extended using PTA-purified full length PrP^{Sc} as seed and the formation of amyloid fibrils was accelerated by orders of magnitude [10]. In the present study we establish the

* Corresponding author. Address: Institut fuer Physikalische Biologie and Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum, Heinrich-Heine-Universität Duesseldorf, Universitätsstr. 1, 40225 Duesseldorf, Germany. Fax: +49 211 81 15167.
E-mail address: Birkmann@biophys.uni-duesseldorf.de (E. Birkmann).

conversion of rec boVPrP to amyloid fibrils and we use natural PTA-purified BSE-prions [12] as seed.

Materials and methods

Prion proteins. The full length recombinant bovine PrP (25–241) (rec boVPrP) proteins were prepared and purified as described previously [13,14]. BSE-prions were isolated to high purity using a modified protocol of the NaPTA precipitation protocol [12,15]. Differing from the protocol, two additional washing steps in 100 and 10 mM NaPi, respectively, was performed and the resulting pellet was resuspended in 10 mM NaPi by brief sonification (Sonificator, Labsonic U, Braun Dissel, Melsungen).

Electron microscopy, negative stain. A droplet of 5–10 μ l containing the sample was placed on glow discharged grid and left to adsorb for 2 min. After adsorption to the grid surface the sample was washed briefly (in 50 μ l of: 0.1 and 0.01 M NH_4 acetate) and stained with 2% ammoniummolybdate (in 50 μ l). The samples were viewed with a Zeiss EM910 microscope at 80 kV.

Circular dichroism spectroscopy. Circular dichroism (CD) spectra were recorded with a J-715 spectropolarimeter (Jasco, Easton, MD, USA) in a 0.1 cm quartz cuvette at room temperature. The scanning speed was 50 nm/min with a step resolution of 1 nm. For each sample 10 spectra were accumulated between 195 and 260 nm. The protein concentration was 150 ng/ μ l. Background spectra of buffer samples were subtracted from the respective protein spectra.

Thioflavin T-assay. Fluorescence emission spectra of Thioflavin T (ThT) were measured at a concentration of 5 μ M ThT in 150 μ l in absence or presence of 10 ng/ μ l recPrP. The spectra were recorded from 460 to 600 nm with a fixed excitation wavelength of 455 nm.

Fibrillization kinetics was followed in 96 well plates according to Stöhr et al. [10]. For evaluation average intensity values from 495 to 505 nm were plotted over time. All measurements were performed in a Tecan sapphire plate reader (Tecan Group, Maennedorf, Switzerland).

Congo red staining. A 10 μ l aliquot of the fibril samples containing preformed fibrils was applied to gelatin-coated glass slides and stained with Congo red according to the protocol described by Muller et al. [16]. Picture of the samples were taken with the "Polarisationsphotomikroskop III" (Carl Zeiss, Oberkochen, D).

Results

In previous studies we described different conformational states including fibrils of rec SHaPrP (90–231) using an *in vitro* con-

version system, in which the concentrations of SDS and NaCl were varied [9,17]. We found that for optimal fibril formation of rec SHaPrP a so-called preamyloid state has to be established which is soluble for several days. It is a mixture of a monomeric and a dimeric state, and its structure is partially α -helical and partially denatured. In the present work this system was optimized to produce amyloid fibrils of full length rec boVPrP (25–241). Concentration of NaCl was 250 mM and SDS concentration was varied for amyloid formation.

Analysis of the pre-amyloid state of rec boVPrP

We analyzed the secondary structure of rec boVPrP at different SDS concentrations by CD-spectroscopy (Fig. 1A). In the absence of NaCl at 0.2% SDS which are our conditions of long time storage (data not shown) and in the presence of 250 mM NaCl at 0.1%, 0.04%, and 0.03% SDS the secondary structure of rec boVPrP exhibits a mixture of random coil α -helix contents and very little β -sheet content very similar to the earlier described pre-amyloid state of rec SHaPrP (90–231) (Fig. 1C) [10]. Diluting SDS further i.e. to 0.02% and 0.01% SDS leads to a shift towards a β -sheet-rich secondary structure at the expense of the random coil portion (Fig. 1A).

The N-terminal truncated form of the rec boVPrP, i.e. PrP (102–241) does not show the same secondary structure like the full length rec boVPrP at 0.02% SDS in presence of 250 mM NaCl, but has a higher random coil content, similar to full length PrP at $\geq 0.03\%$ SDS (Fig. 1B). Unfortunately availability of the N-terminal truncated form of rec boVPrP was very limited; therefore we had to restrict our studies on the comparison of the amyloid forming conditions adjusted for full length rec boVPrP (0.02% SDS, 250 mM NaCl). Therefore, we could compare only the structure of full length and truncated rec boVPrP, but not the optimization of fibrillization.

In contrast to the bovine system the conformation of the N-terminal truncated rec SHaPrP (90–231) [10], and the full length rec SHaPrP (23–231) (Fig. 1B and C) are very similar when determined under amyloid forming conditions (0.03% SDS, 250 mM NaCl). Both are a mixture of α -helical and denatured structure and have only little content of β -sheet secondary structure.

Spontaneous amyloid formation of rec boVPrP

Formation of amyloids were verified by the amyloid specific fluorescence assay with Thioflavin T and congo red staining [18,19].

After 6 weeks incubation rec boVPrP formed amyloid fibrils under the conditions of 250 mM NaCl and 0.02% SDS. Neither the

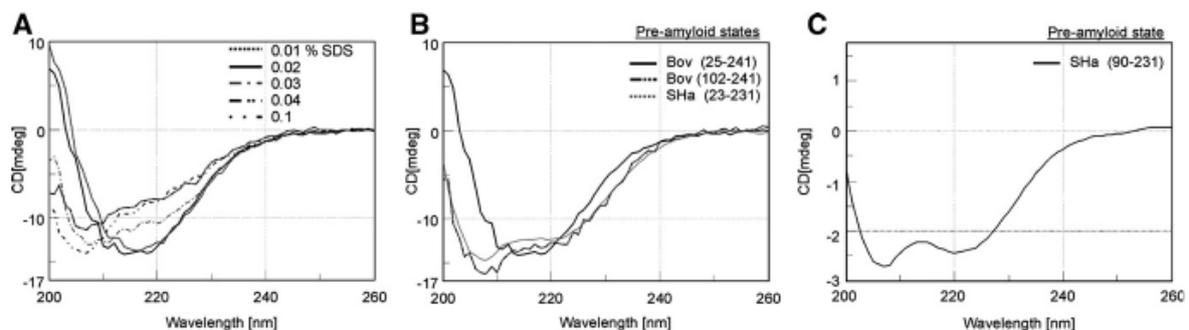


Fig. 1. Secondary structure analysis of the pre-amyloid state. CD-spectra were measured directly after adapting the SDS conditions, with a final concentration of 150 ng/ μ l PrP in 10 mM NaPi pH 7.4 and 250 mM NaCl. (A) CD-spectrum of rec boVPrP (25–241) in 0.01 (.....), 0.02 (—), 0.03 (— · —), 0.04 (— · · —), and in 0.1 (· · · ·) SDS. (B) Pre-amyloid state of rec boVPrP (25–241) (—) and rec boVPrP (102–241) (— · · —) (amyloid character after incubation proofed by ThT-assay; data not shown) were measured as described above in 0.02% SDS. Rec SHaPrP (23–231) (— · · —) (amyloid character after incubation proofed by ThT-assay; data not shown) were measured as described above in 0.03% SDS. (C) Pre-amyloid state of rec SHaPrP (90–231) (—) taken from Stöhr et al. [10], were measured as described above in 0.02% SDS and with a final concentration of 100 ng/ μ l PrP.

incubation in 0.04% SDS and 250 mM NaCl showed amyloid fibrils within 6 weeks (Fig. 2A) nor higher than 0.04% SDS or lower than 0.02% SDS concentrations did so. Under the optimal conditions of 0.02% SDS the characteristic increase in Thioflavin T fluorescence and the apple-green birefringence after congo red staining (Fig. 2B) was observed already after 1 week. The resulting structures were further characterized by electron microscopy and showed the well known fibrillar structures (Fig. 3C).

BSE-prion-seeded amyloid formation of rec boPrP

As our main task we analyzed the effect of BSE-prions as seeds for fibril formation of rec boPrP. As described above, the ThT-assay was used to monitor fibril formation. We used BSE-prions which were partially purified according to the PTA-precipitation protocol [12]. Significant amounts of BSE-prions are degraded by PK and the portion of PK resistant BSE-prions varies from cattle

to cattle and from one brain area to another [12,20]. In Fig. 3A an example is shown, where only a small amount of the PrP in the crude brain homogenate was PK-resistant.

We observed a steep increase of Thioflavin T fluorescence after adding BSE-prions to the fibrillization mix of rec boPrP. As controls identically treated brain tissue from healthy cattle were used as hypothetical seed, but only a very low increase of fluorescence intensity was observed. The background fluorescence of the seeds in the absence of rec boPrP or of control “precipitate” was always subtracted. At 0.04% SDS seeded fibril formation of rec boPrP could not be observed (Fig. 3B).

SDS dependence of seeded amyloid formation

We tested also other SDS concentration in the seeded fibrillization assay (Fig. 4) and determined the plateau fluorescence intensity. As controls although hypothetical seeds from non-infected brain were used. As shown in Fig. 4 a significant prion-seed dependent fibrillization was achieved only in 0.02% SDS. In 0.01% an unspecific fluorescence increase and in higher than 0.02% SDS nearly no seed dependent fluorescence increase was observed. Consequently the soluble state with higher random coil content ($\geq 0.03\%$ SDS), does not lead to seeded amyloid formation, and in 0.01% SDS the unspecific fluorescence increase might indicate polymorphic β -state rich aggregates, because rec boPrP is β -sheet rich under this condition independent upon the presence of prion-seeds.

Discussion

The mechanism of PrP amyloid formation has been studied in detail in the mouse and hamster system [10,11]. Particular solution condition had been established for spontaneous formation of amyloid fibrils from recombinant prion protein, and those fibrils had been characterized by structure specific ThT-fluorescence, partial PK-resistance and electron microscopy. In some reports prion infectivity in mammals could be induced from recombinant PrP, which had never been in contact with any other organism than *Escherichia coli*, leading to the expression “synthetic prions” [11]. Thus it has been shown that infectivity can be generated spontaneously *in vitro*, a process which is well known in nature from spontaneous (or sporadic) CJD. However, *in vivo* cellular factors might be involved which were completely absent in synthetic prions as well as in our experiments.

Direct relevance for our understanding of the prion infection process was obtained from *in vitro* fibrillization induced by prion-seeds. The addition of prions as seeds reduced the time of fibrillization from several weeks to several hours [10]. In the present work we have established the spontaneous as well as the seeded fibrillization for the bovine system. It means that the mechanism which was studied so far in the model system of hamster and mouse was elucidated in the present study in a system of direct veterinary relevance; full length recombinant bovine PrP and prions from BSE-afflicted cattle were used. As in our earlier studies with the mouse and the hamster system, prions were prepared as NaPTA-precipitated PrP^{Sc} from the animal brain without a PK-digestion step. This has two advantages: first due the complete absence of PK the full length rec PrP as substrate remains stable, i.e. cannot be inactivated by not fully removable PK, and second in respect to a diagnostic approach not only the PK-resistant portion of PrP^{Sc} but total PrP^{Sc} would be detectable.

A major interest in the comparison of the bovine system with the mouse and the hamster system is the pre-amyloid state. It was reported that rec PrP in the preamyloid state is soluble for

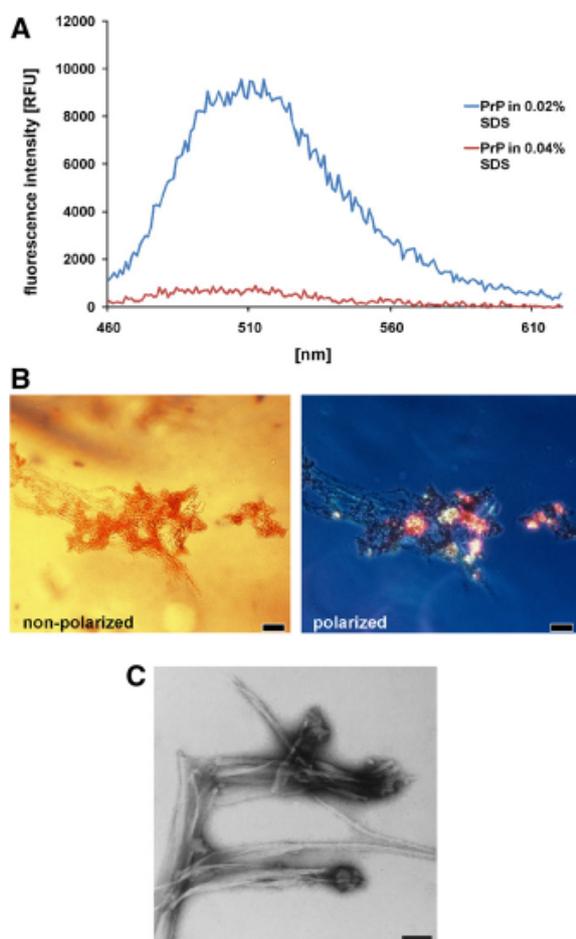


Fig. 2. Amyloid character of rec boPrP after incubation. (A) PrP was incubated in 0.02% SDS (blue) or 0.04% SDS (red): Characterization of amyloid formation (0.02% SDS) by Thioflavin T-assay of PrP fibrils. ThT was added to a final concentration of 5 μ M by a final protein concentration of 10 ng/ μ l and in 10 mM NaPi (pH 7.4) with 250 mM NaCl. (B) PrP fibrils formed in 0.02% SDS were stained with Congo red and analyzed by light microscopy using polarized and non-polarized light (bar = 20 μ m). (C) Electron micrograph showing the typical structure of amyloid fibrils after 7 days of incubation in 0.02% SDS (bar = 200 nm). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

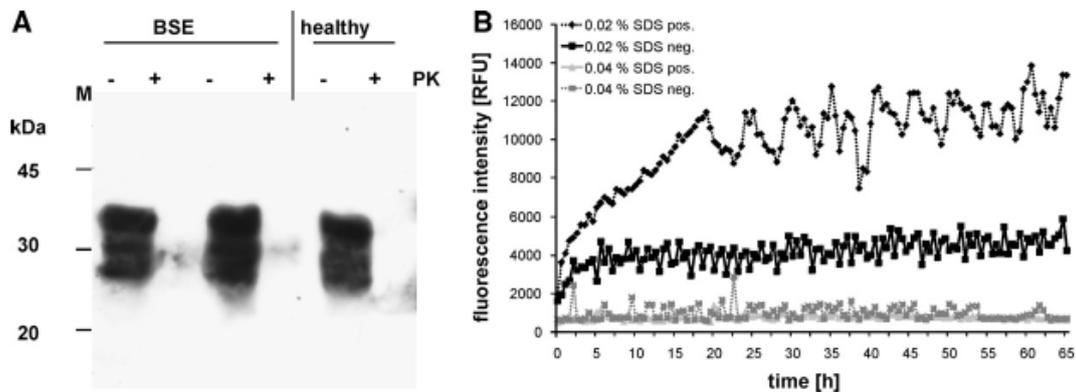


Fig. 3. Amplification of rec boPrP with purified PK-sensitive BSE-prions. (A) Western Blot analysis of crude brain homogenate of BSE-afflicted cattle and healthy control before and after PK-digestion (anti-PrP monoclonal antibody: 6H4, Prionics, Schlieren, Switzerland); peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson Immuno Research, Soham, UK). (B) Fibril formation of rec boPrP (80 ng/μl) was monitored using ThT-fluorescence assay in presence of BSE-prions and in 10 mM NaPi (pH 7.4) with 250 mM NaCl at 37 °C.

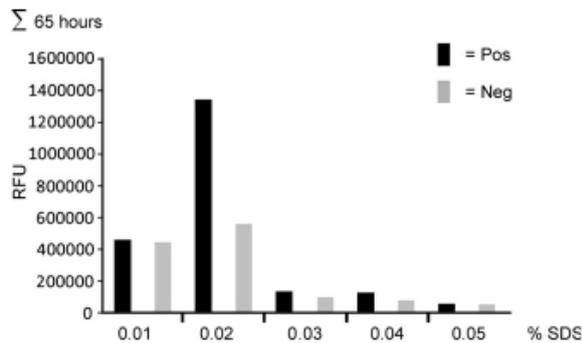


Fig. 4. Dependence on SDS concentration of the amyloid seeding assay. Amyloid formation in the seeding assay was monitored using Thioflavin T. The fluorescence signals were recorded every 30 min at 37 °C and added after 65 h. At constant buffer conditions (10 mM NaPi, pH 7.4, 250 mM NaCl) only SDS was varied from 0.01% to 0.05% SDS in line with the conditions in Fig. 1.

weeks, is in monomer–dimer equilibrium and is partially denatured with the remaining structure mainly α -helical. In the earlier as well as in the present study conditions for the pre-amyloid state were optimized by varying the SDS concentration between 0.01% and 0.05% SDS at constant 250 mM NaCl and neutral pH. Optimized conditions for the pre-amyloid state mean effective fibril formation, very little formation of polymorphic aggregates and orders of magnitude acceleration by seeds. For the bovine system 0.02% SDS was found optimal in comparison with 0.03% SDS for the hamster system. From the CD-spectra of both cases (Fig. 1B) one has to conclude that the pre-amyloid state of bovine PrP is more shifted from the denatured/ α -helical (hamster) to a α -helical/ β -sheet rich state. Therefore the higher content of β -sheet of the pre-amyloid state is a characteristic of the full length bovine PrP. Even the N-terminal truncated bovine PrP (102–241) and full length hamster PrP (23–231) are more shifted to denatured/ α -helical secondary structures (Fig. 1B). Therefore we have to conclude the difference in the optimal fibrillization conditions is due to both the amino acid sequence differences between hamster and bovine and the differences of length between the full length bovine PrP (25–231) and the truncated form (PrP 102–241).

In summary, we have shown that spontaneous and PrP^{Sc}-seeded fibril formation can be achieved with full length bovine PrP. Amplifying seeds by fibrillization was introduced recently as amyloid

seeding assay (ASA) and was described for the human, mouse, and hamster system [10,21]. In the present study it was applied also for the bovine system although that application has been not yet optimized. As discussed earlier ASA is much more simple and faster as compared to the PMCA-technique, because no cellular extract is needed and only a simple homogeneous inoculation has to be established. Atarashi et al. have described recently a very similar assay called QUICK [22]. PMCA, however is more sensitive. After optimization ASA might be particularly favorable for BSE-prion-testing, since PK-digestion is avoided completely in a system where the portion of PK-sensitive PrP^{Sc} is fairly high as shown in Fig. 3A.

Acknowledgments

This work was supported by the EU-Network of Excellence "NeuroPrion" (FOOD-CT-2004-506579); by a grant from the "Präsidentenfond der Helmholtzgemeinschaft" (HGF, "Virtual Institute of Structural Biology"); the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG); the Food Standards Agency UK (M03R0005/004).

We want to thank Bernd Esters for his guidance in cloning and expression of the bovine prion proteins.

References

- [1] R.G. Will, J.W. Ironside, M. Zeidler, S.N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman, P.G. Smith, A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK, *Lancet* 347 (9006) (1996) 921–925.
- [2] S.B. Prusiner, Prions, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (23) (1998) 13363–13383.
- [3] J.W. Ironside, Prion diseases in man, *J. Pathol.* 186 (3) (1998) 227–234.
- [4] F.E. Cohen, K.M. Pan, Z. Huang, M. Baldwin, R.J. Fletterick, S.B. Prusiner, Structural clues to prion replication, *Science* 264 (5158) (1994) 530–531.
- [5] M. Eigen, Prionics or the kinetic basis of prion diseases, *Biophys. Chem.* 63 (1) (1996) A1–A18.
- [6] M. Laurent, Autocatalytic processes in cooperative mechanisms of prion diseases, *FEBS Lett.* 407 (1) (1997) 1–6.
- [7] J.D. Harper, P.T. Lansbury Jr., Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins, *Annu. Rev. Biochem.* 66 (1997) 385–407.
- [8] J.T. Jarrett, P.T. Lansbury Jr., Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73 (6) (1993) 1055–1058.
- [9] K.W. Leffers, H. Wille, J. Stöhr, E. Junger, S.B. Prusiner, D. Riesner, Assembly of natural and recombinant prion protein into fibrils, *Biol. Chem.* 386 (6) (2005) 569–580.
- [10] J. Stöhr, N. Weinmann, H. Wille, T. Kaimann, L. Nagel-Steger, E. Birkmann, G. Panza, S.B. Prusiner, M. Eigen, D. Riesner, Mechanisms of prion protein assembly into amyloid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (7) (2008) 2409–2414.

- [11] G. Legname, I.V. Baskakov, H.O. Nguyen, D. Riesner, F.E. Cohen, S.J. Dearmond, S.B. Prusiner, Synthetic mammalian prions, *Science* 305 (5684) (2004) 673–676.
- [12] E. Birkmann, O. Schafer, N. Weinmann, C. Dumpitak, M. Beekes, R. Jackman, L. Thorne, D. Riesner, Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion, *Biol. Chem.* 387 (1) (2006) 95–102.
- [13] K. Jansen, O. Schafer, E. Birkmann, K. Post, H. Serban, S.B. Prusiner, D. Riesner, Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form, *Biol. Chem.* 382 (4) (2001) 683–691.
- [14] I. Mehlhorn, D. Groth, J. Stockel, B. Moffat, D. Reilly, D. Yansura, W.S. Willett, M. Baldwin, R. Fletterick, F.E. Cohen, R. Vandlen, D. Henner, S.B. Prusiner, High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein, *Biochemistry* 35 (17) (1996) 5528–5537.
- [15] J. Safar, H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations, *Nat. Med.* 4 (10) (1998) 1157–1165.
- [16] H. Muller, L. Stitz, H. Wille, S.B. Prusiner, D. Riesner, Influence of water, fat, and glycerol on the mechanism of thermal prion inactivation, *J. Biol. Chem.* 282 (49) (2007) 35855–35867.
- [17] K.W. Leffers, J. Schell, K. Jansen, R. Lucassen, T. Kaimann, L. Nagel-Steger, J. Tatzelt, D. Riesner, The structural transition of the prion protein into its pathogenic conformation is induced by unmasking hydrophobic sites, *J. Mol. Biol.* 344 (3) (2004) 839–853.
- [18] W.E. Klunk, J.W. Pettegrew, D.J. Abraham, Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation, *J. Histochem. Cytochem.* 37 (8) (1989) 1273–1281.
- [19] M.R. Krebs, E.H. Bromley, A.M. Donald, The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications, *J. Struct. Biol.* 149 (1) (2005) 30–37.
- [20] J.G. Safar, M. Scott, J. Monaghan, C. Deering, S. Didorenko, J. Vergara, H. Ball, G. Legname, E. Leclerc, L. Solfrosi, H. Serban, D. Groth, D.R. Burton, S.B. Prusiner, R.A. Williamson, Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice, *Nat. Biotechnol.* 20 (11) (2002) 1147–1150.
- [21] D.W. Colby, Q. Zhang, S. Wang, D. Groth, G. Legname, D. Riesner, S.B. Prusiner, Prion detection by an amyloid seeding assay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 (52) (2007) 20914–20919.
- [22] R. Atarashi, J.M. Wilham, L. Christensen, A.G. Hughson, R.A. Moore, L.M. Johnson, H.A. Onwubiko, S.A. Priola, B. Caughey, Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking, *Nat. Methods* 5 (3) (2008) 211–212.

§ 4 Abs. 1

An der folgenden wissenschaftlichen Publikation hatte Giannantonio Panza folgenden Anteil:

Durchführung des größten Teils der Experimente und maßgeblicher Anteil am Manuskript.

Veröffentlichung 3: Molecular interactions between prions as seeds and recombinant prion-proteins as substrates resemble the biological interspecies barrier *in vitro*

Giannantonio Panza, Lars Lueers, Jürgen Weiß, Detlev Riesner, Dieter Willbold and Eva Birkmann

Manuscript submitted

Molecular interactions between prions as seeds and recombinant prion-proteins as substrates resemble the biological interspecies barrier *in vitro*

Giannantonio Panza^a, Lars Luers^a, Luitgard Nagel-Steger^a, Jürgen Weiß^c, Detlev Riesner^a, Dieter Willbold^{a,b} and Eva Birkmann^{a,b}

a. *Institut fuer Physikalische Biologie and Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum,
Heinrich-Heine-Universitaet Duesseldorf,
40225 Duesseldorf, Germany*

b. *Institut für Strukturbiologie und Biophysik (ISB-3),
Forschungszentrum Juelich,
52425 Juelich, Germany*

c. *Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie
Deutsches Diabetes-Zentrum DDZ
40225 Duesseldorf, Germany*

Keywords:

prion diseases, species barrier, interspecies transmission, seeded fibril formation

Corresponding Author:

*Institut für Strukturbiologie und Biophysik (ISB-3),
Forschungszentrum Juelich,
52425 Juelich, Germany*

Email: e.birkmann@fz-juelich.de

Tel.: 0049211/8112342

Fax: 0049211/8115167

Abstract:

Prion diseases like Creutzfeldt-Jakob disease in humans, Scrapie in sheep or bovine spongiform encephalopathy are fatal neurodegenerative diseases, which can be of sporadic, genetic, or infectious origin. Prion diseases are transmissible between different species, however, with a variable species barrier. The key event of prion amplification is the conversion of the cellular isoform of the prion protein (PrP^{C}) into the pathogenic isoform (PrP^{Sc}). We developed a sodiumdodecylsulfate-based PrP conversion system that induces amyloid fibril formation from soluble α -helical structured recombinant PrP (recPrP). This approach was extended applying pre-purified PrP^{Sc} as seeds which accelerate fibrillization of recPrP. In the present study we investigated the interspecies coherence of prion disease. Therefore we used PrP^{Sc} from different species like Syrian hamster, cattle, mouse and sheep and seeded fibrillization of recPrP from the same or other species to mimic *in vitro* the natural species barrier. We could show that the *in vitro* system of seeded fibrillization is in accordance with what is known from the naturally occurring species barriers.

Author Summary:

Prions are the pathogenic agents of prion diseases that occur in different mammals e.g. cattle, sheep, deer and human. Prions are composed mainly of the host encoded prion protein (PrP^{C}) in an alternative conformation (PrP^{Sc}). Prion diseases are transmissible and since a prion disease in cattle (BSE = Bovine Spongiforme Encephalopathy) caused an epidemic in the UK, transmission of prions has moved into the focus of public. Prion diseases are not only transmissible within one species, but also between different species. Thus, it is assumed that the BSE epidemic was caused because the prion disease of sheep (Scrapie) was transmitted to cattle by feeding of not completely decontaminated meat and bone meal. Transmission between certain species, however, can fail, as is described for Syrian hamster prions that have not yet been able to be transmitted to mice. This phenomenon is called species barrier. Currently, the molecular mechanism underlying the observation that prions can be

transmitted between certain species and not within others is poorly understood. We developed a PrP conversion system to study prion interspecies transmission *in vitro* by converting recombinant PrP (recPrP) of one species to misfolded prion-like aggregates by seeding them with isolated natural prions from another species. Based on previous studies we characterized a structural intermediate of recPrP that is essential for formation of prion-like aggregates. Furthermore we were able to model interspecies transmission and barrier on the molecular level that are in accordance with data observed *in vivo*, solely utilizing proteinous compounds: recPrP and prepurified PrP^{Sc}. Our study illustrates that the interspecies barrier is encrypted on the molecular level based on the properties of the respective prion protein. Therewith we introduce a new tool to predict possible interspecies transmission and barriers, which have not been elucidated *in vitro* so far, like for example from deer to human.

Introduction:

Prion diseases are fatal progressive neurodegenerative diseases of spontaneous, genetic, or infectious origin. The conversion of the host encoded prion protein (PrP^C) into the disease causing isoform PrP^{Sc} is the key molecular event in prion disease. The common hypothesis is, that the amplification of PrP^{Sc} takes place by conversion of the α -helical dominated cellular isoform PrP^C into β -sheet rich and insoluble PrP^{Sc}. PrP^{Sc} acts as template and catalyst for PrP^C conversion [1]. The pool of PrP^C is replenished by the cellular synthesis of PrP^C. Some mechanistic models have been suggested, including the heterodimer model [2], the cooperative model [3], and the model of seeded polymerization [4]. Most experimental data support the seeded polymerization. Prion diseases are not only transmissible within one species, but in some cases also between different species [5]. This so called “interspecies transmission” is of special interest since the origin of bovine spongiform encephalopathy is suspected to be caused by feeding meat and bone meal from Scrapie infected sheep to cattle, i.e. an interspecies transmission might have lead to the BSE-epidemic in the UK [6]. In an experimental approach it was indeed shown that cattle are susceptible to infection by sheep Scrapie

isolates [7]. On the other hand it is known that interspecies transmission can fail e.g. Syrian hamster Scrapie is not transmissible to mice [8]. In that case the interspecies barrier would be too high for experimental observation. The molecular mechanism of prion disease transmissibility between different species is still not understood.

A molecular model for the infectious process of prions is the conversion of PrP^C to PrP^{Sc} induced by the invading PrP^{Sc}. As mentioned above, the widely accepted mechanistic model is that of PrP^{Sc} acting as seed for polymerization of PrP^C [9], [4], [10]. To study the mechanism of spontaneous and seed-dependent fibrillization of recPrP different *in vitro* conversion assays were introduced, which lead to the formation of amyloid fibrils [11] [12] [13]. It was reported that in such a system infectivity was even generated *de novo* using only murine recPrP [14], i.e. without PrP^{Sc} as seed, which would represent a model for the sporadic case of prion diseases.

In this study we use the SDS PrP conversion system to simulate intra- and interspecies transmission *in vitro*. It is a minimal system in the sense, that only recPrP as substrate, buffer, and purified PrP^{Sc} as seed, but no cellular extract is needed. We extend the spontaneous and seed dependent conversion, established for recombinant Syrian hamster PrP [11] and bovine recPrP [15], to recombinant ovine and murine PrP. It has been shown earlier that well balanced concentrations of sodium chloride and SDS have to be chosen for every substrate PrP in order to guarantee a suitable extent of partial denaturation, which is a prerequisite for fibrillization, spontaneous as well as seeded fibrillization.

To monitor fibrillization of recPrP we used the amyloid specific marker Thioflavin T (ThT). We are able to mimic the species barrier *in vitro* in complete accordance with the species barrier as found with the *in vitro* infection of prions.

Results

In our previous studies we analyzed spontaneous and PrP^{Sc}-seeded fibril formation of recombinant PrP (recPrP). Buffer conditions were established which consist of well selected SDS and NaCl

concentrations, so that recPrP forms spontaneously amyloid fibrils within weeks, but the fibril formation was accelerated by seeding with PrP^{Sc} to hours or days. It is important to note, that the optimal buffer conditions had to be selected for the species of recPrP during spontaneous fibril formation, and these conditions were used for seeded fibril formation. It was discussed earlier that the buffer conditions allow a particular extent of partial denaturation of recPrP in a well characterized pre-amyloid state. Spontaneous and seeded fibril formation of recPrP was analyzed with bovine and hamster recPrP as substrate and the homologous NaPTA-precipitated PrP^{Sc} as seeds [11,15]. In the present study, we established conditions for spontaneous and seeded fibril formation of rekPrP from sheep (aminoacids: 25-233) and mouse (aminoacids 89-231). The aim of this study was to combine recPrP-substrates and PrP^{Sc}-seeds of different species to investigate if the fibril formation *in vitro* does resemble the well known phenomenon of species barrier for transmissibility. In our system the species barrier phenomena are studied on the level of the molecular interaction of PrP and PrP^{Sc}.

Spontaneous fibril formation of recombinant ovine and murine prion protein

To determine optimal buffer conditions in which ovine PrP (OvPrP) forms amyloid fibrils, we analyzed OvPrP fibril formation in 10 mM NaPi, 250 mM NaCl by varying the SDS-concentration from 0.01 to 0.05 %. Fibril formation was followed in the Thioflavin T assay. Incubation was carried out at 37°C under constant agitation for 4 weeks and fibrils could be observed at 0.02 % SDS after three to four weeks (fig 1A). The fibrillar character of OvPrP was verified by electron microscopy (fig 1B). At higher or lower SDS-concentrations amyloid specific fluorescence increase could not be observed. Therefore in all the following experiments with OvPrP, the buffer was NaPi pH 7.2, 250 mM NaCl and 0.02 % SDS. As mentioned above amyloid formation depends upon of a specific pre-amyloid state of recPrP as long as it is soluble [11,15]. Therefore we analyzed also the pre-amyloid state of OvPrP. The secondary structure, revealed with circular dichroism, showed in some contrast to formerly analyzed initial-states a higher random-coil amount (fig 1 C). In line with previous studies

[11] the analytical ultracentrifugation data revealed an equilibrium of monomeric (33 %) and dimeric (67 %) OvPrP (fig 1D).

Buffer conditions for fibril formation of murine recPrP (MuPrP) were analyzed in the same way. It was found that a wider SDS-range was suitable for fibril formation, with an optimum at 0.04% SDS in NaPi pH 7.4, 250 mM (data not shown).

Intraspecies PrP^{Sc}-seeded amyloid formation

In previous studies we showed that NaPTA-precipitated PrP^{Sc} from brain homogenate works very well as seed and could drastically accelerate fibril formation. As a control, NaPTA-precipitate from brain homogenate of uninfected sheep did not show any acceleration effect. For the ovine system, NaPTA-precipitated PrP^{Sc} from brain tissue of Scrapie-infected sheeps (OvPrP^{Sc}) was used as seed and accelerated fibril formation was observed based on the increase of ThT-fluorescence within 10 to 20 hours (Fig 2A). The approach was carried out with 40 ng/μl rec OvPrP (1.8 μM) in conversion buffer and 0.02% SDS.

We also adopted the seed dependent fibril formation whereas spontaneous fibril formation of MuPrP took place only after one week (data not shown). NaPTA-precipitated PrP^{Sc} from mouse brain accelerated the process down to 10 to 20 hours (Fig 2 B). As a control NaPTA-precipitate of non-infected mouse brain tissue did not lead to any formation of amyloidic fibrils in the time range of the experiment.

In vitro species barrier

The aim of this study was to analyze the species barrier of prion infection *in vitro*, i.e. with PrP^{Sc}-seeds and otherwise purified components only. From natural and experimental transmission data it is known that prion diseases are transmissible in some cases from one species to another and in other cases not. This phenomenon is commonly known as species barrier. PrP^{Sc} from brain homogenate of one species

was taken as seeds and recPrP of another species as template. Transmission was simulated by fibrillization in our *in vitro* conversion assay with the exact concentrations of that particular species.

As an example of interspecies transmission of ovine Scrapie to cattle as recipient [7] is shown in fig. 2 C using OvPrP^{Sc} as seed and BovPrP as substrate. Accelerated fibril formation of BovPrP by OvPrP^{Sc}-seed is clearly observed, very similar to the intraspecies seeded fibrillization in sheep (fig. 2 A).

In another example, murine recPrP was seeded with prions from Scrapie infected hamster. In contrast to the intraspecies seeded fibrillization of MuPrP (fig. 2 B), no increase of the ThT-fluorescence was measured within a time period of 48 hours (fig 2 D). This means, that SHaPrP^{Sc} does not act as seed for accelerated fibril formation of MuPrP. This corresponds to the well known species barrier between Syrian hamster Scrapie and mouse as recipient [8]. In all seeded fibrillization experiments, i.e. intraspecies as well as interspecies combinations, control experiments with NaPTA- precipitate of brain tissue from non-infected animals, as seeds were carried out, and absence of ThT-fluorescence increase was taken as negative control (fig. 2 blue lines).

In figure 3 all results of various seed - substrate combinations are summarized. The ThT-fluorescence intensities in the time period of 24 to 48 hours of incubation and after seeding were summarized. Interspecies transmission is obvious for five different combinations of PrP^{Sc}-seeds and recPrP substrate: OvPrP^{Sc} to SHaPrP, OvPrP^{Sc} to BovPrP, SHaPrP^{Sc} to OvPrP, SHaPrP^{Sc} to BovPrP and BovPrP^{Sc} to OvPrP. In our system, approach two well known *in vivo* interspecies barriers [8] [16] could be verified *in vitro*, namely the species barrier of BSE to Syrian Hamster as well as of Syrian Hamster Scrapie to mouse. In summary, all of our *in vitro* intra- and interspecies transmission results resemble exactly the *in vivo* situation (figure 4).

Discussion:

Conversion of the cellular prion protein (PrP^C) to PrP^{Sc} is assumed as the key event in prion infection [2]. Although many studies with recPrP and with different conversion systems have been carried out

the molecular mechanism is still not well understood [17] [18,19]. These studies are based mainly on the simulation of the structural properties of PrP^{Sc} like β -sheet content, PK-resistance or morphology of amyloid fibrils. However these systems have not generated infectious PrP or only very low titers of infectivity were generated spontaneously [14]. Recently, the group of S.B. Prusiner and colleagues could show that subtle variations in the structure of *in vitro* generated fibrils affect the infectivity (reported on Prion 2009 conference by D.W. Colby). In contrast to spontaneous fibrillization seed-dependent assays like protein misfolding cyclic amplification (PMCA) [20] and quaking-induced conversion (Quic) [21] were established and are in very good agreement with the infectious etiology of prion diseases. Both assays are carried out in cellular extracts from uninfected animals or cells, not knowing which cellular compounds are involved in the conversion reaction. Our group established a SDS-based conversion assay that works without cellular extracts, using solely purified compounds, like phosphate buffer, recPrP as substrate and prepurified PrP^{Sc} as seed [11]. PMCA and Quic were mainly developed for diagnostic purposes, our system with the well defined components was developed to describe quantitatively the prion propagation mechanism using hamster PrP. This SDS-based conversion assay was applied to additional species, in order to test if our conversion system can be used with other species and if the pre-amyloid state described in the hamster system is valid in general. Furthermore, by combining seed and substrate from different species we have the opportunity to simulate the phenomenon of species barriers for the first time on the level of a direct molecular interaction of prion seed and recPrP substrate without the influence of any other cellular component. In the presented study we were able to show that amyloid fibrils of recPrP can be formed within the SDS-based conversion system for all species investigated (cattle, sheep, mouse, hamster). Only the SDS concentration had to be adapted. These results and the properties of the intermediate state will be discussed on a more detailed level later. The phenomenon of species barrier for transmission was successfully modeled as seed dependent *in vitro* fibrillation. Five interspecies transmissions have been observed (fig. 3). Not very surprisingly, the amyloid formation of interspecies transmission seems to

be slower as compared to *intraspecies* transmission (fig. 2). Two interspecies transmissions were reported to have failed (SHaPrP^{Sc} to MuPrP and BovPrP^{Sc} to SHaPrP). Consequently, also a strict species barrier was found in the *in vitro* simulation (fig. 3). For murine substrate, only one positive transmission (MuPrP^{Sc} to MuPrP) and one negative (SHaPrP^{Sc} to MuPrP) could be performed for reasons of shortage of mouse prions in our lab. As a main result of our work it was found that the *in vitro* simulation of the species barrier is in complete agreement with the experimental data from *in vivo* transmission studies (Tab. 1). Similar results on interspecies transmission and species barrier were reported by studies with PMCA [22] and by Cashman and co-workers [23], whereby both systems use cellular extracts. Because our conversion system does not include cellular extracts we can conclude that the species barrier is encoded in the direct interaction of PrP^{Sc} and PrP^C [24]. Interspecies transmission as well as species barrier is well resembled in our system. Cellular factors might help, but only by enforcing the pre-existing interaction.

The interpretation of our results on the molecular level shows the importance of partial denaturation of recPrP as substrate described by Stohr *et al.* [11]. PrP in this intermediate or pre-amyloid state is soluble for weeks, suggesting that it is in a state of low free energy. Since it is present in a monomer-dimer-equilibrium one can argue that the partially denatured PrP is prone to intermolecular interactions possibly also with PrP^{Sc}. However in our conversion conditions PrP is in the state of lowest free energy if it is refolded for attachment to the fibrillar seed. We assume that this state is not present in measurable amounts in solution but only attached to the seed. The degree of denaturation in the intermediate state is critical; for different recPrP sequences, i.e. for different species, different SDS concentrations are needed. More than the optimal SDS concentration would lead to a more unfolded PrP^C whereas less SDS leads to a more refolded PrP^C state as compared to the optimal intermediate state. In both cases the conversion of PrP to fibrillar PrP would be too slow to be observable. For an interspecies transmission a partially unfolded state of the substrate PrP is required, but ΔG for substrate (PrP refolded in the complex) with the seed from the other species in the same way as for intraspecies

transmission has to be sufficiently low, i.e. lower than in the intermediate state, to guarantee the transition. In summary not the intermediate state of substrate PrP is critical for transition but its potency to refold into a conformation well adapted to the PrP^{Sc}-seed.

In future experiments we will extend our experimental approach to other species like human CJD and cervid CWD. Due to the high occurrence of CWD in Northern America, the combination of CWD-seed and human PrP as substrate would be of particular interest.

Material and Methods

Recombinat Prion Proteins

The recombinant prion protein (recPrP) was prepared and purified as described previously [25] [26]. The recPrP with the amino acid sequence of Syrian Hamster (90-231) (SHaPrP) PrP as well as recPrP with the amino acid sequence of cattle (25-241) (BovPrP) PrP was used in our studies before (Zitate). We adopted the purification protocols to full length recombinant ovine PrP (25-233) (OvPrP). Recombinant murine PrP (89-231) (MuPrP) was acquired from Allprion (Schlieren, Switzerland).

NaPTA precipitation of PrP^{Sc}

PrP^{Sc} from brain tissue of different species was purified by NaPTA (Sodium phosphotungstate dibasic hydrate) precipitation [27] [28] Additionally to Syrian hamster and bovine PrP^{Sc} (SHaPrP^{Sc} and BovPrP^{Sc}) [11,15] we adopt the purification protocol to ovine PrP^{Sc} (OvPrP^{Sc}) and to Murine PrP^{Sc} (MuPrP^{Sc}). The resulting pellet was resuspended in 10 mM NaPi by brief sonification (Sonificator, Labsonic U, Braun Dissel, Melsungen).

Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectra were recorded with a J-715 spectropolarimeter (Jasco, Easton, MD, USA) in a 0.1 cm quartz cuvette at room temperature. The scanning speed was 50 nm/min with resolution of 1 nm. For each sample 10 spectra were accumulated between 195 and 260 nm. The protein concentration was 150 ng/l. Background spectra of buffer samples were subtracted from the respective protein spectra.

Analytical Ultracentrifugation

Sedimentation-diffusion equilibrium experiments were performed, as described in ref [11], in a Beckman Optima XL-A analytical ultracentrifuge (Beckman Coulter) applying standard 12-mm

double-sector cells at 20°C. The data were analyzed by using the Global Fit procedure, which is implemented in the UltraScan II software package (Version 5.0 for UNIX) of B. Demeler (University of Texas Health Science Center, San Antonio, TX).

Electron microscopy, negative stain

A droplet of 5-10 µl containing the recPrP was placed on glow discharged grid and left to adsorb for 2 minutes. After adsorption to the grid surface the sample was washed briefly (50 µl of: 0.1 and 0.01 M NH₄ acetate) and stained with 2% ammoniummolybdate (50 µl). The samples were analyzed with a Zeiss EM910 microscope at 80 kV.

Thioflavin T-Assay

Fluorescence emission spectra of Thioflavin T (ThT) were measured at a concentration of 5 µM ThT and 10 ng/µl recPrP in 150 µl 10 mM NaPi pH 7.4. The emission spectra were recorded from 460 nm to 630 nm with a fixed excitation wavelength of 455 nm, average of λ_{em} 495 to 505 is shown for a time point. Fibrillization kinetics were followed in 96 well plates according to Stöhr *et al.* [11]. All measurements were performed in a Tecan sapphire plate reader (Tecan Group, Maennedorf, Switzerland). The chosen regression line is polynomial fitted to original data points.

Spontaneous and seeded amyloid formation of recPrP

Spontaneous and seeded amyloid fibril formation of recPrP of the different species was monitored by ThT-assay as described above. The buffer conditions especially the SDS-concentrations were adjusted according to the amyloid forming conditions of the spontaneous case for each species. The results are displayed as sum of the average fluorescence intensities of 495 to 505 nm in the saturation phase (24h to 48h in 30 min interval) of the curve. To determine the specificity of the seeding effect in interspecies transmission or interspecies barrier NaPTA-precipitated PrP^{Sc} from brain tissue of infected and non-infected animals was compared.

Acknowledgments:

This work was supported by grants of the EU (Network of Excellence "NeuroPrion", FOOD-CT-2004-506579) to D.R., E.B. and D.W., by the "Präsidentenfond der Helmholtzgemeinschaft" (HGF, "Virtual Institute of Structural Biology") to D.W., and the Food Standards Agency UK (M03R0005/004) to D.W., E.B., and D.R..

We would like to thank our collaborators for providing us brain tissue of prion infected as well as non-infected animals of different species: Stanley B. Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) provided hamster brain, Martin Groschup (Friedrich-Loeffler-Institut, Institute for Novel and Emerging Infectious Diseases, Greifswald/Insel Riems, Germany) provided cattle brain, Carsten Korth (University of Duesseldorf Medical School, Department Neuropathology, Germany) provided mouse brain, Olivier Andréoletti (UMR INRA-ENVT, Physiopathologie Infectieuse et Parasitaire des Ruminants, Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse, France) provided sheep brain.

We are thankful for the guidance and help in cloning and expression of recombinant PrP by Tommy Agyenim and Bernd Esters.

References

1. Watts JC, Balachandran A, Westaway D (2006) The expanding universe of prion diseases. *PLoS Pathog* 2: e26.
2. Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, et al. (1994) Structural clues to prion replication. *Science* 264: 530-531.
3. Eigen M (1996) Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys Chem* 63: A1-18.
4. Harper JD, Lansbury PT, Jr. (1997) Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* 66: 385-407.
5. Beringue V, Vilotte JL, Laude H (2008) Prion agent diversity and species barrier. *Vet Res* 39: 47.
6. Wells GA, Wilesmith JW, McGill IS (1991) Bovine spongiform encephalopathy: a neuropathological perspective. *Brain Pathol* 1: 69-78.
7. Konold T, Lee YH, Stack MJ, Horrocks C, Green RB, et al. (2006) Different prion disease phenotypes result from inoculation of cattle with two temporally separated sources of sheep scrapie from Great Britain. *BMC Vet Res* 2: 31.
8. Kimberlin RH, Walker CA (1978) Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J Gen Virol* 39: 487-496.
9. Laurent M (1997) Autocatalytic processes in cooperative mechanisms of prion diseases. *FEBS Lett* 407: 1-6.
10. Jarrett JT, Lansbury PT, Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73: 1055-1058.
11. Stohr J, Weinmann N, Wille H, Kaimann T, Nagel-Steger L, et al. (2008) Mechanisms of prion protein assembly into amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 2409-2414.
12. Vanik DL, Surewicz KA, Surewicz WK (2004) Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Mol Cell* 14: 139-145.
13. Colby DW, Zhang Q, Wang S, Groth D, Legname G, et al. (2007) Prion detection by an amyloid seeding assay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 20914-20919.
14. Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, et al. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science* 305: 673-676.
15. Panza G, Stohr J, Dumpitak C, Papanthassiou D, Weiss J, et al. (2008) Spontaneous and BSE-prion-seeded amyloid formation of full length recombinant bovine prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 373: 493-497.
16. Raymond GJ, Hope J, Kocisko DA, Priola SA, Raymond LD, et al. (1997) Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* 388: 285-288.
17. Leffers KW, Wille H, Stohr J, Junger E, Prusiner SB, et al. (2005) Assembly of natural and recombinant prion protein into fibrils. *Biol Chem* 386: 569-580.
18. Baskakov IV, Legname G, Baldwin MA, Prusiner SB, Cohen FE (2002) Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J Biol Chem* 277: 21140-21148.
19. Bocharova OV, Breydo L, Parfenov AS, Salnikov VV, Baskakov IV (2005) In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP(Sc). *J Mol Biol* 346: 645-659.
20. Saborio GP, Permanne B, Soto C (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411: 810-813.
21. Atarashi R, Moore RA, Sim VL, Hughson AG, Dorward DW, et al. (2007) Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat Methods* 4: 645-650.

22. Green KM, Castilla J, Seward TS, Napier DL, Jewell JE, et al. (2008) Accelerated high fidelity prion amplification within and across prion species barriers. *PLoS Pathog* 4: e1000139.
23. Li L, Coulthart MB, Balachandran A, Chakrabartty A, Cashman NR (2007) Species barriers for chronic wasting disease by in vitro conversion of prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 364: 796-800.
24. Geoghegan JC, Miller MB, Kwak AH, Harris BT, Supattapone S (2009) Trans-dominant inhibition of prion propagation in vitro is not mediated by an accessory cofactor. *PLoS Pathog* 5: e1000535.
25. Mehlhorn I, Groth D, Stockel J, Moffat B, Reilly D, et al. (1996) High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry* 35: 5528-5537.
26. Jansen K, Schafer O, Birkmann E, Post K, Serban H, et al. (2001) Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. *Biol Chem* 382: 683-691.
27. Birkmann E, Schafer O, Weinmann N, Dumpitak C, Beekes M, et al. (2006) Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion. *Biol Chem* 387: 95-102.
28. Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, et al. (1998) Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 4: 1157-1165.

Figures

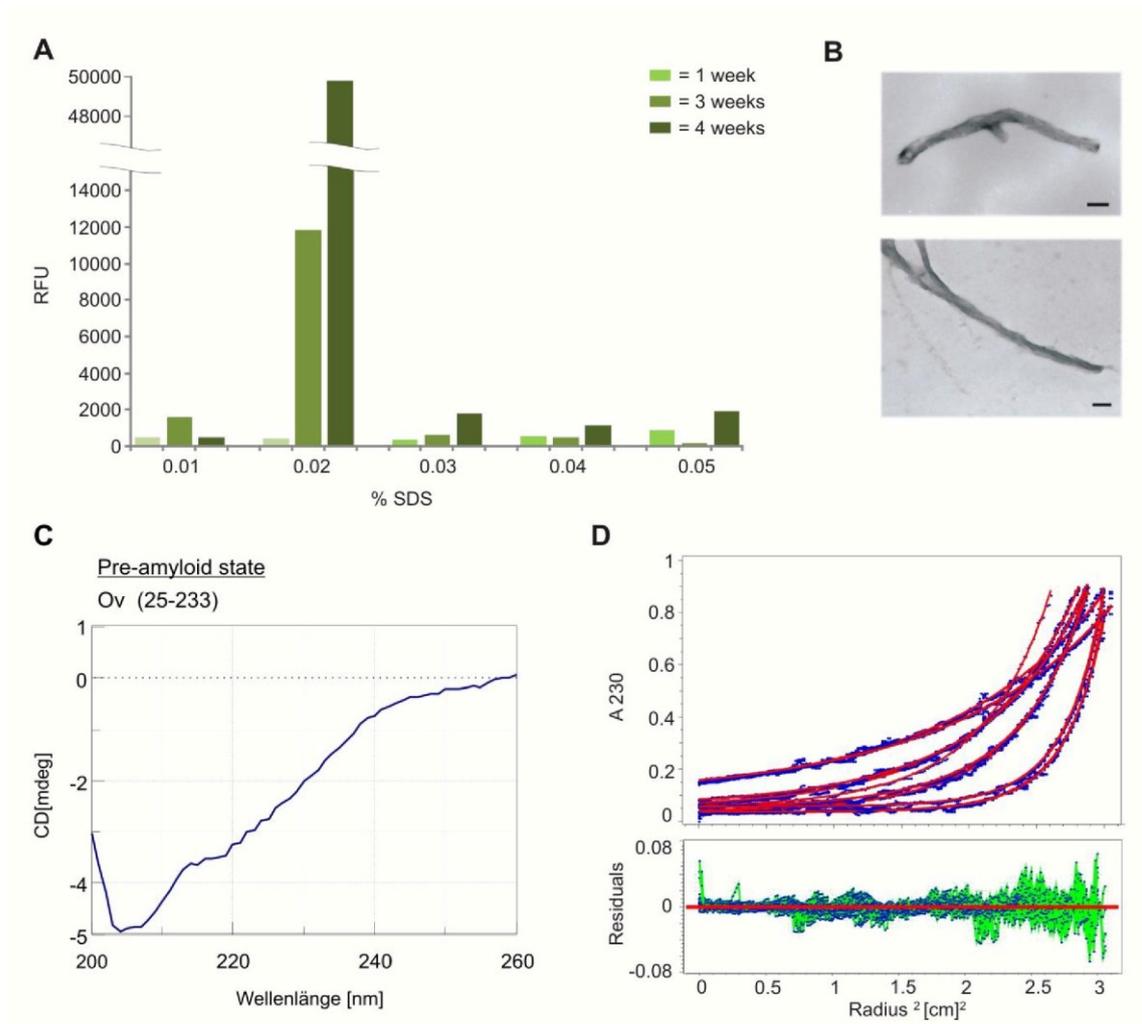


Figure 1: Characterization of spontaneous OvPrP fibril formation within the *in vitro* conversion system

A: Dependence of OvPrP amyloid formation on SDS-concentration. OvPrP was incubated in 10 mM NaPi pH 7.4, 250 mM NaCl and 0.01-0.05% SDS. The amount of fibril formation was measured by ThT-fluorescence. Thioflavin T was added to a final concentration of 5 μ M to 10 ng/ μ l OvPrP. **B:** Electron micrographs show the typical structure of amyloid fibrils after 7 days of incubation of OvPrP in 10 mM NaPi pH 7.4, 250 mM NaCl 0.02% SDS (bar = 20 nm). **C:** Secondary structure analysis of

the pre-amyloid state. CD-spectra were measured directly after adapting the SDS conditions, with a final concentration of 150 ng/μl OvPrP in 10 mMNaPi pH 7.4 and 250 mMNaCl. **D**: Sedimentation equilibrium centrifugation of OvPrP after 7 days of incubation. (*left*) Experimental data overlaid by the fitted curves (*right*) residuals.

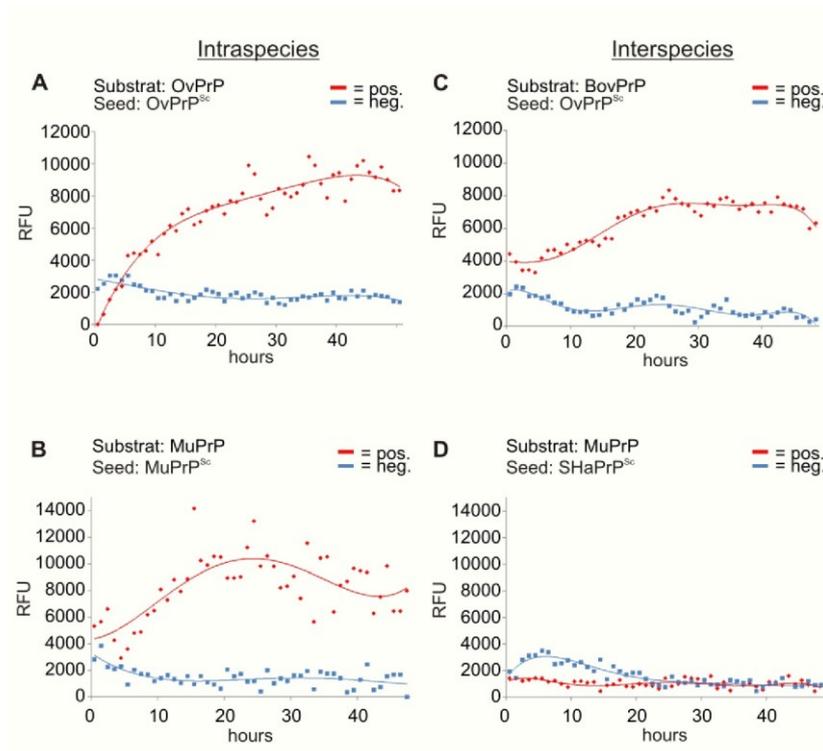


Figure 2: Kinetics of intra- and interspecies seeded recPrP amyloid formation

Amyloid formation of recPrP was monitored using ThT-fluorescence assay in 10 mM NaPi (pH 7.4) with 250 mM NaCl (at 37°C). *In vitro* intraspecies transmission: **(A)** Amyloid formation of 1.8 mM (40 ng/μl) OvPrP-substrate seeded with OvPrP^{Sc} in 0.02 % SDS (red line), **(B)** of 1.8 mM (30 ng/μl) MuPrP-substrate seeded with MuPrP^{Sc} in 0.04% SDS (red line). **C**: *In vitro* interspecies transmission: Amyloid formation of BovPrP-substrate seeded with OvPrP^{Sc} in 0.02% SDS (red line). *In vitro* interspecies barrier: In presence of SHaPrP^{Sc} no MuPrP amyloid formation occurs (red line). NaPTA-precipitate of corresponding same treated brain tissue from healthy animals: blue line

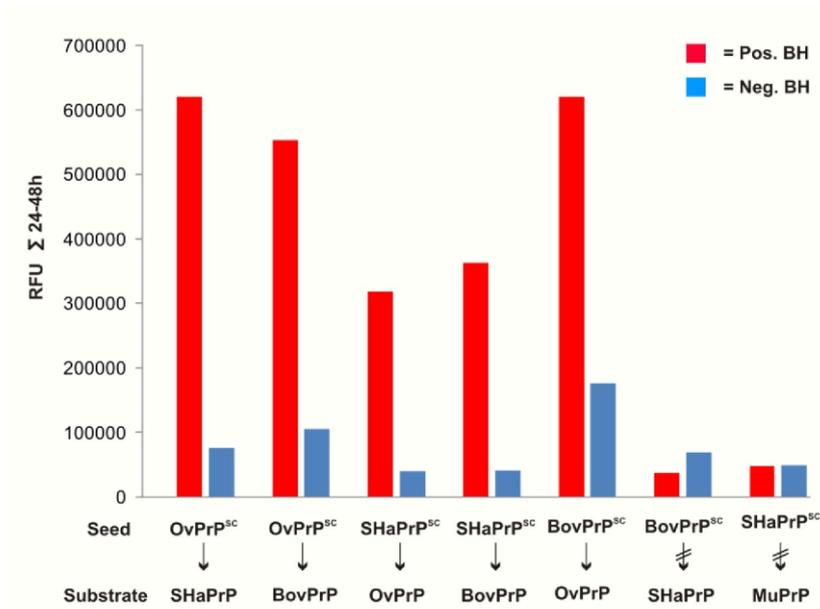


Figure 3: comparison of different interspecies recPrP seeding

Amyloid formation in the seeding assay was monitored using Thioflavin T. The fluorescence signals were recorded every 30 min at 37°C at recPrP amyloid forming conditions. Fluorescence intensities were summarized from 24-48 h (saturation phase). (Left to right) Interspecies transmission: OvPrP^{Sc} in SHaPrP; OvPrP^{Sc} in BovPrP; SHaPrP^{Sc} in OvPrP; SHaPrP^{Sc} in BovPrP; BovPrP^{Sc} in OvPrP. Interspecies barrier: BovPrP^{Sc} in SHaPrP; SHaPrP^{Sc} in MuPrP. As control parallel an approach was made with the corresponding intraspecies transmission (data not shown).

Table 1: *In vivo* vs. *In vitro* intraspecies and interspecies transmission and species barrier

A

	BovPrP	OvPrP	SHaPrP	MuPrP
BovPrP ^{Sc}	+	+	-	+
OvPrP ^{Sc}	+	+	+	+
SHaPrP ^{Sc}	(+)	(+)	+	-
MuPrP ^{Sc}	(+)	(+)	+	+

+ = Intraspecies transmission; + = Interspecies transmission; - = Interspecies barrier; (+) = transmission studies in transgenic mice.

B

	BovPrP	OvPrP	SHaPrP	MuPrP
BovPrP ^{Sc}	+	+	-	n.d.
OvPrP ^{Sc}	+	+	+	n.d.
SHaPrP ^{Sc}	+	+	+	-
MuPrP ^{Sc}	n.d.	n.d.	n.d.	+

+ = Intraspecies transmission; + = Interspecies transmission; - = Interspecies barrier; n.d. not determined

§ 4 Abs. 1

An der folgenden wissenschaftlichen Publikation hatte Giannantonio Panza folgenden Anteil:

Durchführung der Fibrillogense Studien und großer Anteil am Manuskript.

Veröffentlichung 4: Aggregation and Amyloid Fibril Formation of the Prion Protein is Accelerated in the Presence of Glycogen

Giannantonio Panza, Jan Stöhr, Eva Birkmann, Detlev Riesner, Dieter Willbold, Otto Baba, Tatsuo Terashima and Christian Dumpitak

Rejuvenation Research; vol. 11; no. 2; s. 365-369

Impact factor = 5,008

Aggregation and Amyloid Fibril Formation of the Prion Protein Is Accelerated in the Presence of Glycogen

Giannantonio Panza,¹ Jan Stöhr,¹ Eva Birkmann,^{1,3} Detlev Riesner,^{1,2} Dieter Willbold,¹⁻³ Otto Baba,⁴ Tatsuo Terashima,⁵ and Christian Dumpitak^{1,2}

ABSTRACT

Prion diseases like Creutzfeldt-Jakob disease in humans or scrapie in sheep and goats are infectious neurodegenerative diseases. Their infectious agent, called prion, is composed mainly of aggregated and misfolded prion protein and non-proteinaceous components. An example of such a common non-proteinaceous secondary component of natural prions is the polysaccharide scaffold. We studied the influence of such a polysaccharide on the conformational transition of PrP applying an *in vitro* conversion system. Here we report that glycogen supports and accelerates PrP amorphous aggregation similar to seeded aggregation and leads to co-aggregates. Furthermore, PrP fibril formation was highly accelerated in the presence of glycogen.

INTRODUCTION

PRIONS ARE INFECTIOUS AGENTS of fatal neurodegenerative diseases in mammals that can be either of sporadic, genetic, or infectious origin. Independent of the underlying etiology, prion diseases are always infectious. Prions are proteinaceous particles composed mainly of the host-encoded prion protein (PrP).

PrP exists in two isoforms: PrP^C (cellular) in the non-infected host and PrP^{Sc} (scrapie) as the main component of prions. Both isoforms are identical in amino acid sequence and post-translational modifications, but differ in their biophysical behavior (see reviews^{1,2}). PrP^C is soluble, monomeric, predominantly α -helical, and sensitive against proteinase K (PK) diges-

tion. PrP^{Sc} forms large, insoluble aggregates of predominantly β -sheet-rich secondary structure and is hydrolysed by PK to an N-terminally truncated form, the so-called PrP 27–30, which is still infectious. Studies on non-proteinaceous components of prions revealed that nucleic acids longer than 25 nt can be excluded as essential components of prions and that residual nucleic acids are not essential, neither for infectivity nor for prion strain determination.³ Furthermore, small amounts of specific host sphingolipids and cholesterol were reported in prions and interpreted as representative for the cellular environment during PrP conversion.⁴ Our group identified a polysaccharide scaffold composed solely of glucose as a common component of prions. Chemical and

¹Institut für Physikalische Biologie, ²Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Germany.

³Forschungszentrum Jülich, INB-2/Molekulare Biophysik II, Jülich, Germany.

⁴Biostructural Science, ⁵Maxillofacial Anatomy, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

mass spectrometrical analysis revealed that the prion polysaccharide predominantly consists of 1,4-linked, 1,6-linked, and 1,4,6-branched polyglucose, and accounts for about 10% (mass) in prions.^{5,6} This polyglucose scaffold in prions is clearly distinguishable from the two intrinsic N-glycosylations and the GPI anchor of PrP, since the latter polysaccharides do not contain glucose.^{7,8} The stereochemistry of the scaffold's glycosidic linkages was determined to be predominantly, if not entirely, α -glycosidic. This supports our hypothesis that the prion scaffold may originate from glycogen or from glycogen descending corpora amylacea.⁶

Recently, synthetic prions were generated *in vitro* by transformation of recombinant PrP into a fibrillary structure. However, titers of infectivity were orders of magnitude lower than those of natural prions.⁹ Applying a sodium-dodecylsulfate (SDS) based *in vitro* conversion system, we studied the influence of glycogen as a model of the prion scaffold on the conformational transition, amorphous aggregation, and fibrillization of PrP.

MATERIALS AND METHODS

In vitro SDS-conversion system

Recombinant Syrian hamster PrP comprising residues 29 to 231 (rec SHaPrP (29-231)) and residues 90 to 231 (rec SHaPrP (90-231)) was prepared according to Jansen *et al.*,¹⁰ and subjected to an SDS-dependent *in vitro* conversion assay, as reported previously.^{10,11} All experiments were performed in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) at 37°C with incubation times, PrP, SDS, and glycogen concentrations as indicated. Amyloidic fibril formation was induced by the addition of 250 mM NaCl.^{12,13}

Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectra were recorded (J-715, Jasco, Easton, MD) with a scanning speed of 50 nm/min and a step resolution of 1 nm. For each sample, 10 spectra were accumulated for the indicated wavelength range. Background spectra of blank samples were

subtracted from the respective protein spectra. For these experiments rec SHa PrP (29-231) was used in a concentration of 60 ng/ μ L.

Confocal laser scanning fluorescence microscopy

Confocal laser scanning fluorescence microscopy was performed with a TCS NT microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Detection of glycogen was realized utilizing a mouse monoclonal anti-glycogen antibody, prepared according to Baba *et al.*,^{14,15} as primary and Cy2-conjugated goat anti-mouse IgG (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) as secondary antibody. PrP detection was realized by labeling of rec SHaPrP (29-231) with Alexa-633 (Molecular Probes, Eugene, OR), according to the protocol described by Birkmann *et al.*¹⁶ 100 ng/ μ L of non-labeled SHa recPrP (29-231) was mixed with a small amount of labeled PrP and subjected to *in vitro* conversion.

Thioflavin T assay

Spectra were recorded from 460 to 600 nm with a fixed excitation wavelength of 455 nm. For evaluation, average intensity values from 495 to 505 nm were plotted over time. Measurements were performed in a Tecan sapphire plate reader (Tecan Group, Maennedorf, Switzerland). A solution of 80 ng/ μ L rec SHaPrP (90-231) was used.

RESULTS

Employing circular dichroism spectroscopy, we investigated whether glycogen has an effect on the secondary structure transition of rec SHaPrP (29-231) (Fig. 1). In the applied SDS-conversion system, PrP shows at 0.2% SDS an α -helix dominated secondary structure with a high amount of random coil proportion (Fig. 1A). After dilution to 0.05% and subsequently to 0.01% SDS, PrP undergoes conformational transition to a mainly α -helix followed by a β -sheet rich secondary structure, accompanied with decreasing solubility and increasing amorphous aggregation.^{10,11} After addition of glycogen to recombinant PrP in the presence of

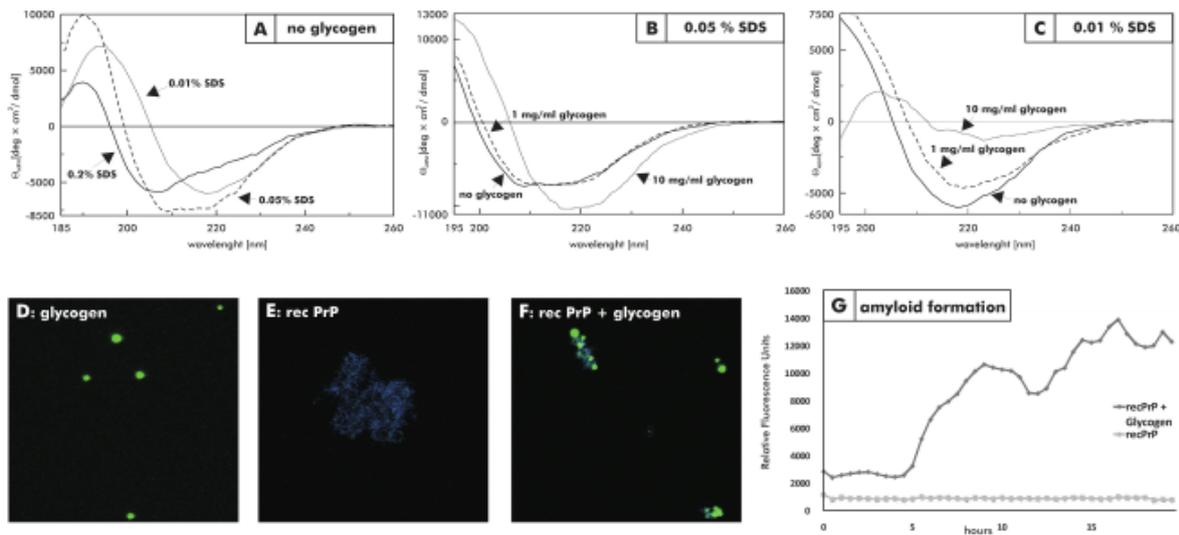


FIG. 1. (A–C) Circular dichroism spectra of rec SHaPrP (29–231). (A) At different SDS concentrations. (B and C) At different SDS concentrations in the presence of different concentrations of glycogen (measured 10 min after dilution). (D and E) Confocal laser scanning fluorescence microscopy 24 h after induction of amorphous aggregation. (D) Glycogen-labeled with mouse anti-glycogen-IgM and secondary Cy2-goat anti-mouse-IgG probe. (E) Fluorescence-labeled (Alexa-633) rec SHaPrP (29–231). (F) Labeled glycogen + labeled rec SHaPrP(29–231) (co-aggregates). (G) Thioflavin T fluorescence assay—80 ng/ μ L rec SHaPrP (90–231) are incubated in 10 mM NaPi, 250 mM NaCl, 0.03% SDS, and 5 μ M ThT at 37°C in a 96-well plate. Glycogen was added to a final concentration of 1 mg/mL.

0.05% SDS, the initially α -helix dominated secondary structure of PrP shifted to a β -sheet dominated form (Fig. 1B), which normally occurs only at lower SDS concentrations (Fig. 1A). At 0.01% SDS, the initial secondary structure of PrP is β -strand dominated (Fig. 1A). After the addition of glycogen, we observed a decreased CD signal suggesting precipitation of aggregated PrP (Fig. 1C). This was further substantiated by differential ultracentrifugation and fluorescence correlation spectroscopy (data not shown). Since the aggregation process in the presence of glycogen resembles a seeded form of aggregation, we examined if co-aggregation of PrP and glycogen occurs. Glycogen was detected after aggregate formation by confocal laser scanning fluorescence microscopy and an anti-glycogen antibody together with fluorescence-labeled secondary antibody. For PrP detection, fluorescence-labeled recPrP mixed with unlabeled recPrP was used for *in vitro* aggregation with and without glycogen. The results show glycogen (Fig. 1D) and aggregated PrP in the absence (Fig. 1E) and presence of glycogen (Fig. 1F). These findings clearly show

that, at 0.01% SDS, co-aggregation of glycogen and recPrP (Fig. 1F) occurs.

In the next step, we analyzed whether glycogen has an influence on the fibrillization of recPrP. The addition of sodium chloride to the *in vitro* SDS-conversion system leads to the formation of amyloid fibrils.^{12,13} In the presence of 250 mM NaCl, and at 0.03% SDS, we added 1 mg/mL glycogen to rec SHaPrP (90–231). Thioflavin T (ThT), a fluorescent dye whose fluorescence increases when binding to amyloid fibrils, was then used to observe the fibrillization process of PrP within a time-dependent assay. As shown in Figure 1G, the addition of glycogen shortened the lag time of PrP fibrillization from several weeks (data not shown) to a few hours. The increase of ThT fluorescence as was observable with glycogen did not occur in samples of recPrP without glycogen.

DISCUSSION

The chemical nature of the polyglucose scaffold found in natural prions highly resembles

glycogen.^{5,6} Furthermore, its origin might be connected to the development of corpora amyloidea, which are small spherical particles of polysaccharidic nature occurring age-associated in the brain (see review¹⁷). Hence, glycogen was chosen as a model substance for the polyglucose scaffold of prions. In our experiments, CD spectroscopy revealed that the presence of glycogen accelerates the structural transition of PrP from an α -helix-dominated to a β -sheet-rich secondary structure in the utilized SDS-dependent conversion system. Our results furthermore indicate that amorphous aggregation of PrP in the presence of glycogen resembles seeded aggregation of PrP. Furthermore, this aggregation process led to the formation of PrP/glycogen co-aggregates as observed by laser scanning fluorescence microscopy. These results substantiate the assumption that the polyglucose scaffold in prions might be the result of a specific interaction between PrP and the polysaccharide.

As discussed earlier,⁶ α -1,4-linked polyglucose chains can form so called V-helix structures, which have unique structural properties enabling interaction and or encapsulation of hydrophobic partners. From the presented results, it seems plausible that terminal polyglucose chains of glycogen interact with aggregation-prone PrP and thereby lead to a seeded-like co-aggregation. Since the formation of infectious PrP aggregates seems to depend on the formation of PrP fibrils,⁹ we also investigated whether glycogen has an influence on this form of aggregation. Our results from ThT-time dependent assay studies point to a drastic acceleration of PrP fibril formation in the presence of glycogen. In summary, our results indicate a relevance of PrP/glycogen interaction *in vivo*, for example, the rise of spontaneous PrP aggregates.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Dr. Stanley B. Prusiner, Dr. Holger Wille, and Hana Serban (UCSF, San Francisco, CA) for their kind gifts of recombinant prion proteins and to Dr. Olaf Bossinger for kindly assisting with confocal laser scanning microscopy. This work was sup-

ported by the EU-Network of Excellence "NeuroPrion" (FOOD-CT-2004-506579) (D.R., C.D.), Deutsche Forschungsgemeinschaft (D.R.); and by a grant from the "Präsidentenfond der Helmholtzgemeinschaft" (HGF, Virtual Institute of Structural Biology) (D.W.).

REFERENCES

1. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:13363.
2. Riesner D. Transmissible spongiform encephalopathies: the prion theory—background and basic information. *Contrib Microbiol* 2004;11:1.
3. Safar JG, Kellings K, Serban A, Groth D, Cleaver JE, Prusiner SB, Riesner D. Search for a prion-specific nucleic acid. *J Virol* 2005;79:10796.
4. Klein TR, Kirsch D, Kaufmann R, Riesner D. Prion rods contain small amounts of two host sphingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biol Chem* 1998;379:655.
5. Appel TR, Dumpitak C, Matthiesen U, Riesner D. Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. *Biol Chem* 1999;380:1295.
6. Dumpitak C, Beekes M, Weinmann N, Metzger S, Winklhofer KF, Tatzelt J, Riesner D. The polysaccharide scaffold of PrP 27-30 is a common compound of natural prions and consists of alpha-linked polyglucose. *Biol Chem* 2005;386:1149.
7. Endo T, Groth D, Prusiner SB, Kobata A. Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 1989;28:8380.
8. Rudd PM, Endo T, Colominas C, Groth D, Wheeler SF, Harvey DJ, Wormald MR, Serban H, Prusiner SB, Kobata A, Dwek RA. Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:13044.
9. Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, Dearmond SJ, Prusiner SB. Synthetic mammalian prions. *Science* 2004;305:673.
10. Jansen K, Schafer O, Birkmann E, Post K, Serban H, Prusiner SB, Riesner D. Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. *Biol Chem* 2001;382:683.
11. Post K, Pitschke M, Schafer O, Wille H, Appel TR, Kirsch D, Mehlhorn I, Serban H, Prusiner SB, Riesner D. Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. *Biol Chem* 1998;379:1307.
12. Leffers KW, Wille H, Stohr J, Junger E, Prusiner SB, Riesner D. Assembly of natural and recombinant prion protein into fibrils. *Biol Chem* 2005;386:569.
13. Stohr J, Weinmann N, Wille H, Kaimann T, Nagel-Steger L, Birkmann E, Panza G, Prusiner SB, Eigen M, Riesner D. Mechanisms of prion protein assembly into amyloid. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:2409.
14. Baba O. Production of monoclonal antibody that recognizes glycogen and its application for im-

ACCELERATED PRION PROTEIN AGGREGATION

369

- munohistochemistry. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 1993; 60:264–287.
15. Garcia-Rocha M, Roca A, De L, Baba O, Fernandez-Novell JM, Ferrer JC, Guinovart JJ. Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 2001;357:17.
 16. Birkmann E, Schafer O, Weinmann N, Dumpitak C, Beekes M, Jackman R, Thorne L, Riesner D. Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion. *Biol Chem* 2006;387:95.
 17. Cavanagh JB. Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res Rev* 1999;29:265.

Address reprint requests to:
Christian Dumpitak
Institut für Physikalische Biologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
D-40225 Düsseldorf
Germany

E-mail: Dumpitak@biophys.uni-
duesseldorf.de

§ 4 Abs. 1

An der folgenden wissenschaftlichen Publikation hatte Giannantonio Panza folgenden Anteil:

Durchführung der Experimente zur *in vitro* AGE-modifikationen (Nachweis mittels Fluoreszenz), Aggregationsstudien und maßgeblicher Anteil am Manuskript.

Veröffentlichung 5: Influence of the Maillard reaction to prion protein misfolding and aggregation

Giannantonio Panza, Christian Dumpitak and Eva Birkmann

Rejuvenation Research ID: REJ-2009-0954 (Manuscript accepted)

Impact factor = 5,008

Rejuvenation Research

Rejuvenation Research

Rejuvenation Research: <http://mc.manuscriptcentral.com/rejuvenationresearch>

Influence of the Maillard reaction to prion protein aggregation

Journal:	<i>Rejuvenation Research</i>
Manuscript ID:	REJ-2009-0954
Manuscript Type:	Meeting Reports
Date Submitted by the Author:	30-Sep-2009
Complete List of Authors:	Panza, Giannantonio; Heinrich-Heine-Universitaet Duesseldorf, Institut fuer physikalische Biologie Dumpitak, Christian; Heinrich-Heine-Universitaet Duesseldorf, NRW Research School BioStruct Birkmann, Eva; Heinrich-Heine-Universitaet Duesseldorf, Institut fuer physikalische Biologie
Keyword:	Glycation, Protein Damage, Disease, Molecular Aggregation, Neurodegeneration



Mary Ann Liebert, Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

Influence of the Maillard reaction to prion protein aggregation

Giannantonio Panza^{1*}, Christian Dumpitak^{1,2*} and Eva Birkmann^{1,3}

*These two authors contributed equally

¹ *Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, D-40225 Düsseldorf, Germany*

² *NRW Research School BioStruct, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, D-40225 Düsseldorf, Germany*

³ *Forschungszentrum Juelich, Institut für Strukturbiologie und Biophysik (ISB-3), D-52425 Juelich, Germany*

Address for correspondence and reprints:

Eva Birkmann

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,

Universitätsstr. 1, D-40225 Düsseldorf, Germany

Birkmann@uni-duesseldorf.de, Tel: +49211/8112342, Fax: +49211/8115167

Word count: 1373, abstract 94

Keywords: prion protein, advanced glycation, AGEs, amyloid, maillard reaction, protein aggregation

Abbreviated title: Advanced glycation of prion protein

Abstract:

Prion diseases are fatal neurodegenerative diseases which occur either spontaneously, genetically or caused by infection. Spontaneously occurring prion diseases are age-related. The infectious agents, called prions, are proteinaceous infectious particles, composed mainly of the host encoded prion protein (PrP) in a misfolded, insoluble and aggregated isoform. Advanced glycation endproducts (AGEs) are well known to contribute to protein misfolding, insolubility and aggregation. Hence we studied if AGE-modification could influence PrP-aggregation. Therefore we analyzed PrP preparations immunochemically whether they contain AGE-modified PrP. Furthermore we studied the influence of AGE-modifications on the PrP aggregation process *in vitro*.

Introduction:

Prion diseases like Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) are neurodegenerative diseases. CJD can be of genetically origin, occur spontaneously or caused by infection. The infectious agent, called prion is a proteinaceous particle composed mainly of a misfolded isoform of the host-encoded prion protein [1]. Only small amounts of non-proteinaceous components of prions have been described previously e.g. a glucose-only polysaccharid scaffold with high similarity to glycogen [2] [3]. Prions show high resistance against proteinaceous digestion, thermic degradation and common disinfection procedures. In comparison to its cellular non-infectious isoform (PrP^C) the main component of prions - PrP^{Sc} - is rich in β -sheet secondary structure and forms aggregates which are cytotoxic. PrP^{Sc}-aggregates can be degraded by Proteinase K leading to a N-terminally truncated but still highly infective form of prions, called PrP 27-30 [4]. Spontaneous CJD occurs age-related.

Advanced glycation of proteins is a non-enzymatic reaction cascade between reducing sugars and reactive amino groups of proteins. This reaction - also called Maillard reaction - occurs *in vivo* in an age-related manner. The Maillard reaction leads to several modification in proteins like adducts or crosslinks, called advanced glycation endproducts (AGEs) [5]. AGEs accumulate in long existing proteins within the lifespan of an organism. Furthermore they are suspected to play an important role in several neurodegenerative diseases like Alzheimer's or Parkinsons's disease [6] [7]. On the molecular level AGE-modifications were shown to induce protein insolubility, higher resistance against proteolytic digestion, cytotoxicity [5] [8] [9] and have recently been demonstrated to induce formation of amyloid fibrils [10].

We have investigated whether the formation of AGEs could contribute to the misfolding and aggregation of the prion protein. In a first step we analyzed if infectious prions or non-infectious PrP^C preparations contain AGE-modifications. Additionally we applied a method to induce formation of AGEs *in vitro* to PrP and examined if AGE-modification have an effect on PrP amyloid formation.

Material and Methods

Prion protein preparations

Infective PrP²⁷⁻³⁰ was prepared from infected Syrian hamster brains according to [11]. PrP^C from healthy Syrian hamster brains was prepared according to [12]. CHO-PrP^C was prepared from Chinese hamster ovary cell lines as described in [13]. Recombinant Syrian hamster PrP comprising the full-length - recPrP(29-231) and N-terminally truncated recPrP(90-231) were prepared as described in [13].

In vitro SDS-conversion system

RecPrP was subjected to a sodium dodecyl sulfate (SDS) dependent *in vitro* conversion assay, as reported previously [14]. All experiments were performed in 10 mM NaP_i, 250 mM NaCl, 0.01% SDS pH 7.2 (conversion buffer) at 37 °C. RecPrP concentration concentrations are indicated in results.

In vitro generated AGE modification

AGE-modifications were achieved according to [15] by incubating 125 ng/μl PrP in 1 mM glyoxal, 1 mM methylglyoxal and 200 mM NaP_i for two days at 45°C. Samples were directly analyzed for AGE-specific autofluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 370$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 440$ nm). Additionally AGE-fluorescence was measured with the fluorescence parameters: $\lambda_{\text{ex}} = 445$ nm, $\lambda_{\text{ex}} = 460$ -650 nm in a Tecan saphire plate reader (Tecan Group, Maennedorf, Switzerland).

Immunodetection of PrP and AGE-modified PrP

After boiling in loading buffer, samples were applied to a dot blot and immunostained utilizing either PrP-specific antibodies (pAb A4 [16] or 3F4 [17]) or AGE-specific antibodies (PEN-12 = anti-Pentodisin and H12 = anti-Pyrralin, GERBU Biotechnik GmbH, Gaiberg,

1
2
3 Germany; 4G9 = anti-CML [18]). Immunostaining of blotted samples was performed
4
5 according to [2]. Rotiblock (Roth, Karlsruhe, Germany) was used as blocking reagent.
6
7

8
9 To examine solubility of recPrP after incubation in conversion buffer, samples were
10
11 centrifuged at 100.000 g for 1 h. Supernatant (s) and pellet (p) fractions were applied to a dot
12
13 blot and immunostained using PrP-specific (pAb A4).
14
15
16

17 18 *Thioflavin T-Assay*

19
20 ThioflavinT-assays using 8 ng/ μ l recPrP(29-231) were carried out as described in [19].
21
22

23 Spectra were recorded from 460 nm to 650 nm with fixed λ_{ex} of 455 nm.
24
25

26 27 *PAGE and silver staining*

28
29 SDS/PAGE (12%) and silver staining were carried out as described in [20]
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

To investigate if preparations of PrP contain AGE-modified PrP we utilized AGE-specific antibodies for immunochemical detection. We analysed four preparations of non-infective PrP: recPrP(29-231) and recPrP(90-231) both lacking posttranslational modifications, CHO-PrP^C, and natural PrP^C prepared from healthy hamster brain, both containing the posttranslational modifications: glycosylations and GPI-anchor. These PrP preparations were compared to highly infectious PrP²⁷⁻³⁰ prepared from brain tissue of hamster afflicted with Scrapie (Fig. 1A). *In vitro* AGE-modified bovine serum albumine and keyhole limpet hemocyanin were used as AGE-positive controls. The upper blot of Fig. 1 A shows PrP-positive signalling as derived by anti-PrP antibody 3F4. As expected both non-PrP controls (F/G) did not show any signal, whereas all PrP containing samples (A-E) showed PrP-specific signals. AGE-positive signals were derived by three different anti-AGE antibodies: N-carboxymethyllysine (CML) was detected by 4G9, pentosidine by PEN-12, and pyrrolin by H-12. CML-signalling was observed in all samples of different strength. The lowest CML-signalling was detected in PrP²⁷⁻³⁰. Pentosidine and pyrrolin were detectable mainly in recPrP(90-231) samples. All results were reproduced by silver stained polyacrylamid gelelectrophoresis followed by Westernblot analysis, proving that AGE- and PrP-positive signaling occurred in the same bands (data not shown).

To analyze if AGE-modification of PrP has an effect towards its aggregation characteristics we adopted a method for *in vitro* AGE-modification [15] and applied it to recPrP(29-231). *In vitro* modification of AGE-PrP, was verified by silver stained polyacrylamid gel electrophoresis. The increase in molecular weight caused by *in vitro* AGE-modification of PrP could clearly be shown. Additionally the *in vitro* AGE-modification of PrP was also

1
2
3 confirmed by AGE-specific autofluorescence (data not shown). AGE-modification could even
4
5 be observed by fluorescence of $\lambda_{\text{ex}} = 445 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{ex}} = 460\text{-}650 \text{ nm}$ (fig 1C).
6
7

8
9 The influence of AGE-modification to PrP aggregation was studied applying a PrP-
10 aggregation assay [14]. Within this assay incubation of PrP under balanced SDS and NaCl
11 conditions lead to formation of amyloid PrP-fibrils. AGE-PrP and untreated PrP were
12 incubated for five weeks under amyloid formation conditions. After five weeks unmodified
13 PrP displayed an amyloid-specific increase in ThT-fluorescence, in contrast AGE-PrP showed
14 no increase in ThT-fluorescence (fig 1D). Additionally the solubility of PrP was studied
15 during the early incubation period after 48 hours and after one week. The soluble and
16 insoluble fractions were analyzed utilizing PrP-specific antibody (pAbA4). Untreated PrP
17 displayed higher insolubility than AGE-PrP (Fig 1 E). However under conditions leading to
18 amorphous aggregates formation of larger insoluble aggregates were observed with AGE-
19 modified recPrP (data not shown).
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

AGEs are suspected to play an important role in several neurodegenerative diseases [6] [7]. They can induce protein aggregation and cytotoxicity [8]. With respect to prion diseases we analyzed prions and preparations of non-infective cellular PrP according to their PrP-AGE content (fig. 1A). All analyzed PrP preparations were immunopositive for AGEs. Recombinant PrP preparations presented the strongest AGE-positive signals. Therefore AGEs should be considered when utilizing recombinant PrP, especially if cytotoxicity of *in vitro* generated PrP aggregates should be tested. Infectious PrP²⁷⁻³⁰ exhibited the lowest AGE-positive signals. One could expect that prion aggregates contain a higher AGE-amount due to their long molecular lifespan compared to the fast-turned over cellular PrP. Therefore the different distribution of AGEs in PrP²⁷⁻³⁰ and PrP^C might represent a different history of exposition to carbonyl stress during the individual biology of the molecules. If a low AGE-content in PrP²⁷⁻³⁰ can give hints that the conversion takes place early after PrP expression and is followed by protection against further AGE-modification within prion aggregates has to be established in the future.

We observed that *in vitro* AGE-modification of PrP led to an inhibition of PrP fibril formation. Others reported that the Maillard reaction utilizing glucose as reducing sugar strongly decreased the infectivity of prions [21]. Combined, these results lead to the conclusion that the Maillard reaction could play a preventive role either in the phase of pathological prion protein aggregation as well as after the formation of infective prions.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Acknowledgements

The authors are indebted to Stanley B. Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) for kind gifts of prion materials, to Roche Diagnostics GmbH, Penzberg for kind gifts of 4G9 antibody and KLH-AGE and to Jörg Tatzelt (LMU, Munich, Germany) for kind gifts of A4-Antibody. The stimulating discussions with Dr. Rosemarie Kientsch-Engel, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg are highly acknowledged.

This work was supported by the EU-Network of Excellence "NeuroPrion" (FOOD-CT-2004-506579) .

Author disclosure statement:

No competing financial interests exist.

References

1. Prusiner, S.B., *Prions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13363-83.
2. Appel, T.R., C. Dumpitak, U. Matthiesen, and D. Riesner, *Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold*. Biol Chem, 1999. **380**(11): p. 1295-306.
3. Dumpitak, C., M. Beekes, N. Weinmann, S. Metzger, K.F. Winklhofer, J. Tatzelt, and D. Riesner, *The polysaccharide scaffold of PrP 27-30 is a common compound of natural prions and consists of alpha-linked polyglucose*. Biol Chem, 2005. **386**(11): p. 1149-55.
4. Riesner, D., *Transmissible spongiform encephalopathies: the prion theory--background and basic information*. Contrib Microbiol, 2004. **11**: p. 1-13.
5. Kikuchi, S., K. Shinpo, M. Takeuchi, S. Yamagishi, Z. Makita, N. Sasaki, and K. Tashiro, *Glycation--a sweet tempter for neuronal death*. Brain Res Brain Res Rev, 2003. **41**(2-3): p. 306-23.
6. Munch, G., W. Deuther-Conrad, and J. Gasic-Milenkovic, *Glycoxidative stress creates a vicious cycle of neurodegeneration in Alzheimer's disease--a target for neuroprotective treatment strategies?* J Neural Transm Suppl, 2002(62): p. 303-7.
7. Castellani, R., M.A. Smith, P.L. Richey, and G. Perry, *Glycoxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease*. Brain Res, 1996. **737**(1-2): p. 195-200.
8. Gafni, A., *Structural modifications of proteins during aging*. J Am Geriatr Soc, 1997. **45**(7): p. 871-80.
9. Harrington, C.R. and C.A. Colaco, *Alzheimer's disease. A glycation connection*. Nature, 1994. **370**(6487): p. 247-8.
10. Bouma, B., L.M. Kroon-Batenburg, Y.P. Wu, B. Brunjes, G. Posthuma, O. Kranenburg, P.G. de Groot, E.E. Voest, and M.F. Gebbink, *Glycation induces formation of amyloid cross-beta structure in albumin*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41810-9.
11. Prusiner, S.B., M.P. McKinley, K.A. Bowman, D.C. Bolton, P.E. Bendheim, D.F. Groth, and G.G. Glenner, *Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods*. Cell, 1983. **35**(2 Pt 1): p. 349-58.
12. Pan, K.M., N. Stahl, and S.B. Prusiner, *Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain*. Protein Sci, 1992. **1**(10): p. 1343-52.

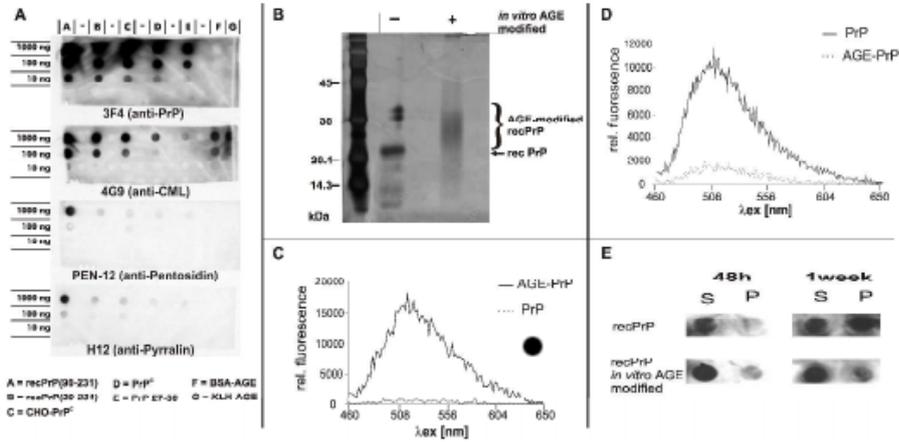
- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
13. Elfrink, K., L. Nagel-Steger, and D. Riesner, *Interaction of the cellular prion protein with raft-like lipid membranes*. Biol Chem, 2007. **388**(1): p. 79-89.
 14. Stohr, J., N. Weinmann, H. Wille, T. Kaimann, L. Nagel-Steger, E. Birkmann, G. Panza, S.B. Prusiner, M. Eigen, and D. Riesner, *Mechanisms of prion protein assembly into amyloid*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(7): p. 2409-14.
 15. Thornalley, P.J., Yurek-George, A. & Argirov, O. K., *Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the α -oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal and 3-Deoxyglucosone under physiological conditions*. Biochem. Pharmacol., 2000. **60**: p. 55-65.
 16. Winklhofer, K.F. and J. Tatzelt, *Cationic lipopolyamines induce degradation of PrP^{Sc} in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells*. Biol Chem, 2000. **381**(5-6): p. 463-9.
 17. Kascsak, R.J., R. Rubenstein, P.A. Merz, M. Tonna-DeMasi, R. Fersko, R.I. Carp, H.M. Wisniewski, and H. Diringer, *Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins*. J Virol, 1987. **61**(12): p. 3688-93.
 18. Mellinshoff, A.C., A.J. Reininger, J.P. Wuerth, H.W. Founds, R. Landgraf, and K.D. Hepp, *Formation of plasma advanced glycosylation end products (AGEs) has no influence on plasma viscosity*. Diabet Med, 1997. **14**(10): p. 832-6.
 19. Panza, G., J. Stohr, C. Dumpitak, D. Papathanassiou, J. Weiss, D. Riesner, D. Willbold, and E. Birkmann, *Spontaneous and BSE-prion-seeded amyloid formation of full length recombinant bovine prion protein*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **373**(4): p. 493-7.
 20. Birkmann, E., O. Schafer, N. Weinmann, C. Dumpitak, M. Beekes, R. Jackman, L. Thorne, and D. Riesner, *Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion*. Biol Chem, 2006. **387**(1): p. 95-102.
 21. Suyama, K., M. Yoshioka, M. Akagawa, Y. Murayama, H. Horii, M. Takata, T. Yokoyama, and S. Mohri, *Prion inactivation by the Maillard reaction*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **356**(1): p. 245-8.

Figure legend**Figure 1**

(A) **Detection of AGE-modifications in different PrP preparations** with specific anti-AGE-antibodies against CML, Pentosidin and Pyrralin AGEs. As control PrP was detected with anti-PrP antibody (3F4). (B) **Analysis of *in vitro* introduced AGE-modifications:** Silver stained PAGE with recPrP(29-231) after *in vitro* AGE-modification (+) and untreated recPrP(29-231) (-) as control. The molecular weight of AGE-treated recPrP(29-231) shifted to higher molecular weight compared to untreated PrP. (C) Fluorescence spectra of *in vitro* AGE-modified recPrP(29-231) (solid line) compared to non-modified recPrP(29-231) (dotted line). (D) **Analysis of the amyloid character** of *in vitro* AGE-modified recPrP(29-231) (solid line) compared to non-modified recPrP(29-231) (dotted line) after 6 weeks of incubation in conversion buffer. (E) **Analysis of solubility** of recPrP(29-231) and *in vitro* AGE-modified recPrP(29-231) after 48 hour and two weeks of incubation in conversion buffer. Samples were centrifuged at 100.000 g for 1h. Supernatant (S) and pellet (P) were applied to a dot blot and immunostained using anti-PrP mAb A4.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1



199x106mm (600 x 600 DPI)

8 Anhang: Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien wurden bei Herstellern für Laborchemikalien bezogen und entsprechen, wenn nicht anders angegeben, dem Reinheitsgrad „pro analysi“. Zum Ansetzen von Lösungen wurde hochreines „Milli-Q-Wasser“, im Folgenden als H₂O_{deion.} bezeichnet, verwendet. Dieses wurde von der Hausanlage mit nachgeschaltetem Wasseraufarbeitungssystem (EPA Est. 41237- MA-1; Millipore GmbH, Neu Isenburg) gefiltert. Alle angesetzten Lösungen wurden durch 0,2 µm bzw. 0,45 µm oder für die elektronenmikroskopisch genutzten Lösungen 0,1 µm Membranfilter (Schleicher und Schuell, Dassel) steril filtriert.

8.1 Verwendete Puffer

Puffer 1: Lösungen für <i>E. coli</i> Expression	8-7
Puffer 2: Lösungen für SEC-Chromatographie.....	8-7
Puffer 3: Lyophilisat Aufarbeitungs-Puffer	8-7
Puffer 4: Micro BCA-Test Lösungen.....	8-9
Puffer 5: Mercaptoethanol-Auftragspuffer	8-10
Puffer 6: TBST-Puffer.....	8-11
Puffer 7: Gelelektrophorese	8-12
Puffer 8: SDS-Laemmli-Gelelektrophoresepuffer	8-12
Puffer 9: Proteinstandard.....	8-13
Puffer 10: Lösungen für Elektronenmikroskopie.....	8-19

8.2 Prion-Proteine

Das in dieser Arbeit verwendete Prion-Protein ist, wenn nicht anders deklariert, in unserer Arbeitsgruppe, in *E.coli* exprimiert und wie unter 1.2.1 beschreiben aufgereinigt worden. Folgende rekombinante Prion-Proteine (rekPrP) wurden in dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 4: Prion-Protein-Sequenzen mit verwendeten Abkürzungen

Rekombinantes Prion-Protein	Abkürzung
rek Syrian Hamster PrP (90-231)	SHaPrP
rek Bovines PrP (25-241)	BovPrP
rek Ovines PrP (25-233)	OvPrP
rek Murines PrP (89-231) (erworben bei Allprion, CH-8952 Schlieren)	MuPrP

8.2.1 Expression und Aufreinigung verschiedener rekombinanter Prion-Proteine

Für die Expression von rekombinanten Prion-Proteinen wurde der *Escherichia Coli* Stamm Rosetta BL21 verwendet, der das Prion-Protein der gewünschten Sequenz exprimiert. Die entsprechende Prion-Proteinsequenz wurde in das Plasmid pET 11a kloniert und in *E.coli* transformiert. Das Plasmid erhält eine Ampicillin Resistenz zur selektiven Aufzucht in einem Ampicillinhaltigen LB-Medium. Da die Expression des Prion-Proteins unter der Kontrolle eines Lac-Operons steht, kann sie mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert werden.

Eine Vorkultur der *E.-coli* Zellen, wurde bei 37°C in 50 ml LB-Medium über Nacht inkubiert. Mit der Vorkultur wurde die Hauptkultur (1l LB-Medium) angeimpft und weiterhin bei 37°C inkubiert. Es wurden im Abstand von einer Stunde Absorptionsmessungen durchgeführt bis die *E. coli* Zellen eine optische Dichte von 0,6-0,8 bei einer Absorption von 600 nm erreichten. Die

Expression wurde mit 5 ml IPTG-Stammlösung pro 500 ml induziert (1 mM Endkonzentration), und abermals ü.N. bei 30°C inkubiert. Das exprimierte rekPrP befindet sich in inclusion bodies innerhalb der *E. coli* Zellen. Die Präparation der inclusion bodies erfolgte nach einem veränderten Protokoll von Hornemann (Hornemann *et al.*, 1997). Zuerst erfolgte eine Trennung der Zellen vom Medium durch Zentrifugation bei 3500 rpm (Untertischzentrifuge, Beckmann). Die pelletierten Zellen wurden mit 25 ml TE-Puffer und 100 µg/ml Lysozym für 15 Min. bei 37 °C lysiert und anschließend mit 10 µg/ml DNase 1 (Sigma) und 15 mM MgCl₂ für 30 min inkubiert um DNA zu degradieren. Die frei in Lösung befindlichen inclusion bodies wurden bei 4°C und 14.500 rpm 1 h in der präperativen Ultrazentrifuge (Beckmann J2-21) mit dem JA-14 Rotor abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Resuspendieren erfolgte in 25 mM TE-Puffer. Durch anschließende Zentrifugation bei 30.000 x g (Beckmann, JA-14-Rotor) für 60 min. lag das rekPrP nun wieder als Pellet vor. Dieser Waschschrift kann mehrmals wiederholt werden. Zur Auflösung der inclusion bodies wurden sowohl reduzierende als auch denaturierende Bedingungen eingestellt. Das geschieht mit einer Kombination aus 8 M Guanidinium Hydrochlorid (GdnHCl) und dem Reduktionsmittel Dithiothreitol (100 mM). Somit kann nach dieser Solubilisierung und einer weiteren Zentrifugation bei 30.000 x g (Beckmann, JA-14-Rotor) für 30 min gewährleistet werden, dass die gelösten Proteine im Überstand als Monomere vorlagen. Des Weiteren kann so sichergestellt werden, dass keine intra- und intermolekularen Disulfidbrücken vorliegen (Lagerung bei -70°C möglich).

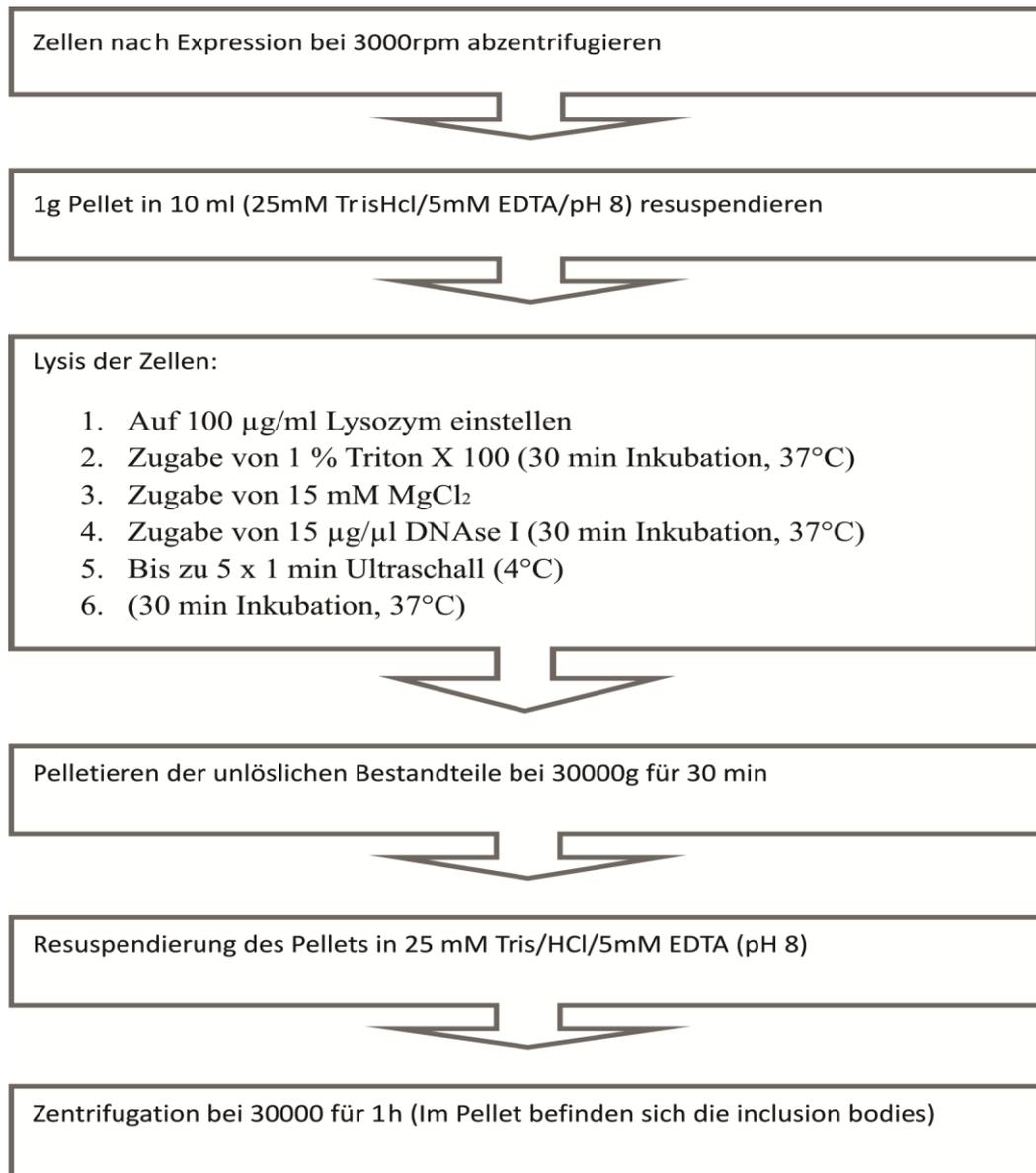


Abbildung 8.1: Fließdiagramm *E. coli* Präparation

Die weitere Aufreinigung erfolgte über chromatographische Schritte. Als erstes werden die Proteine mittels einer Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography; SEC) nach Molekülgröße getrennt. Die dafür verwendete SEC-Säule (Amersham Bioscience, XK26/60 „Prep-Grade“; Säulenmaterial Superdex 200) wurde an eine FPLC (fast performance liquid chromatography) angeschlossen (Amersham Bioscience, „Äkta-Prime“) und für die Proteinauftrennung bei einer Flussrate von ca. 2,2 ml/min betrieben.

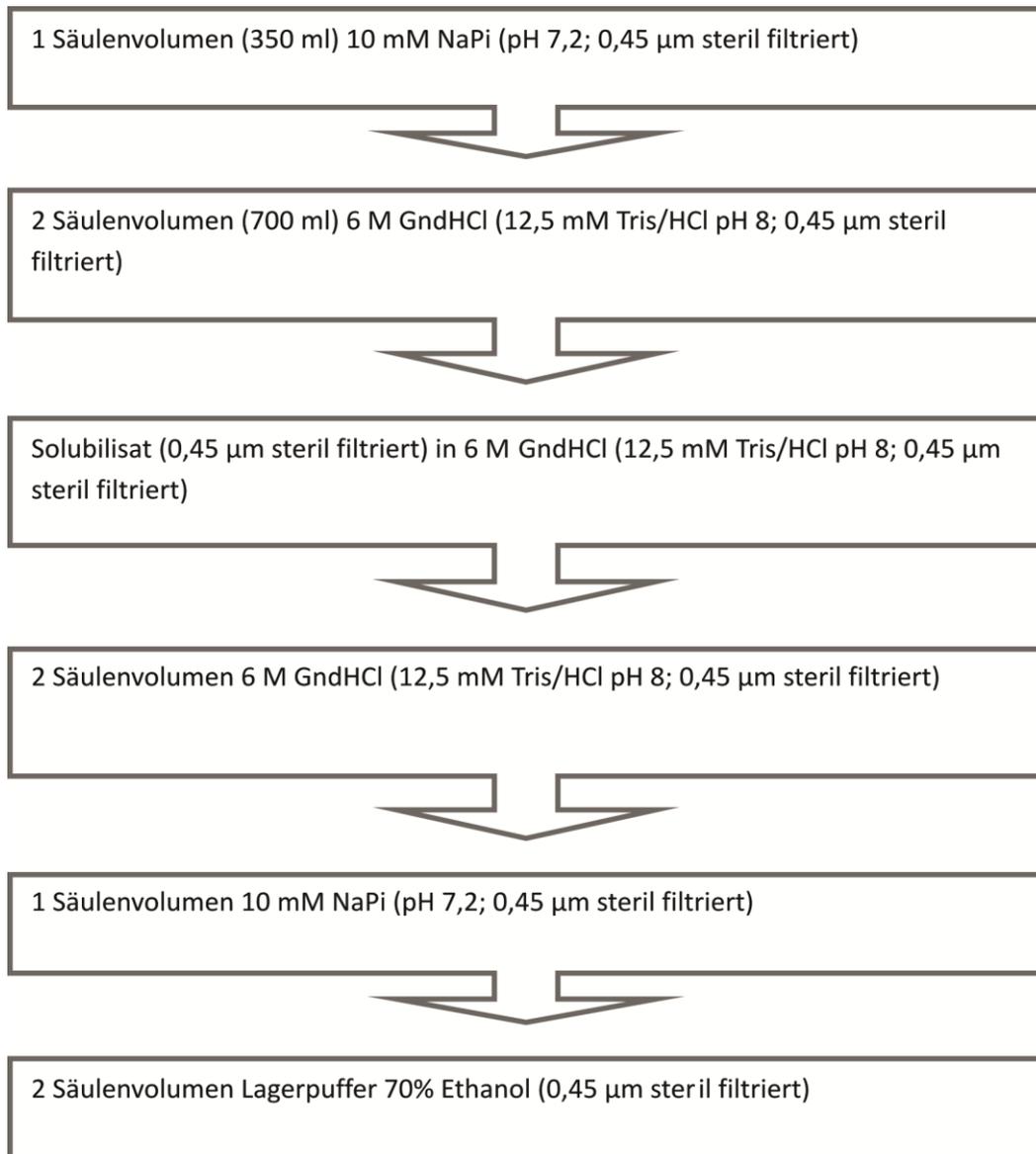


Abbildung 8.2: Fließdiagramm der SEC-Chromatographie

Die inclusion body Präparation wurde mittels SEC aufgetrennt und die gesammelten Fraktionen mittels SDS-Page und anschließender Coomassie-Färbung bzw. Western-Blot analysiert. Die Fraktionen, in denen sich rekPrP befand, wurden vereinigt und mittels RP-HPLC (Reverse Phase high performance liquid chromatography) weiter aufgereinigt.

Da die Proteine vollkommen reduziert vorlagen, d.h. ohne intakte Disulfidbrücke, wurden die Proteine 24 h in 1 mM Gluthathiol inkubiert. Für die Aufreinigung mittels RP-HPLC nutzt man

die verschiedenen Hydrophobizitäten der zu trennenden Substanzen, wobei bei der reversed-phase-chromatographie die mobile Phase (Laufpuffer) polarer als die stationäre Phase (hier: C4-Säulenmaterial) ist. Die unpolare C4-Säule (Knauer, Berlin) besitzt ein Kohlenstoffgehalt von 2 % und ist speziell für die Trennung von hydrophoben Biomolekülen, wie z. B. Membranproteinen entwickelt worden. Als mobile Phase wird ein Gradient zwischen Acetonitril (ACN) und $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ eingesetzt. Den Anfang des Gradienten bildet zunächst 100 % $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ mit einer Polarität von $>1,11$ [E0, ϵ_0]. Nach 10 min. wird mit ACN ein Gradient aufgebaut. ACN besitzt eine Polarität von $0,65$ [E0, ϵ_0]. So wird durch einen steigenden ACN-Anteil eine sinkende Polarität verursacht. Dadurch werden die in der aufgetragenen Probe enthaltenden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophobizitäten aufgetrennt. Typischerweise eluiert rekPrP in zwei Peaks (oxidierte Form des rekPrP und danach reduzierte Form des rekPrP). Nur rekPrP in der oxidierten Form wird weiter verwendet und wird in lyophilisierter Form bei -70°C gelagert werden.

Um eine vergleichbare PrP-Ausgangsstruktur zu gewährleisten, wurde das aufgereinigte rekPrP denaturiert und wieder renaturiert. Das Aufreinigungsprotokoll entspricht einer Modifizierung des Protokolls von Mehlhorn und Kollegen (Mehlhorn *et al.*, 1996). 1 mg des Lyophilisats wurde in $200\ \mu\text{l}$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ gelöst. Um die Konzentration zu bestimmen, wurde eine 1:100-Verdünnung in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ hergestellt und die Absorption bei 280 nm gemessen. Nachfolgend wurde die Proteinlösung auf 5 mg/ml eingestellt. Zur vollständigen Denaturierung des Proteins wurde das Vierfache Volumen 8 M GdnHCl (Endkonzentration 6 M) zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Renaturierung erfolgte durch schnelles Verdünnen der Lösung mit 25 mM Tris, 5 mM EDTA pH 8 zu einer 1:10-Verdünnung.

Die Proteinlösung wurde in Centricon-Zentrifugen-Filtereinheiten mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa (Amicon Inc., Beverly, USA) aufkonzentriert. Das Aufkonzentrieren erfolgte durch Zentrifugation bei $7500 \times g$ im GA10 Rotor (Beckman, Palo Alto, USA). Die Lösung in den Centricon-Filtereinheiten wurde so lange zentrifugiert, bis die Proteinlösung auf ein Volumen von ca. $50\ \mu\text{l}$ (Endpunkt-Volumen der Filtereinheit) eingengt war. Dann erfolgte ein Pufferwechsel, indem man das Konzentrat dreimal mit 2 ml NaAc pH 4,0 verdünnte und jeweils bis zum Endpunktvolumen aufkonzentrierte. Die Konzentration wurde bestimmt (s. Kap. 8.4) und das aufgereinigte rekPrP anschließend aliquotiert bei -70°C gelagert.

Puffer 1: Lösungen für *E. coli* Expression

- **LB Medium (1 l):** Bacto-tryptone 10 g pH7.4
Bacto yeast extract 5 g
NaCl 10 g
- 25 mM Tris (1,51 g), 5 mM EDTA (0,93 g), pH 8 (500 ml)
- 8 M Guanidinhydrochlorid (76 g), 12,5 mM Tris (0,15 g), 100 mM DTT (1,54 g)(100 ml)
- TET-Puffer: 50 mM TRIS, 2 mM EDTA, 1% Triton

Puffer 2: Lösungen für SEC-Chromatographie

- 6M Guanidinhydrochlorid (1,15 kg), 12,5 mM Triz (3,03g), pH8 (2 l)
- 10 mM NaPi pH 7,2 (2 l)
- 20% Ethanol (2 l)
- H₂O (1 l)

Puffer 3: Lyophilisat Aufarbeitungs-Puffer

- 100 mM Natriumacetat (pH4)
- Refoldingpuffer pH 8
- 25 mM Tris/HCl
- 5 mM EDTA

8.3 PrP^{Sc}-Aufreinigung mittels Phosphorwolframat

Die Isolation von PrP^{Sc} erfolgte aus Hirngewebe der jeweiligen Spezies. Sämtliche Schritte der Herstellung von Hirnhomogenat wurden auf Eis durchgeführt und die Puffer auf 4 °C vorgekühlt. 4 ml PBS mit Proteinase-Inhibitor-Mix (complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Mannheim) wurden auf ein Gramm Hirngewebe gegeben und 30 Sekunden mittels Homogenisator (PowerGen 125, Fisher Scientific) auf der niedrigsten Leistungsstufe und anschließend noch zweimal 30 Sekunden auf der höchsten Leistungsstufe homogenisiert. Anschließend wurden 5 ml PBS mit 4 % Sarkosyl auf das Homogenat gegeben und weitere drei

Mal für 30 Sekunden auf der niedrigsten Leistungsstufe homogenisiert, so dass ein 5 %iges Hirnhomogenat (w/v) in PBS mit 2 % Sarkosyl resultierte. Das Homogenat wurde eine Minute bei 5.000 x g zentrifugiert, um grobe Gewebefragmente abzutrennen. Der Überstand wurde als Hirnhomogenat eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte mittels NaPTA-Fällung in modifizierter Weise nach dem von Safar publizierten Protokoll für Hamster und für Schaf (Safar *et al.*, 1998) und für Rind nach (Birkmann *et al.*, 2006). Für die NaPTA-Fällung wurden 500 µl Hirnhomogenat (5% w/v) auf 50 U/ml Benzonase (Merck, Darmstadt) und 1 mM MgCl₂ eingestellt und für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Homogenat auf 0,25 % NaPTA (Phosphotungstic acid sodium salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 10,6 mM MgCl₂ eingestellt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Der Fällungsansatz wurde anschließend für 30 min bei 14.000 x g zentrifugiert und Überstand und Pellet getrennt. Das Pellet wurde mit 200 µl PBS 250 mM EDTA pH 8 bei 37°C für 30 min geschüttelt und anschließend bei 14.000 x g für 30 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Im Anschluss erfolgte ein Waschschrift mit 250 µl des Puffers, in welchem die Experimente durchgeführt werden sollten. Das resultierende Pellet wurde in 100 µl des entsprechenden Puffers aufgenommen. und dreimal 2 s mittels einer Nadelsonde bei 30 % Leistung mit Ultraschall behandelt (Bandelin HD 2070, Bandelin Electronic, Berlin).

8.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Micro BCA-Test

Zur Bestimmung der Konzentration verschiedener Proteinlösungen wurde die quantitative photometrische Methode des Micro BCA (Bicinchoninacid)-Testes (Pierce, Rockford, USA) eingesetzt. Bei dieser Methode werden Cu^{2+} -Ionen durch Proteine zu Cu^{1+} -Ionen reduziert. Zwei Bicinchoninacid-Moleküle (BCA) bilden mit den reduzierten Cu^{1+} -Ionen purpurrote Chelat-Komplexe. Diese Komplexe absorbieren bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über eine Rinderserumalbumin (BSA) Eichgerade in Konzentrationen von 0,5 bis 40 $\mu\text{g/ml}$. PrP wurde in einer Doppelbestimmung jeweils in einer 1:500 und 1:1000 Verdünnung eingesetzt und 1:1 mit der Reaktionslösung versetzt. Die Proteinlösungen wurden für eine Stunde bei 60 °C inkubiert, und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Absorptionsmessung erfolgte im Spektralphotometer DU640 (Beckmann, Palo Alto, USA) und die Konzentration der unbekanntes Proteinlösung wurde an der BSA-Eichgeraden abgelesen.

Puffer 4: Micro BCA-Test Lösungen

Albuminstandart

- 2 mg/ml Rinderserumalbumin
in 0,9 % NaCl und 0,05 % Natriumazid

Reaktionslösung:

- 25 Teile Micro BCA Reagenz A
- 24 Teile Micro BCA Reagenz B
- 1 Teil Micro BCA Reagenz C

8.5 Immunologischer Proteinnachweis

8.5.1 Differenzielle Ultrazentrifugation

Um die Löslichkeit eines Proteins zu bestimmen, wurden die Proben mittels differentieller Ultrazentrifugation aufgetrennt. Dafür wurden mindestens 20 µl Probenvolumen mittels Beckmann Optima TM TL Ultrazentrifuge (Beckmann, Palo Alto, USA) bei 25 °C und 100.000 x g zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich die löslichen Proteinanteil befinden, wurden unter Verwendung von Auftragsspitze vorsichtig vom Pellet getrennt, indem sich die unlöslichen Komponenten befinden (Hjelmeland *et al.*, 1984). Das Pellet wurde anschließend im gleichen Puffer und im gleichen Volumen wie der Überstand aufgenommen. Überstand und Pellet wurden in Auftragspuffer bei 95° C für 5-10 min. denaturiert. Die weitere Analyse erfolgte mittels Dot-Blot (siehe Kapitel 8.5.2) und der Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper.

Puffer 5: Mercaptoethanol-Auftragspuffer

- 140 mM Tris/HCL, pH 6,8
- 10% 2-Mercaptoethanol
- 4% SDS (10%)
- 10% Glycerin (87%)

Der Mercaptoethanol-Auftragspuffer wurde in H₂O_{deion.} angesetzt und eine Spatel-Spitze Bromphenolblau hinzugegeben.

8.5.2 Dot-Blot

Beim Dot-Blot wird die Proteinprobe auf eine PVDF- (Polyvinylidenfluorid-) Membran aufgetragen. Hierzu wird die Dot-Blot Apparatur Minifold I (Schleicher & Schuell, Dassel) mit 96 Probenlöchern verwendet. Die Membran wird mit Ethanol aktiviert, und zusammen mit einem Chromatographiepapier in TBST (Tris Buffer Saline Tween)-Puffer geschwenkt. Die Dot-Blot

Apparatur besteht aus der unteren Auffangkammer, dem Chromatographiepapier und der PVDF-Membran. Nachdem die Apparatur mit der oberen 96-Loch Platte zusammgebaut wurde, konnten die Proben aufgetragen werden. Dazu wurden 150 μ l Puffer in die Wells vorgelegt und anschließend die zu analysierenden Proben zugegeben. An die Apparatur wurde nun Vakuum angelegt und die Proben auf die Membran gesogen. Anschließend konnten die verschiedenen Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert werden (siehe Tabelle 1).

8.5.3 Diskontinuierlich Gelelektrophorese und Western-Blot

Mittels SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach (Sambrock, 1989) mittels diskontinuierlicher und denaturierender Gelelektrophorese. Zur besseren Auftrennung der Proteinlösung wurde über dem Trenngel, nach dessen Polymerisation, zusätzlich ein Sammelgel überschichtet. Die Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel denaturiert. Hierzu wurden die Proben mit einem Volumen Mercaptoethanol-Auftragspuffer gemischt und für 5-10 min auf 95°C erhitzt. Als Molekulargewichtsstandard wurde Rainbow Marker (Amersham) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 250 V. Nachdem die Proteine im Gel aufgetrennt wurden, konnten sie auf die PVDF-Membran mittels Western-Blot überführt werden. Dazu wurde die PVDF Membran, nachdem sie mit Ethanol aktiviert wurde, mit sechs Lagen Chromatographie-Papier in TBST (siehe Puffer 6) geschwenkt. Nach drei Chromatographie-Papieren wurde die PVDF-Membran, anschließend das Gel und dann weitere 3 Chromatographie-Papiere auf die Western-Blot Apparatur aufgelegt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei ca. 2 mA pro cm^2 -Gel­fläche für 45 min.

Puffer 6: TBST-Puffer

TBST (Tris Buffer Saline Tween)

- 10 mM Tris/HCL pH 8,0
- 150 mM HCL
- 0.01% Tween

Puffer 7: Gelelektrophorese

Trenngel

- 380 mM Tris/HCL, pH 8,8
- 12-16% Polyacrylamid-Stammlösung
- 1 % SDS
- 0,1 % TEMED

Sammelgel

- 125 mM Tris/HCL, pH 8,8
- 3-6% Polyacrylamid-Stammlösung
- 1 % SDS
- 0,1 % TEMED

Puffer 8: SDS-Laemmli-Gelelektrophoresepuffer

- 250 mM Tris
- 1,9 M Glycin
- 0,1% SDS

Puffer 9: Proteinstandard

Es wurde der Rainbow™ Molekulargewichtsmarker von Amersham Pharmacia Biotech verwendet.

Molekulargewicht [kDa]	gefärbte Proteine
14,3	Lysozym
20,1	Trypsin-Inhibitor
30,0	Carboanhydrase
45,0	Ovalbumin
66,0	Rinderserumalbumin
97,0	Phosphorylase b
220,0	Myosin (H-chain)

8.5.4 Proteinnachweis mittels spezifischer Antikörper

Die mit der Probe versetzte PVDF-Membran (siehe Kapitel 8.5.3) wird durch Schwenken in 5% Milchpulver (Frema-Reform, DE-VAU-GE, Lüneburg) in TBST abgesättigt. Dies erfolgte für mindestens 1 Stunde bei RT oder optional über Nacht bei 4°C. Anschließend wurde die Membran mit TBST kurz gewaschen, um die Milchpulver Rückstände zu beseitigen. Für den spezifischen PrP-Nachweis wurden spezifische Antikörper benutzt (Kap xx). Die Membran wurde zwei Stunden (optional ü.N.) mit dem Erstantikörper in einer 1:10.000 Verdünnung in TBST geschwenkt. Nach Waschen mit TBST wurde der entsprechende Zweitantikörper in einer 1:5000 Verdünnung in TBST hinzugegeben. Die Detektion erfolgte durch Chemolumineszenz. Hierfür wurde ECL (elektrochemische Lumineszenz) oder ECL-Plus-Reagenz (beide Amersham, Buckinghamshire, GB) nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei nutzt man eine Peroxidase katalysierte Oxidation von Luminol im alkalischen Medium. Luminol zeigt bei alkalischer Oxidation starke Lumineszenz. Danach wurde die Lumineszenz nach einer Expositionszeit von wenigen Sekunden bis über Nacht detektiert. Dazu wurde der Röntgenfilm Kodak-X-Omat von Sigma

8.6 Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Bei der Circulardichroismus- (CD-) Spektroskopie macht man sich die optischen Eigenschaften von chiralen Molekülen zu nutzen. Asymmetrische Moleküle weisen unterschiedliche Extinktionskoeffizienten für links- und rechtscircular polarisiertes Licht auf. Messgröße ist dabei die Differenz der Extinktionskoeffizienten $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$. Der Unterschied wird in Form der Elliptizität angegeben. Dabei besteht folgender Zusammenhang:

$$\theta_{(\lambda)} = \ln 10 * \frac{180}{2\pi} * (\epsilon_L - \epsilon_R) * c * d$$

θ = Elliptizität

d: Schichtdicke

c: Konzentration

ϵ_L : Extinktionskoeffizient der linkszirkularpolarisierten Komponente

ϵ_R : Extinktionskoeffizient der rechtszirkularpolarisierten Komponente

Formel 8.1: Molare Elliptizität

Bei Proteinen wird der CD-Effekt durch die Asymmetrie der Sekundärstrukturelemente wie α -Helix und β -Faltblatt, verursacht. Diese zeigen jeweils unterschiedliche CD-Spektren im fernen UV-Bereich (170-260 nm, siehe Abbildung 8.3). Mittels Messung des CD-Spektrums lässt sich daher durch den Vergleich mit Proteinen oder Modellpeptiden bekannter Struktur auf die relativen Sekundärstrukturanteile zurückschließen.

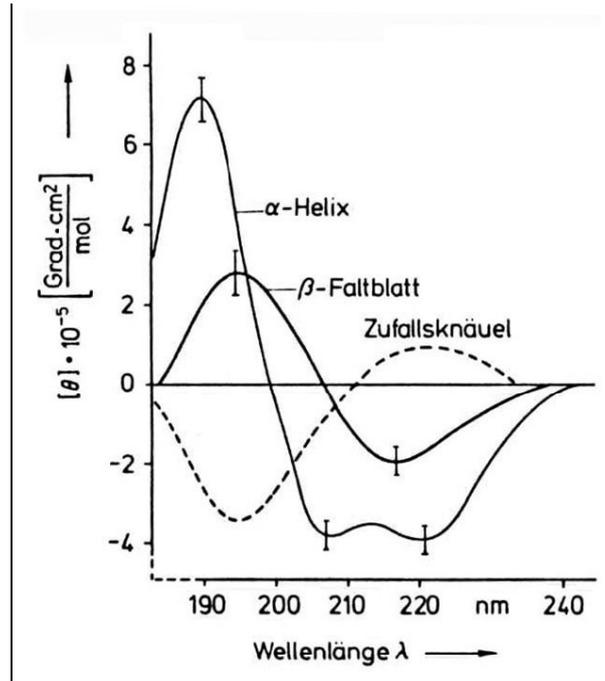


Abbildung 8.3: CD-Spektren typischer Sekundärstrukturen

α -helikale-, β -Faltblatt und „random-coil“- Beispielspektren, nach (Greenfield, 1969).

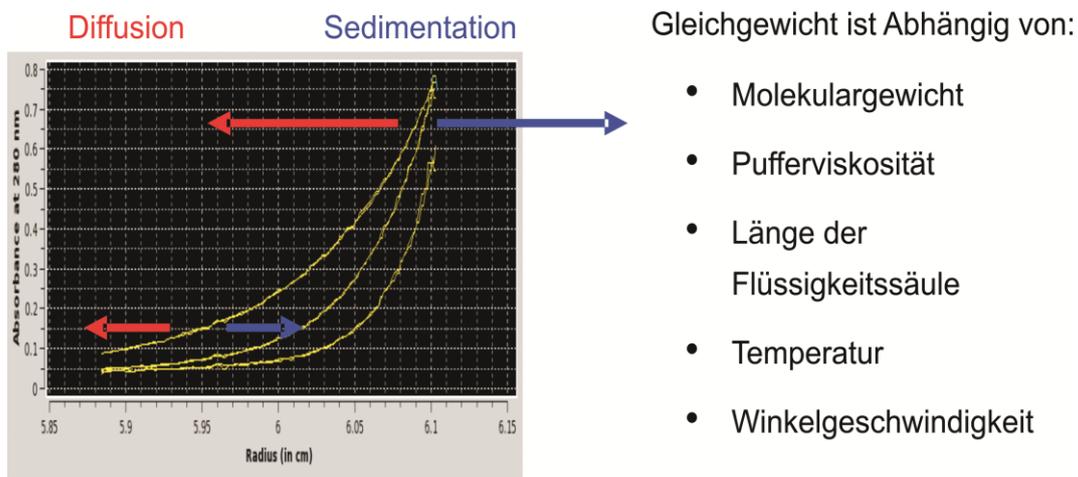
Die Aufnahmen der CD-Spektren wurden mit einem Spektralpharimeter J-715 (Jasco[®] Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt) durchgeführt, welches zu Beginn jeder Messreihe mit Ammonium-d-Campher-10-Sulfat geeicht wurde. Es wurden Mikroküvetten (Helma, Müllheim) für ein Probenvolumen von 200 μl verwendet. Zur Messung musste eine Proteinkonzentration von mindestens 150 $\text{ng}/\mu\text{l}$ eingesetzt werden. Die Spektren wurden mit einer Geschwindigkeit von 50 nm/min und einer Auflösung von 1 nm bei Raumtemperatur im Bereich von 200–260 nm aufgenommen. Die Spektren waren bis einer Wellenlänge von 200 nm auswertbar, da bei geringeren Wellenlängen die optische Dichte durch NaCl zu hoch war. Es wurden jeweils 10 Spektren pro Probe aufgenommen und gemittelt. Jede Messung wurde gegen das entsprechende Pufferspektrum korrigiert. Während der Messungen wurde die Probekammer mit 12 l Stickstoff gespült, um Ozonbildung zu vermindern.

8.7 Ultrazentrifugation

8.7.1 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation (AUZ) ermöglicht eine genauere Aussage über Oligomerisierungsgrade von Proteinen. Die AUZ besitzt ein empfindliches optisches System zur Probenanalyse, womit die Probenkonzentration/-Verteilung während der Zentrifugation verfolgt werden kann. Über das Sedimentationsprofil im Zentrifugalfeld können nicht nur der Sedimentationskoeffizient, sondern auch der Diffusionskoeffizient, das Molekulargewicht, sowie Informationen über die räumliche Gestalt des Moleküls bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde die Sedimentation-Diffusion-Gleichgewichtszentrifugation (Sedimentation Equilibrium; kurz SE- oder M-Lauf) durchgeführt. Eine Probe wird zentrifugiert, bis sich ein Gleichgewicht von Sedimentation und Diffusion einstellt (siehe Abbildung 8.4). Aus dem entsprechenden Konzentrationsprofil kann das Molekulargewicht des Moleküls bestimmt werden. Dabei fließt der Formfaktor nicht in die Berechnung des Sedimentations- und Diffusionsverhalten ein (siehe Gleichung 8.1). Daher kann in dieser Methode das Molekulargewicht eines Proteins oder Proteinkomplexes sehr genau bestimmt werden.



www.bio.uni-mainz.de/zoo/stoecker/Dateien/AUZ_Vortrag_Methodenseminar_Jan_2007_Endversion.ppt

Abbildung 8.4: Sedimentation-Diffusion-Gleichgewichtszentrifugation

Die Sedimentation-Diffusion-Gleichgewichtszentrifugation nutzt die Tatsache aus, dass Moleküle bei der Zentrifugation nicht nur der Sedimentation unterliegen, sondern auch der Diffusion (siehe Abbildung 8.4). Wird die beschleunigende Kraft klein genug, stellt sich nach einer Zeit ein Gleichgewicht aus Sedimentation und Diffusion ein. Durch Kombination der Svedberg-Gleichung mit dem ersten Fick'schen Gesetz der Diffusion wird ein mathematischer Zusammenhang zwischen Sedimentation und Diffusion geschaffen. Daraus ergibt sich, dass der Gleichgewichtszustand eine Funktion der Molekülmasse m ist:

$$m = \frac{2RT}{(1 - \rho\vartheta)\omega^2} * \frac{d(\ln c)}{d r^2}$$

m = Molekülmasse

R = Gaskonstante

T = Temperatur

c = Konzentration

r = Radius

ω = Winkelgeschwindigkeit

ϑ = partielles spezifisches Volumen

ρ = Dichte des Lösungsmittels

Gleichung 8.1: Gleichgewichtszustand als Funktion der Molekülmasse

Diese Gleichung beinhaltet, dass im Zustand des Gleichgewichtes für r^2 die Konzentration $c(r)$ eine e-Funktion ist:

$$c(r) = c_0 e^{m\alpha(r^2 - r_0^2)}$$

c = Konzentration

r = Radius

m = Masse des Moleküls

wobei α definiert ist als:

$$\alpha = \frac{(1 - \rho\vartheta)\omega^2}{2RT} * m$$

α = Steigung nach Linearisierung

ϑ = partielles spezifisches Volumen

ρ = Dichte des Lösungsmittels

ω = Winkelgeschwindigkeit

m = Molekülmasse

R = Gaskonstante

T = Temperatur

Gleichung 8.2: Konz. Profil in Abhängigkeit von Molekülmasse/Winkelgeschwindigkeit

Über die Lösung dieser Gleichung kann im Gleichgewichtszustand zwischen Sedimentation und Diffusion, durch eine lineare Auftragung des natürlichen Logarithmus der Konzentration gegen den Radius, über die Steigung das Molekulargewicht m berechnet werden. Die in einem M-Lauf unter verschiedenen Geschwindigkeiten ermittelten Konzentrationsprofile werden mittels der Software „Ultrascan“ (Demeler *et al.*, 1998) ausgewertet.

Die Proben wurden auf 10 mM NaPi, 250 mM NaCl und eine PrP-Konzentration von 40 ng/ μ l eingestellt und vor der Messung 2-5 Tage bei 37°C inkubiert. Die SDS-Konzentration wurde der Fragestellung angepasst, im überwiegenden Fall wurde sie auf 0,02% SDS eingestellt.

8.8 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Um die Morphologie verschiedener Proteinaggregate zu untersuchen, wurde Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) am Zeiss EM 910 durchgeführt.

Zur Elektronenmikroskopie wurden Nickel-Netze (200 Mesh, Nickelnetze mit Formvar und Kohle beschichtet, PLANO GmbH, Wetzlar) benutzt. Die zu untersuchenden Proteinaggregate, bestehen hauptsächlich aus Atomen mit einer geringen Elektronendichte. Dadurch würde der vom TEM emittierte Elektronenstrahl fast ungehindert durch das Protein treten und es würde zu

fast keiner Abbildung kommen. Diesem Problem begegnet man mittels der Negativkontrastierung. Dabei lagern sich Schwermetallionen an die Proteinaggregate an, wodurch die direkte Umgebung des Aggregats durch hohen Kontrast gekennzeichnet wird.

Die Nickelnetze müssen vor ihrem Gebrauch, zur besseren Probenadhäsion, behandelt werden. Die kolloidale Kohleschicht ist hydrophob, was die Aufbringung der Probe erschwert. Die Adsorptionseffizienz und die Qualität der Färbung können verbessert werden, indem die Netzoberfläche an Hydrophilie gewinnt. Daher werden die Nickel-Netze vor der Probenauftragung einer Glimmentladung ausgesetzt. Dabei wird in einer Vakuumkammer bei einem Partialdruck von ca. 0,01 mBar zwischen zwei Elektroden eine Wechselspannung angelegt (60 sec.). Dadurch werden die Moleküle in der Kammer ionisiert. Diese Radikale induzieren in der oberen Kohleschicht eine Ladung, welche die Oberfläche an der Luft hydrophil werden lässt. So behandelte Netze sollten möglichst bald (innerhalb einer Stunde) verwendet werden, da die Ladung exponentiell abnimmt. Zur Probenauftragung werden 5-10 µl einer Probe auf ein Netz getropft und 1-2 Minuten zur Adsorption inkubiert. Die Flüssigkeit wird anschließend mit 0,1 M Ammoniumacetat (NH₃Ac) und 0,01 M NH₃Ac gewaschen, um mögliche Wechselwirkungen des Probenpuffers mit dem Kontrastmittel zu vermeiden. Danach wird Ammoniummolybdat (2 % w/v jeweils frisch steril filtriert) zugegeben. Anschließend musste die noch verbleibende Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgezogen werden, um den Färbeprozess zu stoppen.

Puffer 10: Lösungen für Elektronenmikroskopie

- 0,1 M Ammonium Acetat
- 0,01 M Ammonium Acetat
- 2 % (w/w) Ammoniummolybdat in H₂O_{deion.}

8.9 Nachweis amyloider Strukturen mittels spezifischer Farbstoffe

Die amyloiden Strukturen in den Proben wurden mit Farbstoffen untersucht, die spezifisch und ausschließlich amyloide Strukturen erkennen. Die verwendeten Farbstoffe Thioflavin-T und Kongorot finden sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Diagnose eine weite Verbreitung. Beide Farbstoffe sind sich chemisch ähnlich. Die Wechselwirkung mit amyloiden Fibrillen basiert auf ähnlichen Prinzipien (siehe Kapitel 8.9.1 und Kapitel 8.9.3). Mittels beider Farbstoffe kann der amyloide Charakter von Fibrillen verifiziert werden.

8.9.1 Thioflavin-T (ThT)

Thioflavin-T (ThT) ist ein 3,6-dimethyl-2(4-dimethylaminophenyl-)benzothiaz, welches spezifisch mit Fibrillen interagiert (LeVine, 1993; Naiki *et al.*, 1989), (Naiki *et al.*, 1990). ThT besteht aus einer Benzothiazol Untereinheit und einer Benzoamin Untereinheit, welche an den kovalenten Bindungen drehbar ist (siehe Abbildung 8.5). Somit ist das Molekül nicht ganz planar. Im Grundzustand ist die Benzothiazol- zur Benzoamin-Untereinheit an der δ -Bindung um $\delta=30^\circ$ verdreht. Bei einer Anregung des ThT durch ein Photon vom S₀ zum S₁ Singlettzustand kann eine Desaktivierung der Energie durch innere Konversion erfolgen. Dabei wird nur eine geringe Strahlungsmenge abgegeben, und die Winkel bei Abbildung 8.5 A auf $\delta=90^\circ$ gedreht (Voropai, 2003). Wenn jedoch die innere Konversion (nach Anregung mit Photonen) verhindert wird, kommt es zu einer starken Fluoreszenz, denn die Desaktivierung von S₁ kann dann nur erfolgen wenn ein Lichtquant emittiert wird. Die innere Konversion von ThT kann durch die Wahl verschiedener Lösungsmittel beeinflusst werden die sich in ihrer Viskosität und Polarität unterscheiden. So kann die Rotation des Thioflavin eingeschränkt sein und somit auch die Möglichkeit zur Desaktivierung von S₁ über innere Konversion, was eine Erhöhung der Fluoreszenz zur Folge hat (Voropai, 2003). Chemisch ThT Ähnlichkeit mit dem Farbstoff Kongorot der ebenfalls mit amyloiden Fibrillen interagiert (Klunk *et al.*, 1989) (siehe Kapitel 8.9.3). Die Interaktion zwischen ThT und amyloiden Fibrillen (siehe Abbildung 8.5) setzt β -Faltblatt Strukturen der Fibrillen voraus (Biancalana *et al.*, 2009) (Krebs *et al.*, 2005). Durch die

Aneinanderlagerung mehrerer β -Faltblätter in Fibrillen bilden die β -Faltblatt-Seitenketten Kanäle die rechtwinklig zum Rückgrat der Faltblätter stehen (Pauling, 1998) (Salemme, 1983). Die Breite dieser Kanäle (siehe Abbildung 8.5) beträgt 6,5-6,96 Å (Salemme, 1983). ThT ist 6,1 +/- 0.1 Å lang, jedoch nur 4,3 +/- 0,1 Å dick (siehe 2.6). Demnach könnte ThT nach einem Modell von (Biancalana *et al.*, 2009) im rechten Winkel zur β -Faltblatt-Achse in den Kanälen binden. Das ThT wäre dann von den Seitenketten des β -Faltblatts umgeben, wodurch es zu sterischen Interaktionen zwischen den Seitenketten und dem ThT Molekül kommt (siehe Abbildung 8.5).

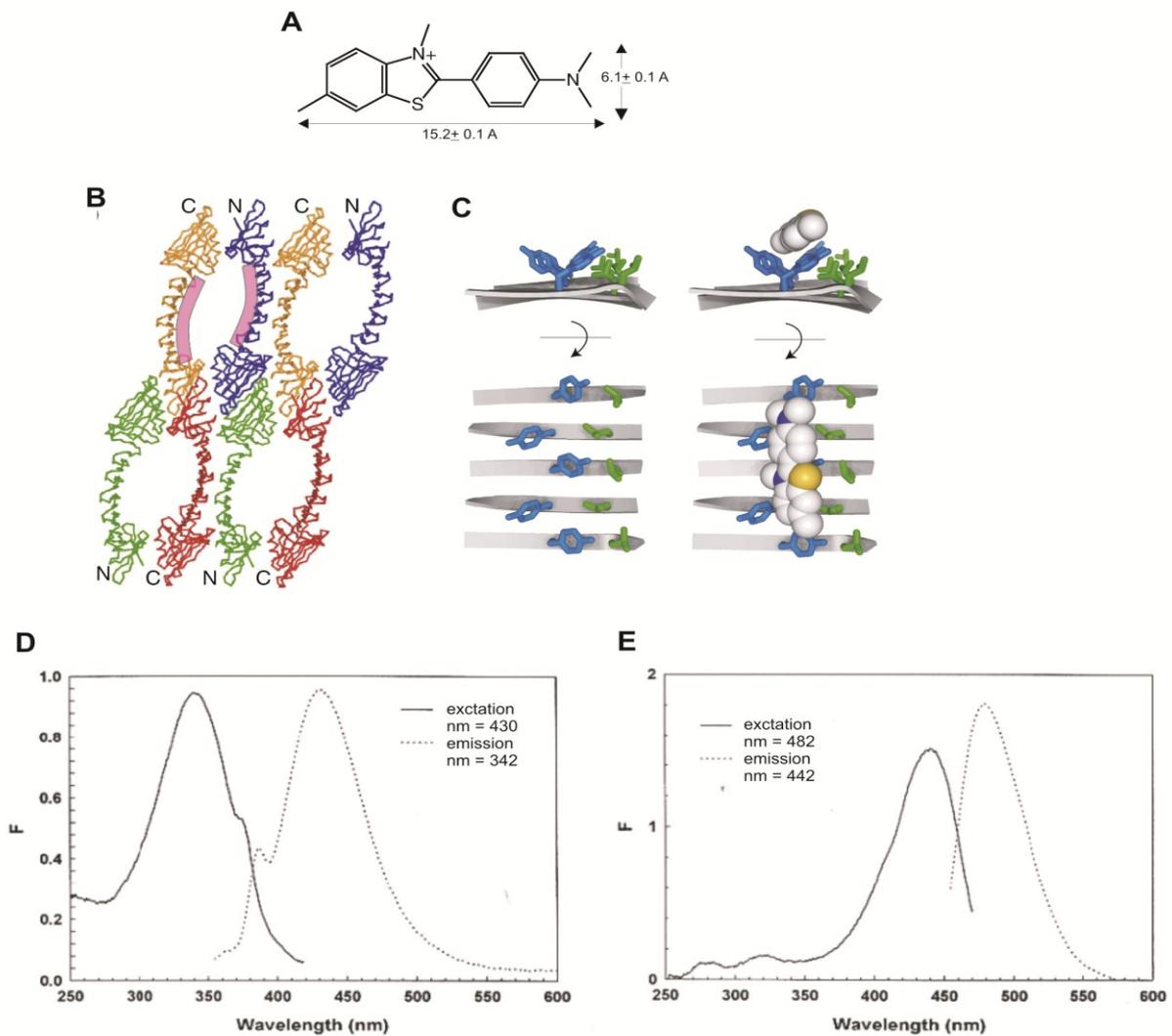


Abbildung 8.5: Modell der Thioflavin-T Bindung an β -strands

A Thioflavin-T. **B** Bindungsmodell von ThT an β -strands. Die Purpurnen Kurven entsprechen der ThT Bindungslage in einer β -strand reichen Struktur. **C** Ansicht vom C- zum N-terminus des Aggregat-Rückgrats (links). Längsachsenansicht der ThT-Bindung an β -strand reichen Strukturen (rechts). (Biancalana *et al.*, 2009) **D** Fluoreszenzspektrum von freiem bzw. **(E)** an amyloiden Strukturen gebundenem ThT.

Diese Interaktion mit den Seitenketten führt dazu, dass ThT in einer flachen Konformation bleibt, auch wenn es durch ein Photon angeregt wird. Dadurch dass die innere Konversion des ThTs verhindert wird (s.o.), kann der Übergang vom S1 Zustand durch Emission eines Lichtquants in den S0 Zustand erfolgen. Diese spezifische Interaktion erlaubt es Thioflavin T zur Determination von amyloiden Fibrillen zu nutzen (LeVine, 1993) (Naiki *et al.*, 1989). Da alle β -Faltblätter Kanäle enthalten, in denen sich ThT einlagern kann, könnten auch sie zu ThT-positiven Fluoreszenz Signalen führen. Die Beimischung von ThT zu einem nativen β -Faltblatt-reichem Protein führt nur zu einem leicht erhöhten Fluoreszenz Signal (LeVine, 1999). Native β -Faltblatt Strukturen haben nicht die geordnete Wiederholung der Reste wie dies bei amyloiden Fibrillen der Fall ist (Krebs *et al.*, 2005). Eine native β -Faltblatt Struktur benötigt zumindest fünf Stränge (Länge: 18.8 Å) (Pauling, 1998) (Biancalana *et al.*, 2009) damit es länger als ein Thioflavin-T Molekül ist (Länge: 15.2 Å). Dies wird auch als die Mindestanzahl von repetitiven Elementen gesehen um eine amyloid spezifische Fluoreszenzerhöhung zu erhalten.

8.9.2 Fluoreszenzmessung im Tecan Safire Multidetektionsgerät

Die Thioflavin-T Fluoreszenzmessungen wurden im Monochromator-Reader Tecan Safire (Boston, MA/USA) durchgeführt. Das Safire ist ein Multidetektionsgerät mit dem die Messung von Absorption und Fluoreszenzintensität in Mikroplatten durchgeführt werden kann. Die Messungen erfolgten in schwarzen 96-Well (Nunc, Langenselbold, Germany) Platten im Top-Reading-Modus. Für Versuche mit Fibrillen wurde eine Z-Position von ca. 4000 μm gewählt. Eine weitere Einstellmöglichkeit bietet die Funktion des Gains. Es ist ein Verstärkungsfaktor, der zwischen 1 und 255 eingestellt werden kann. Jedoch nur der Bereich bis 150 ist linear. Bei der Messung wurde als Excitationswellenlänge 445 nm gewählt und der Emissionsbereich zwischen 470 und 630 nm aufgenommen.

Zur Kinetikmessung wurde, wenn nicht anders beschrieben, 80 ng/ μl Protein und 5 μM ThT in 150 μl Gesamtvolumen eingestellt (10 mM NaPi pH 7,4; 0,02-0,03 % SDS; 250 mM NaCl). Die Ansätze wurden 30 min bei 37°C inkubiert, und nach 30 Sek. Schütteln jeweils eine Fluoreszenzmessung durchgeführt. Sowohl die Inkubation als auch die Messung erfolgten innerhalb des Tecan. Der Mittelwert der Relativen Fluoreszenz Intensität (RFU) vom

Wellenlängenbereich 495-505 nm wurde anschließend gegen die Zeit aufgetragen. Zur besseren Übersichtlichkeit wurden die einzelnen Messpunkte über 65 Stunden addiert bzw. bei Studien zur Interspezies Barriere für das Zeitintervall von 24-48 h addiert und als Histogramm dargestellt.

8.9.3 Kongorot

Kongorot ist ein Natrium-Salz von benzidinediazo-bis-1-naphtylamine-4-sulfonic säure (siehe Abbildung 8.6). Es wurde ursprünglich 1883 von Paul Bottiger als pH-Indikator synthetisiert und später an AGFA verkauft, welche dieses Produkt unter den noch heute gängigen Namen Kongorot vermarkteten (Steensma, 2001). Erst 1922 wurde die Eigenschaft erkannt, dass Kongorot spezifisch an amyloiden Strukturen bindet, und noch später die besondere apfelgrüne Doppelbrechung bei Anlagerung an amyloiden Strukturen (Steensma, 2001).

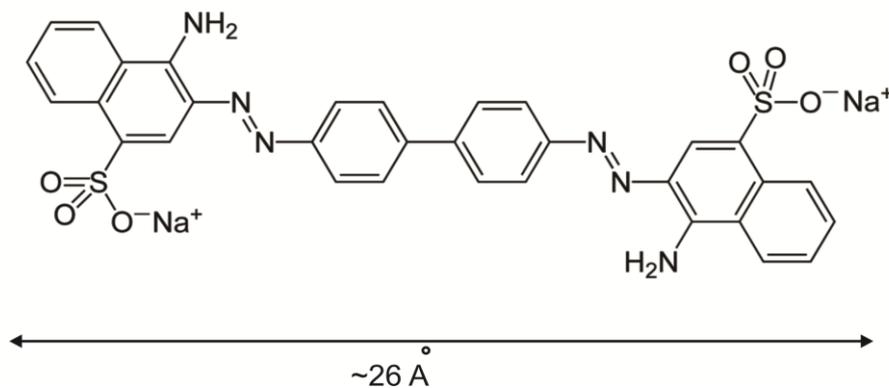


Abbildung 8.6: Kongorot

Kongorot (Molekülformel: $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$; Molekulargewicht: 696.66 g/mol)

Bei der Anfärbung von amyloiden Aggregaten wurden ausschließlich Aliquots der Proben verwendet die zuvor ein Thioflavin-T positives Signal gezeigt haben (siehe Kapitel 8.9.1). Es wurden jeweils 10 μ l Probe auf Objektträger überführt, und bei 37°C eintrocknen lassen. Anschließend wurde das doppelte Volumen der Kongorot Färbelösung aufgetropft und für ca. drei Minuten inkubiert (wobei sie nicht austrocknen darf). Die Kongorot Färbelösung wurde anschließend mit 1 ml 90% Ethanol und anschließend 95% Ethanol gewaschen. Dabei ist darauf

zu achten das die angetrocknete Probe wenn möglich nicht aufgewirbelt wird. Die Probe wurde anschließend getrocknet und mit einem Tropfen Einschlußharz (Entellan, Merck, Darmstadt) und einem Deckgläschen versiegelt.

Puffer 11: Kongorot Lösungen

- 0,2 g Kongorot
in 100 ml Kochsalzlösung
in 80% Ethanol
- 90% Ethanol

8.10 Polarisationsmikroskopie

Die mittels Kongorot präparierten Proben wurden anschließend am Polarisationsmikroskop (Polarisationsmikroskop III Carl Zeiss, Oberkochen) analysiert. Die sichtbaren Aggregate wurden auf gold-grünen-Doppelbrechung untersucht, um amyloide Strukturen zu bestätigen oder auszuschließen. Durch diese Doppelbestimmung der Aggregateigenschaft mittels ThT-Fluoreszenz und gold-grünen-Doppelbrechung von Kongorot konnte bestimmt werden, ob es sich um amyloide Strukturen handelte. (siehe Kapitel 1.1)

8.11 Mathematische Ausgleichskurven

Bei der Verwendung von kinetischen Messungen, wie bei der keiminduzierten Amyloidbildung, wurden die Datenpunkte mittels einer Trendlinie vereinfacht dargestellt. Dazu wurde die „Trendlinie“ Funktion von „Excel 2007“ benutzt, und jeweils eine polynomische Regressionsgerade eingefügt. Das mathematische Modell welches dieser Berechnung zugrundeliegt ist dass bestimmte y-Werte und x-Werte verwendet werden um Polynomen der

Ordnung 1-6 zu bestimmen. So wird bei einer kubischen (Polynom der Ordnung 3) Annäherung folgende Formel benutzt:

$$y = m_1 * x + m_2 * x^2 + m_3 * x^3 + b$$

Formel 8.2: Polynom der Ordnung 3

Um Polynome einer anderen Ordnung zu berechnen wird diese Formel angepasst.