Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Polysacchariden und alterungsassoziierten Proteinmodifikationen bei Prionen

Inaugural–Dissertation

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

vorgelegt von

Christian Dumpitak

aus Duisburg

Düsseldorf

2003

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent:	UnivProf. Dr. D. Riesner
Koreferent:	UnivProf. Dr. AW. Alfermann
Tag der mündlichen Prüfung:	18. Juli 2003

Meiner Familie und all den anderen großartigen Menschen die mich bislang begleitet haben

Danksagung

An erster Stelle danke ich herzlichst meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Detlev Riesner. In seinem Institut habe ich in einem interdiziplinären Umfeld, mit großer Freiheit selbstverantwortlich und selbstständig forschen können. Durch seine Unterstützung, zahlreichen Anregungen und die mit ihm durchgeführten Diskussionen wurde die vorliegende Dissertation erst in dieser Form möglich.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Institut für Physikalische Biologie danke ich für eine exquisite Atmosphäre, unzählige Diskussionen, Anregungen, Hilfestellungen, Lust- und Frustbewältigungen, etc. - sprich für all das, was das Doktorandenleben so ausmacht.

Ein großes Dankeschön für viele verschiedene große und kleine Dinge geht insbesondere an Dipl.-Biol. Kerstin Elfrink, Bernd Esters, Dipl.-Biol. Stephan Gräf, Frau Heidi Gruber, Dr. Martin Horlitz, Dr. Katja Jansen, Dipl. Biol. Tina Kaimann, Ralf Lucassen, Dipl.-Biol. Hendrik Müller, Dr. Luitgard Nagel-Steger, Ilka Ostermann, Dr. Olliver Schäfer, Dr. Jens Schell, Michael Schenker, Dipl.-Biol. Axel Schmitz, Dr. Michael Schmitz, Herrn Prof. Dr. Gerhard Steger, Dipl.-Biol. Jan Stöhr, Dipl.-Biol. Andreas Wilm, Dipl.-Biol. Michael Wolff und die Biocomputing AG.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an Dr. Karin Post und die "Doctores in spe" Eva Birkmann, Nadine Kolonke, Katharina Lecher, Karl-Werner Leffers und Nicole Weinmann für so viele großartige und freundschaftliche Dinge, die, hier aufzuzählen, einfach den Rahmen sprengen würde.

Die vorliegende Arbeit wäre darüber hinaus ohne eine ganze Reihe wissenschaftlicher Kooperationen nicht möglich gewesen.

Here I'd like to thank Prof. Dr. Stanley B. Prusiner, Prof. Dr. Holger Wille und Hanna Serban (University of California, San Francisco), for providing PrP- and prion materials, for support with bioassays as well as stimulating discussions.

Dr. Uwe Matthiesen (Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, HHUD) und Dr. Sabine Metzger (Biologisch-Medizinischen-Forschungszentrum, HHUD) danke ich sehr herzlich für eine geniale Kooperation in punkto massenspektrometrischer Analytik von Polysacchariden und unzählige Diskussionen und Anregungen.

Besonderer Dank gilt Dr. Michael Beekes und Mitarbeitern (Robert-Koch-Institut, Berlin) für eine fantastische Kooperation, insbesondere für die Möglichkeit zu Bioassays, die Unterstützung bei der PrP-Analytik, die Bereitstellung von Untersuchungsmaterialien und und natürlich zahlreiche Diskussionen und Einblicke.

Ein ganz großes Dankeschön geht an PD Dr. Jörg Tatzelt und Mitarbeiter (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) für die viele Mühe mit den N2a- und ScN2a-Materialien, sowie viele Diskussionen und Anregungen. Bei Dr. Martin Groschup und Mitarbeitern (Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Insel Riems) bedanke ich mich für die Unterstützung mit Bioassays.

Bei der Firma Roche Diagnostics, Penzberg und dort bei Herrn Dr. P. Stahl, Dr. Kay Stubenrauch und insbesondere bei Frau Dr. R. Kientsch-Engel bedanke ich mich für die Bereitstellung verschiedener Antikörper, Antigene und natürlich für die vielen Diskussionen, Anregungen und Einblicke in punkto AGEs und Alterung.

Many thanks to Dr. Oto Baba (University of Texas, Houston) and Dr. Garcia-Rocha (Universitat de Barcelona, Barcelona) for providing anti-glycogen-antibody as well as stimulating discussions.

Desweiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Böcking (Institut für Cytopathologie, HHUD) für die Unterstützung bei der Identifizierung von *Corpora amylacea*, PD Dr. Olaf Bossinger (Institut für Genetik, HHUD) für die Möglichkeit von Messungen am konfokalen laserscanning-Fluoreszenzmikroskop, Frau PD Dr. E. Neuen-Jacob (Institut für Neuropathologie, HHUD) für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterialien, Herrn PD Dr. W. Sippl (Institut für Pharmazeutische Chemie, HHUD) für die Unterstützung mit computergestützen Berechnungen und Herrn Dipl.-Ing. F. Susanto (Deutsches Diabetes-Forschungsinstitut, Düsseldorf) für die Möglichkeit zu GC-/MS-Messungen.

Für zahlreiche bereichernde Diskussionen, Einblicke, Anregungen und Hinweise danke ich insbesondere Frau Prof. Dr. Marion Schneider (Universität Ulm), Herrn Prof. em. Dr. Wulff (Institut für Organische Chemie und Makromolekulare Chemie, HHUD), Herrn PD Dr. Münch (Universität Leipzig) und Frau Prof. Dr. Mischnick (TU Braunschweig).

Furthermore I'm indebted to H.P.L. and Dr. Henry Armitage (Miscatonic University, Arkham) for stimulating excursions into academic adventures.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen Freundinnen und Freunden, die mich durch nicht immer einfache Zeiten begleitet haben und mir mit Rat und Tat auch bei allen sonstigen Problemen des Lebens beiseite standen. Insbesondere möchte ich hier Anja Baldamus, Eva Birkmann, Pierre Hilbich, Eva-M. Linnartz, Michael Nowak, Stephan Schikorra, Anke Schmidt, Hauke Schneider, und Tom Wiegand danken.

Meiner Familie, allen voran meinen Eltern Gertrudis und Somboon Dumpitak, meinen Geschwistern Martin und Susanne, meinem Onkel Eduard Kippels und meiner kürzlich verstorbenen "Oma" Mathilde Virus danke ich für den Rückhalt, die Ermutigungen und die viele Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Ohne sie wäre diese Arbeit niemals möglich gewesen.

Ταράσσει τοὺς ἀνθρώπους οὐ τὰ πράγματα, ἀλλὰ τὰ περὶ τῶν πραγμάτων δόγματα. - Επίχτητος, Εγχειρίδιον

Nicht die Dinge bringen die Menschen in Verwirrung, sondern die Ansichten und Urteile über die Dinge.

- Epiktetos, Encheiridion

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	IV
Häufig verwendete Abkürzungen	VI
Prion-Terminologie:	IX
1. Einleitung	1
1.1 Alterung und altersassozijerte Krankheiten	1
1.2 Molekulare Mechanismen der Alteruna	2
1.2.1 Freie Radikale und oxidativer Stress	2
1.2.2 Advanced Glycation Endproducts und Carbonylstress	4
1.2.3 Proteinaggregation und amyloide Erkrankungen	7
1.3 Prionen	12
1.3.1 Prionkrankheiten und ihre Ätiologie	12
1.3.2 Zur Natur des Scrapie-Erregers	15
1.3.3 Zelluläre Biologie des Prion-Proteins und Molekularbiologie der Prionen	17
1.3.4 Das Prion-Modell und nicht-PrP-Komponenten von Prionen	21
1.3.5 Fragestellung	24
2. Materialien und Gerate	25
2.1 Chemikalien und Gase	25
2.2 Prion-Präparate	25
2.2.1 Prionrods (PrP 27-30) vom Scrapiestamm 263K	25
2.2.2 PrP ^{sc} (PrP 33-35) vom Scrapiestamm 263K	25
2.2.3 Prionisolat vom Scrapiestamm KML ME7	25
2.2.4 Frionisolat vom Scrapiestamm ME7 2.2.5 ScN2a-Tellivsate	25 26
2 3 Prion-Protaina	26
2.3.1 rec SHaPrP(90-231) und rec SHaPrP(29-231)	20
2.3.2 SHg-PrP ^c	26
2.3.3 CHO-PrP ^c	26
2.4 Antikörper	26
2.5 Weitere Biomaterialien und Enzyme	27
2.6 Gefäße und Verbrauchsmaterialien	28
2.7 Geräte	29
3. Experimentelle Grundlagen und Methoden	
3 1 Umgang mit Gefahrstoffen und infektiösem Material	30
3.1 Omgang nin Geranisionen ona imeknosen materialisionen and synthesion	20
3.2 Aufarbeitung von BrB 27-20-Prängrationen	
3.2.2 Präparation des Prion-Scaffold (PS)	30
3.2.3 Aufarbeitung von rec SHaPrP-Lvophilisaten	33
3.2.4 Fluoreszenzmarkierung von PrP	34
3.2.5 Synthese von Protein-Advanced Glycation Endproducts (AGEs)	34
3.2.6 Präparation von Corpora Amylacea (CA)	35
3.2.7 Synthese des Lithium-Methylsulfinylmethanid-Anions	35
3.3 Konzentrationsbestimmungen	36
3.3.1 Konzentrationsbestimmung von rec PrP mittels Absorptionsmessung	36
3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Micro-BCA [™] -Test	36
3.3.3 Konzentrationsbestimmung von SDS	36
3.3.4 Bestimmung der kritischen micellaren Konzentration (cmc)	36

3.4 Bioassavs zur Infektositätshestimmuna	••••••
3.4.1 Tübingen	
3.4.7 Rerlin	••••••
3 4 3 San Francisco	•••••••••••••••••••••••••••••
3 5 Molekularhiologische und hiochemische Methoden	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
2.5.1 DAGE	••••••••••••••••
2.5.2 Silborfärhung	•••••••••••••
3.5.2 Silbertarbong	••••••
3.5.3 Westernblot	•••••••
2.5.5.4 Doi-bioi	••••••
3.5.5 1 PrP Detaktion	
3.5.5.2 PrP-Detektion mit hoher Sensitivität	
3 5 5 3 Detektion von AGEs	
3 5 6 Blotstrinning	
3.5.7 PK-Resistenztest	•••••••••••••••••••••••••••••••••••••••
3.5.8 Glykolytische Verdauungen	
3 6 Chemische Glykognalytik	
3.6.1 Strategien der Glykognabetik	,
3.6.2 Prinzin der Komponentengnaluse mittels Alditolacetatmethode	••••••
3.6.3 Prinzin der Methylierungsgnalvse (Verbnünfungsgnalvse)	,
3.6.4 Durchführung und Prängration von GC-Standardsubstanzen	
37 Gaschromatoaraphische und massenspektrometrische Meth	oden
2.7.1 Prinzin der GC/MS	VUCII
3.7.1 FIIIZIP der GC/MG	••••••
2.7.2 Durchtunrung von GC/MS-Untersuchungen	•••••••
2.7.4 Durchführung von Nanochray ESL MS	••••••
2 9 Diaphysikalische Methoder	••••••
3.0.1 Aggregation von FTF in Vitro	••••••
3.0.2 Urcularaichroismus-spektroskopie	••••••
3.0.3 rivoreszenz-korreiations-spektroskopie (FCS)	
3.0.4 Differentiene Unrazentritugation (Losiicnkeitsspin)	••••••
3.9 Mikroskopische Methoden	•••••••••••••••••
3.9.1 Lichtmikroskopie	••••••
3.9.2 Fluoreszenzmikroskopie	••••••••••••••••••••••••
3.9.3 Elektronenmikroskopie	••••••
Ergebnisse	
4.1 Glykoanalysen des Prion-Scaffold	
4.1.1 Komponentenanalysen	•••••
4.1.1.1 Komponentenanalyse des PK-Überstandes von PrP 27-30	
4.1.1.2 Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 27-30	
4.1.1.3 Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 33-35 (PrP ^{sc})	
4.1.1.4 Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus ME7- und RML-Prionisol	aten
4.1.1.5 Komponentenanalyse des PK-Pellets aus gesundem Hamsterhirn	
4.1.1.6 Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus ScN2a-Zelllysaten	
4.1.1.7 Komponentenanalyse des PK-Pellets aus N2a-Zelllysaten	
4.1.1.8 Zusammenfassung der Komponentenanalysen	
4.1.2 Verknüpfungsanalysen	••••••
4.1.2.1 Verknüpfungsanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 33-35	
4.1.2.2 Verknüpfungsanalyse des Prion-Scaffold aus ScN2a-Zelllysaten	
4.1.2.3 Zusammenfassung der Verknüpfungsanalysen	
4.1.3 Stereochemie des Prion-Scaffold	••••••
4.1.3.1 Etablierung der Methodik	
4 1 3 2 Enzymatische Analyse der Stereochemie des Prion-Scaffold	

- -	7
4.2.1 Anfängliche Präparationen des Prion-Scaffolds	7
4.2.2 Optimierung des PK-Verdauungsschrittes	7
4.2.3 Denaturierung und Präzipitation	7
.3 Einfluss von Polysacchariden auf die in-vitro-Konversion von PrP	7
4.3.1 Einfluss von Polysacchariden auf die Sekundärstruktur und Löslichkeit von PrP.	7
4.3.1.1 Untersuchungen mit Glykogen	7
4.3.1.2 Untersuchungen mit anderen Modellsacchariden	7
4.3.1.3 Löslichkeit von PrP in Abhängigkeit von SDS bei verschiedenen Zuckern	8
4.3.2 Einflüsse von Glykogen auf die SDS-Konzentration und cmc von SDS	8
4.3.3 Einflüsse von Polysacchariden auf die PK-Resistenz von PrP-Aggregaten	8
4.3.4 Lichtmikroskopische Struktur der PrP-Aggregate	8
4.3.5 Ultrastruktur der PrP-Aggregate	8
4.3.6 Koaggregationsnachweis	8
4.3.6.1 Etablierung der Methodik	8
4.3.6.2 Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis von Koaggregation	8
4.3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Adaption des in-vitro-Konversionssysten	ns8
.4 Versuche zur Rekonstitution von Infektiosität	
4.4.1 Versuche mit rec SHa PrP(29-231) und Modellsacchariden	
4.4.7 Versuche mit CHO-PrP ^c und Prion-Scaffold	
4.4.2 Versuche mit SHa-PrP ^c sol PrP 27-30 elu Prion-Scaffold und Prionrod-spezifis	chen
Lipiden	
4.4.4 Zusammenfassuna der Infektiositätsstudien	9
5 Advanced Glycation Endproducts und Prionen	Q
4.5.1 AGE_Modifikation von BSA in vitro	······ /
4.5.2 Untersuchungen zum Einfluss von Quingerin auf AGE-Modizierungen	
4.5.2 Immunologische Detektion von AGEs in DrD-Drängraten	ر
4.5.4 Age-Modifikation von rec PrP und Auswirkung auf das Aggregationsverhalten	
	9
4.5.5 Zusammenfassung der Untersuchungen zu AGEs bei Prionen	9
iskussion	0
. I Zur Natur des Prion-Scattold	
5.1.1 Das Prion-Scaffold weist große Ahnlichkeit zu Glykogen auf	
5.1.2 Molekulare Alterung als Erklärung für die 1,6-Verknüpfungen des Prion-Scaffo	ld – Ein
Modell für die Bindung von Glykogen an Profeinaggregate	10
5.1.3 Ist das Prion-Scattold Produkt eines Abwehrmechanismus?	10
2 Die in-vitro-Konversion von rec PrP in Anwesenheit verschiedener	
olysaccharide	10
5.2.1 Die in-vitro-Konversion von PrP in Anwesenheit von Polysacchariden ist möglic	:h10
5.2.2 Entstehen PrP/Polysaccharid-Koaggregate durch keiminduzierte Aggregation?	10
.3 Rekonstitutionsexperimente mit Polysacchariden und Prion-Scaffold	11
5.3.1 Polysaccharide als notwendige Sekundärkomponenten der Infektiosität von Pr	ionen?
	11
5.3.2 Ist die Darstellung von Prionen in vitro möglich?	11
.4 AGEs und Prionen	11
5.4.1 Ein putativer Wirkungsmechanismus von Quinacrin	11
5.4.2 Die AGE-Analysen geben Hinweise auf Ort und Zeitpunkt der PrP-Umwandlung	g11
5.4.3 AGEing kann Unlöslichkeit von rekombinantem PrP induzieren	11
.5 Schlussfolgerungen und Ausblick	11
usammenfassuna	
Latvaat	۲ :۲ م 1
	12
iteraturverzeichnis	12
homikalionvorzaichnis	14

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabellen:

Tab. 1.1: Krankheiten, die mit amyloiden Proteinaggregaten einhergehen	0
Tab. 1.2: Prion-Krankheiten1	3
Tab. 4.1: Ergebnisse der Komponentenanalyse des PK-Überstandes von PrP 27-306	0
Tab. 4.2: Ergebnisse der Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 27-30 (AG Prusiner)	1
Tab. 4.3: Ergebnisse der Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 27-30 (AG Diringer)	1
Tab. 4.4: Ergebnisse der Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 33-356.	2
Tab. 4.5: Ergebnisse der Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus ME7-Prionen	2
Tab. 4.6: Ergebnisse der Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus RML-Prionen6	3
Tab. 4.7: Ergebnisse der Komponentenanalyse einer Vergleichspräparation aus gesunden Hamsterhirnen	3
Tab. 4.8: Ergebnisse der Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus ScN2a-Zelllysaten6	4
Tab. 4.9: Ergebnisse der Komponentenanalyse einer Kontrollpräparation aus N2a-Zelllysaten.6-	4
Tab. 4.10: Zusammenfassung der Komponentenanalysen	5
Tab. 4.11: Ergebnisse der Verknüpfungsanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 33-356	7
Tab. 4.12: Ergebnisse der Verknüpfungsanalyse des Prion-Scaffold aus ScN2a-Zelllysaten6	8
Tab. 4.13: Zusammenfassung der Verknüpfungsanalysen	9
Tab. 4.14: Ergebnisse der ersten Prion-Scaffold-Präparationen7.	2

Abbildungen:

Abb. 1.1: Quellen reaktiver Sauerstoffspezies und zelluläre Reaktionen	3
Abb. 1.2: Bildung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs) bei Proteinen	5
Abb. 1.3: Energielandschaf der Proteinfaltung	8
Abb. 1.4: Mögliche Zustandsformen von Proteinen	9
Abb. 1.5: Prion-Modell - Schema der Prionprotein-Only-Hypothese	17
Abb. 1.6: Zelluläres Prionprotein des Syrischen Goldhamsters (Schema)	
Abb. 1.7: Zelluläres Prionprotein und Scrapie-Isoform	20
Abb. 3.1: Präparation des Polysaccharidgerüstes aus Prionen (Prion-Scaffold)	31
Abb. 3.2: Derivatisierungsschritte der Alditolacetat-Komponentenanalyse (Übersicht)	43
Abb. 3.3: Derivatisierungsschritte der Methylierungsanalyse (Übersicht)	45
Abb. 3.4: Schematischer Aufbau eines GC/MS-Systemes	47
Abb. 3.5: El-Massenspektrum eines Tri-O-methyl-tri-O-acetyl-hexitols	48
Abb. 3.6: CI-Massenspektrum eines Tri-O-methyl-tri-O-acetyl-hexitols	49
Abb. 3.7: Schema der Elektrosprayionisation im Positiv-Modus	50
Abb. 3.8: Hybrid-Massenspektrometer API-QStar™ Pulsar i	51
Abb. 3.9: Schema des in-vitro-Konversionssystemes nach Post et al. (1998)	52
Abb. 3.10: CD-Spektren typischer Sekundärstrukturelemente von Proteinen	53
Abb. 4.1: GC/MS-Chromatogramm zur Komponentenanalyse	58

Abb. 4.2: El-Massenspektren	59
Abb. 4.3: Alditolacetatderivatisierung von N-Acetylglucosamin	60
Abb. 4.4: Partiell methylierte Alditolacetate aus 1,4- und 1,4,6-verknüpften Hexosen	66
Abb. 4.5: ESI-TOF-Massenspektren zur Stereochemieanalyse des Prion-Scaffold	71
Abb. 4.6: Abnahme des PrP-Signals während der Präparation des Prion-Scaffold	73
Abb. 4.7: Rest-PrP nach optimierter Präparation des Prion-Scaffold	74
Abb. 4.8: CD-Spektren von rec SHaPrP(29-231) in Abhängigkeit von SDS und Glykogen	75
Abb. 4.9: Aggregationsverlauf über die Zeit in Abhängigkeit von Glykogen und SDS	76
Abb. 4.10: Löslichkeit von rec SHaPrP(29-231) in Abhängigkeit von SDS und Glykogen	77
Abb. 4.11: Aggregation von rec SHaPrP(29-231) in Abhängigkeit von Glykogen	78
Abb. 4.12: CD-Spektren mit α -Methylglucosid und β -Cyclodextrin bei 0,05 % SDS	79
Abb. 4.13: Löslichkeit von PrP in Abhängigkeit von SDS-Konzentration und Sacchariden	80
Abb. 4.14: Abhängigkeit der freien SDS-Konzentration von der Einwaage-Konzentration de SDS in Anwesenheit von Glykogen	s 81
Abb. 4.15: Kritische micellare Konzentration von SDS mit und ohne Glykogen	82
Abb. 4.16: PK-Resistenz von rec PrP-Aggregaten mit verschiedenen Polysacchariden	83
Abb. 4.17: Lichtmikroskopische Struktur der PrP-Aggregate	85
Abb. 4.18: Elektronenmikroskopische Strukture von PrP-Aggregaten	85
Abb. 4.19: Fluoreszenzmikroskopische Analysen der Koaggregate von PrP und Glykogen	87
Abb. 4.20: Löslichkeit der Rekonstitutionsansätze	90
Abb. 4.21: AGE-Modifizierung von BSA in vitro	93
Abb. 4.22: AGE-Modifizierung von BSA in vitro in Anwesenheit von Quinacrin	94
Abb. 4.23: Analyse von AGEs in PrP-Präparationen und Prionen	96
Abb. 4.24: Löslichkeit von in vitro AGE-modifiziertem rec SHaPrP(29-231)	97
Abb. 5.1: Schematische Darstellung eines Glykogenmoleküls	100
Abb. 5.2: Schematische Darstellung des Glykogenabbaus	102
Abb. 5.3: Modell des Prion-Scaffold	103
Abb. 5.4: Modell der keiminduzierten PrP-Aggregation an Glykogen	110

Häufig verwendete Abkürzungen

2,2-DMP	- 2,2-Dimetoxypropan
Abb.	- Abbildung
Abs.	- Absatz
AD	- Alzheimersche Krankheit (engl. Alzheimer's disease)
AG	- Arbeitsgruppe
AGE(s)	- engl. Advanced Glycation Endproduct(s)
ALS	- Amyotrophe Laterale Sklerose
ANS	- 1-Anilinonaphthalen-8-sulfonsäure
APBD	- Adulte Polyglucosan-Körper-Krankheit (engl. adult polygl. body disease)
APS	- Ammoniumperoxodisulfat
AS	- Aminosäure(n)
Asn	- Asparagin
BSA	- Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumine)
BSE	- Bovine Spongiforme Enzephalopathie
bsp.	- beispielsweise
bzw.	- beziehungsweise
CA	- Corpora amylacea
ca.	- circa
CD	- Circular-Dichroismus
CI	- Chemische Ionisation
CJD	- Creutzfeld-Jakob-Krankheit (engl. Creutzfeld-Jakob-Disease)
cmc	- Kritische micellare Konzentration (engl. critical micellar concentration)
CML	- N ^ε -carboxymethyllysin
Cys	- Cystein
d	- Tag(e)
d.h.	- das heißt
Da	- Dalton
deion.	- deionisiert
DMSO	- Dimethylsulfoxid
DNA	- Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure (engl. []acetic acid)
EI	- Elektronenstoß-Ionisation
EM	- Elektronenmikroskop
engl.	- englisch
ER	- Endoplasmatisches Retikulum
ESI	- Elektrospray-Ionisation
et al.	- und andere (lat. <i>et alteri</i>)
EtOH	- Ethanol
eV	- Elektronenvolt
evtl.	- eventuell
fCJD	- familiäre Form der CJD

FCS	- Fluoreszenz-Korrelations- (engl. correlation) Spektroskopie
FIDA	- Fluoreszenzintensitäts-Distributionsanalys
fl	- Femtoliter
Fuc	- Fucose
$\times g$	- Vielfaches der Erdbeschleunigung
Gal	- Galactose
GC	- Gas-Chromatographie
GdnHCl	- Guanidiniumhydrochlorid
GdnSCN	- Guanidiniumthiocyanat
ggf.	- gegebenenfalls
Glc	- Glucose
GlcNAc	- N-Acetylglucosamin
GPI	- Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	- Stunde(n)
HÄ	- Hirnäquivalent(e) (1 HE PrP 27-30 entspricht etwa 100µg PrP 27-30)
HMW	- Hochmolekulargewicht (engl. high molecular weight)
HPLC	- Hochleistungs-Flüssigkeits-(engl. high performance liquid) Chromatographie
HS	- Heparansulfat
i.d.R.	- in der Regel
i.E.	- im Einzelnen
iCJD	- iatrogene Form der CJD
iD	- innerer Durchmesser
ID ₅₀	- Infektiöse Dosis bei der 50 % der Versuchtiere erkranken.
Ig	- Immunglobulin
Kap.	- Kapitel
kDa	- kiloDalton
kV	- kiloVolt
lat.	- lateinisch
m/z	- Masse/Ladung
Man	- Mannose
MDa	- Mega-Dalton
МеОН	- Methanol
min	- Minute(n)
MS	- Massenspektrometrie
Mw	- Molekulargewicht
n.	- nächste
N2a	- Neuroblastomazellen
NaAc	- Natriumacetat-Puffer
NADPH	- Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaPi	- Natriumphosphatpuffer
NF	- Nekrose-Faktor
NMR	- Nuklear-magnetische Resonanz
NP-40	- Nonidet P-40
nt	- Nukleotid(e)
PAGE	- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	- Phosphat-Salz-Puffer (engl. phosphate bufferd saline)
РК	- Proteinase K
PMAA	- Permethylierte Alditolacetate
PMSF	- Phenylmethylsulfonylfluorid
PrP 27-30	- N-terminal verkürztes PrP mit Mw=27-30 aus Prion rods
PrP	- Prionprotein (vgl. "Prionterminologie", S. VII)
PS	- Prion-Scaffold
PVDF	- Polyvinylidenfluorid
RAGE	- Rezeptor für AGEs
ROS	- reaktive Sauerstoffspezies (engl. oxygen species)
rpm	- Umdrehungen/Minute (engl. rounds per minute)
RT	- Raumtemperatur (~27° C)
S	- Sekunde
S.	- siehe
s.u.	- siehe unten
sCJD	- sporadische Form der CJD
SDS	- Natriumdodecylsulfat (engl. sodium sodecyl sulfate)
Ser	- Serin
SIM	- Selektive Ionendetektion (engl. selective ion monitoring)
SOD	- Superoxid-Dismutase
sog.	- sogenannt
Spsp.	- Spatelspitze
Tab.	- Tabelle
TBST	- Tris-Puffer Natrium Tween (engl. Tris buffer sodium Tween)
TEMED	- N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	- Trifluoressigsäure (engl. trifluoroacetic acid)
TID	- 3-(Trifluormethyl)-3-(m-iodophenyl)diazirin
TNF	- Tumor-Nekrose-Faktor
TOF	- Flugzeit (engl. time of flight)
Tris	- Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TSE	- Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
U	- enzymatische Einheit
ü. N.	- über Nacht
u.a.	- unter anderem
vCJD	- neue Variante der CJD
vgl.	- vergleiche
z.B.	- zum Beispiel
z.T.	- zum Teil
z.Zt.	- zur Zeit
ZNS	- Zentrales Nervensystem

Prion-Terminologie:

PrP: Prion-Protein

PrP^c: Zelluläre, nichtinfektiöse Variante des PrP.

PrP^{sc}: Scrapie-Isoform des PrP, welche die Hauptkomponente von Prionen ist.

rec PrP: Allg. Abkürzung für rekombinantes PrP aus E. coli, dem auf Basis des bakteriellen Expressionssystemes die N-Glykosylierungen und der GPI-Anker fehlen.

SHa-PrP^C: PrP^C des syrischen Goldhamsters (*Carassius auratus*) (s. auch Abb. 1.6, S. 18)

rec SHaPrP(29-231): rec PrP das der Aminosäuresequenz 29-231 des syrischen Goldhamsters (*Carassius auratus*) entspricht (Mehlhorn *et al.* 1996). Wird häufig als Modell für SHa-PrP^C verwendet.

rec SHaPrP(90-231): rec PrP das der Aminosäuresequenz 90-231 des syrischen Goldhamsters (*Carassius auratus*) entspricht (Mehlhorn *et al.* 1996). Wird häufig als nichtinfektiöses Pendant zum N-terminal verkürzten PrP 27-30 verwendet.

CHO-PrP^c: Rekombinantes PrP^c aus überexprimierenden CHO-Zellkulturen. CHO-PrP^c entspricht der Aminosäure 23-231 des syrischen Goldhamsters (*Carassius auratus*), es besitzt einen GPI-Anker, seine N-Glykosylierungen sind im Vergleich zu SHa-PrP^c jedoch hyperglykosyliert (Blochberger *et al.* 1997).

sol PrP 27-30 elu: Nichtinfektiöse PrP-Variante, die mittels Solubilisierung und Gelelution aus PrP 27-30 gewonnen wird. Die biophysikalischen Eigenschaften entsprechen eher denen von PrP^c (Leffers 1999).

Prion-Scaffold: Ein nach Lipid-Extraktion und intensiver PK-Verdauung von Prionrods verbleibendes, unlösliches Glucose-Polysaccharid, das 5-15 % des Erregers ausmacht (Dumpitak 1998, Appel 1999).

PrP 33-35: PrP^{Sc} aus infizierten syrischen Goldhamstern.

PrP 27-30: Hauptkomponente von Prionrods, die aus infizierten syrischen Goldhamstern gewonnen wird. Aufgrund der limitierten Proteinase K-Verdauung ist PrP 27-30 N-terminal um die Aminosäuren 23-89 verkürzt (Bolton *et al.* 1982).

Prionrods: Amyloide Fibrillen von Prionen, die durch eine spezielle Präparation inklusive limitiertem Proteinase-K-Verdauungsschritt entstehen (Bolton *et al.* 1982).

Prionen: Proteinöse, infektiöse Partikel, die Erreger der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien bzw. der Prionkrankheiten sind (Prusiner 1982).

ScN2a: Scrapie-infizierte Neuroblastoma-(N2a-)Zellen der Maus. Das ScN2a-Zelllysat ist infektiös (Butler *et al.* 1988).

Prion-Plaques: Histopathologisch beschriebene Ablagerungsform von PrP^{sc} im Hirn infizierter Organismen.

Prion-Stämme: Verschiedene natürliche Scrapie-Isolate, die in genetisch identischen Versuchstieren Prionerkrankungen induzieren, die unterschiedliche Inkubationszeiten und Läsionsmuster aufweisen. Zu ihnen gehören die Maus-adaptierten Scrapie-Stämme ME-7 und RML sowie der Hamster-adaptierte Scrapie-Stamm 263 K.

1. Einleitung

Neurodegenerative Erkrankungen zeichnen sich durch die Beteiligung und das Zusammenspiel einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse aus. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Prionkrankheiten, insbesondere der Beteiligung von Polysacchariden und alterungsassoziierten Proteinmodifikationen an den pathogenen Prozessen. Die hiermit zusammenhängenden Mechanismen haben eines gemein - sie treten auch in Assoziation mit der natürlichen Alterung auf und werden als deren Grundlage diskutiert. Daher werden im Folgenden, nach einer kurzen Einleitung zum biologischen Phänomen der Alterung, zunächst drei molekulare Mechanismen des Alterns vorgestellt, die in engem Bezug zueinander und zu den untersuchten Phänomenen stehen: Oxidativer Stress, Carbonylstress und Proteinaggregation. Die nachfolgende Einführung zu Prionen und Prionkrankheiten wird schließlich spezifisch auf die Fragestellung dieser Arbeit hinleiten.

1.1 Alterung und altersassoziierte Krankheiten

Altern ist ein "Prozess, der in Abhängigkeit von der Zeit zu charakteristischen Zustandsveränderungen führt [...]"; ein "universaler, multifaktoriell bedingter, irreversibler Vorgang, dem Belebtes und Unbelebtes unterliegen [...]" (s. Stichwort Altern, Weiss & Winkenbach 2002). In der Biologie gibt es momentan keine universale Theorie des Alterns, die alle bekannten Phänomene umfasst. Die über 300 existierenden Theorien erklären jeweils nur Teilbereiche der Alterung. Unstrittig ist jedoch, dass die sich im Verlauf der Entwicklung von Geburt bis Tod anreichernden, altersbedingten Veränderungen alle Ebenen eines Organismus umfassen: Körper, Organe, Gewebe, Zellen und sogar einzelne Biomoleküle altern. Mit zunehmendem Lebensalter führt dies einerseits zu einem Zuwachs an Individualität, andererseits schränkt es Funktionen ein, verlangsamt Prozesse und begrenzt die Lebensspanne. Beim Menschen wird angenommen, dass unter optimalen Lebensbedingungen die durchschnittliche Lebenserwartung bei Geburt auf rund 85 Jahre und die äußerste Lebensspanne auf etwa 120 Jahre limitiert sind (Olshansky *et al.* 1990).

Viele Ursachen und Mechanismen des Alterns stehen miteinander in Verbindung oder bedingen sich wechselseitig. Genetische Faktoren, Krankheitsvorgeschichte und Umwelteinflüsse scheinen ebenso wichtige Rollen zu spielen wie Abnutzungserscheinungen, oxidativ bedingte Schäden und/oder dadurch bedingte Anreicherungen von Stoffwechselendprodukten und enzymresistenten Metaboliten. Daher wird Alterung auch als "Akkumulation verschiedener schädlicher Veränderungen in Zellen und Geweben mit zunehmendem Alter, die das Risiko von Krankheit und Tod erhöhen" definiert (Harman 2001). Die Erhöhung des Todesrisikos betrifft dabei alle Individuen einer Population gleichermaßen, die Erhöhung des Risikos der Erkrankung an bestimmten altersassoziierten Krankheiten beschränkt sich jedoch auf einzelne Subpopulationen. Neben diesen altersassoziierten pathologischen Zuständen gibt es eine ganze Reihe von Erkrankungen, bei denen Alterungsprozesse beschleunigt sind oder verstärkt in Erscheinung treten. Damit verbundene pathogene Prozesse haben insbesondere dann fatale Folgen, wenn sie Gewebe betreffen, die sich nicht oder nur teilweise regenerieren können wie z.B. das Nervensystem höherer Wirbeltiere. (Zur Übersicht zum Thema Alterung siehe: Harman 1994; Wisniewski & Fragione 1996; Johnson *et al.* 1999; Harman 2001).

1.2 Molekulare Mechanismen der Alterung

1.2.1 Freie Radikale und oxidativer Stress

Eine Reihe von Stoffwechselprozessen und Umwelteinflüssen führen in biologischen Systemen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS = engl. reactive oxygen species) wie Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale oder Peroxynitrit. Ihre Bildung ist einerseits essentiell, da sie funktionelle Bedeutung als Regulatoren bei der Zellproliferation (Finkel 1998), als sekundäre Botenstoffe bei Signaltransduktionswegen (Nishikawa et al. 2000; Nemoto et al. 2000) und als Funktionsträger in der Immunabwehr (Murray et al. 1979; Adams et al. 1981) haben. In Situationen, in denen jedoch antioxidativ fungierende Zellbestandteile nicht ausreichen, um eine ROS-Überproduktion oder exogene ROS auszubalancieren, entsteht andererseits "oxidativer Stress". Hierbei können ROS in hohen Konzentrationen Funktionen als Sekundärbotenstoffe in Signalwegen des programmierten Zelltodes (Apoptose) übernehmen und - bei Überwiegen pro-apoptotischer Signale - diesen einleiten. Abbildung 1.1 auf der folgenden Seite gibt einen Überblick über die Entstehung und Funktionen der ROS. Die Hauptfolge oxidativen Stresses ist jedoch die Schädigung von Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen (Finkel & Holbrook 2000; Stadtman 2001). In diesem Zusammenhang wurde die "Freie Radikal-Theorie" der Alterung (Harman 1956) formuliert. Diese besagt, dass die durch den Metabolismus erzeugten ROS über die Lebenszeit akkumulierende Schäden verursachen, welche die Grundlage altersbedingter Veränderungen sind. Belege hierfür finden sich beispielsweise in der Akkumulation oxidativ bedingter Mutationen in genomischer und mitochondrialer DNA (Richter et al. 1988; Ames 1989; Wiseman & Halliwell 1996), der Verkürzung protektiver Chromosomenenden (Telomeren), bei welcher oxidative Schädigung Hauptursache zu sein scheint (von Zglinicki 2000) und der altersabhängigen Akkumulation oxidativ modifizierter Proteine und Proteinaggregate (Berlett & Stadtman 1997). Da alle Schädigungen zufällig auftreten, gibt es eine große Zahl beschriebener Oxidationsprodukte. Bei Proteinen beispielsweise können sowohl Peptidrückgrat, als auch Seitenketten betroffen sein und in Proteinquervernetzungen, dem Bruch der Aminosäurekette oder in Modifikationen wie Hydroxylierungen, Nitrierungen oder Carbonylierungen resultieren (Butterfield & Kanski 2001). Diese Modifikationen können zu Funktionsverlusten,



Abb. 1.1: Quellen reaktiver Sauerstoffspezies und zelluläre Reaktionen (nach Finkel & Holbrook 2000; Stadman 2001):

Die Stabilität des zellulären Wachstums und Metabolismus (Homöostase) setzt eine Balance zwischen antioxidativ und oxidativ wirkenden Faktoren voraus. Werden zu wenig reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet, kann die zelluläre Proliferation und Verteidigung gestört werden. Steigt die ROS-Konzentration zu stark an, können Zellschäden, Beschleunigung der Alterung, altersbezogene Krankheiten und Zelltod die Folge sein. (CAT = Catalase, SOD = Superoxid-Dismutase, GPx = Glutathionperoxidase, GST = Glutathiontransferase, MSR = Methionin-Sulfoxid-Reduktase, RSHPx = Thiolspezifische Peroxidase, NADPH = Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat)

Konformationsänderungen und Aggregation der Proteine (Gafni 1997; Squier 2001) führen (vgl. Abs. 1.3). Vor allem im Alter ist dies problematisch, da der Proteinumsatz mit zunehmendem Lebensalter abzunehmen scheint (Goto *et al.* 2001; Ryazanov & Nefsky 2002).

Bei Säugern und damit auch beim Menschen sind die Skelettmuskulatur, das Herz und das Gehirn besonders anfällig gegenüber der schädigenden Wirkung hoher ROS-Konzentrationen. Bei vielen degenerativen Krankheiten, die diese Gewebe betreffen, wird oxidativer Stress als Ursache oder zumindest als verstärkender Faktor diskutiert, wobei die ROS durch ihre molekülschädigende und ggf. Apoptose auslösende Wirkung zu ausgedehnten Gewebeschäden führen sollen (zur Übersicht zum Thema ROS siehe Johnson *et al.* 1999; Finkel & Holbrook 2000; Stadtman 2001; Squier 2001; Goyns 2002).

1.2.2 Advanced Glycation Endproducts und Carbonylstress

Ein weiteres molekulares Phänomen, welches ebenfalls im Zusammenhang mit altersassoziierten Veränderungen und Krankheiten diskutiert wird und in engem Zusammenhang mit den ROS steht, sind die sog. Advanced Glycation Endproducts (AGEs). AGEs sind eine hochheterogene Gruppe von Endprodukten nicht-enzymatischer Reaktionen von Zuckern oder α-Dicarbonylverbindungen mit Biomolekülen. Im klassischen Fall entstehen sie durch die Reaktionen reduzierender Zucker mit freien Aminogruppen eines Proteins, dargestellt in Abb. 1.2 auf der nächsten Seite. Dabei lagert sich zunächst die durch Additionsreaktion des Zuckers mit der Aminogruppe gebildete Schiff'sche Base zum Amadoriprodukt um, das über verschiedene Oxidationen oder Dehydrierungen zu einer Reihe reaktiver a-Dicarbonylverbindungen umgewandelt werden kann. Sowohl die Amadoriprodukte, als auch die aus ihnen folgenden α-Dicarbonyle können nun mit sich selbst, oder mit Biomolekülen wie Nukleinsäuren, Lipiden oder Proteinen zu einer Vielzahl chemisch heterogener Endprodukte, den AGEs reagieren. Im Fall der nicht-enzymatischen Glykierung von Proteinen sind sowohl Adduktmodifikationen als auch guervernetzende (crosslink)-Strukturen bekannt. Einige von ihnen, z.B. Pyrralin, entstehen nur auf nicht-oxidativem, andere, wie Pentosidin oder N^{ϵ} -Carboxymethyllysin (CML) nur auf oxidativem Weg. Ist die Glykierung mit Oxidationen verbunden, wird dies auch als "Glykoxidation" bezeichnet. Deren Produkte werden auch als Marker für oxidativen Stress genutzt. Angesichts der Vielzahl möglicher AGEs konnten bislang nur wenige sowohl strukturell aufgeklärt, als auch in vivo nachgewiesen werden. Dennoch wurde eine ganze Reihe weiterer AGEs bereits in vitro belegt und als in vivo relevant diskutiert (zur Übersicht siehe Ledl & Schleicher 1990; Ulrich & Cerami 2001).

Die grundlegende Chemie der zu den AGEs führenden Reaktionen wurde bereits 1912 beschrieben (Maillard 1912) und wird nach ihrem Entdecker häufig auch Maillard-Reaktion genannt. Lange Zeit nur als Grundlage der Bräunung und Aromaentwicklung von Speisen beim Erhitzen angesehen, fand sie hauptsächlich Anwendung in der Nahrungsmittelindustrie, z.B. bei der Herstellung von Colas, Sojasaucen und Brauereiprodukten. Seit den 70er Jahren fanden sich, zunächst hauptsächlich in der Diabetesforschung, vermehrt Hinweise auf eine biologische Relevanz der Maillard-Reaktion. Insbesondere die Erforschung der nicht-enzymatischen Glykierung von Collagen, die bei Diabetes-Patienten signifikant verstärkt ist, zeigte, dass auch in den Vergleichsgruppen AGE-Modifikationen des Collagens mit dem Alter zunahmen (Tanzer et al. 1972; Robins & Bailey 1972; Dyer et al. 1993). Viele Ergebnisse wiesen auf eine ursächliche Beteiligung der AGEs bei diabetischen Komplikationen, aber auch bei normalen, altersbedingten Veränderungen hin. Letzteres führte zur zunächst auf langlebige Proteine beschränkten "Maillard-Hypothese der Alterung", die in den folgenden Jahren jedoch allgemein erweitert wurde (Monnier & Cerami 1981; Cerami 1985; Monnier 1989). Nach wie vor ist die Frage, ob der Zusammenhang zwischen AGEs und biologischer Alterung korrelativ oder kausativ ist, Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion. Insbeson-



Abb. 1.2: Bildung von Advanced Glycation Endproducts (AGEs) bei Proteinen

In einem ersten, reversiblen Reaktionsschritt entsteht durch Addition der Aldehyd- oder Ketogruppe eines Zuckers an eine freie Aminogruppe eine Schiff'sche Base. Diese wird in einem zweiten, ebenfalls reversiblen Schritt zum sog. Amadoriprodukt (bei Aldosen) oder Heynsprodukt (bei Ketosen) umgelagert. Dieses frühe Glykierungsprodukt kann über verschiedene irreversible und z.T. radikalische Oxidationen oder Hydrolysen in verschiedene reaktive α -Dicarbonylverbindungen übergehen. Sowohl die α -Dicarbonyle als auch die Amadoriprodukte selbst können nun über ein breites Reaktionsspektrum mit freien Aminogruppen von Proteinen zu einer Gruppe heterogener Endprodukte reagieren, den AGEs.

dere die Akkumulation von AGE-Modifikationen bei langlebigen Proteinen scheint zu den normalen Alterserscheinungen zu gehören. Bei übermäßiger Bildung von AGEs können diese jedoch auch pathogene Wirkung entfalten. Beispielsweise scheint die AGE-Modifikation vaskulären Collagens zur Entstehung von Arteriosklerose, Herzkrankheiten und Nierenschäden beizutragen. Die AGE-Modifikation von Proteinen der Augenlinse kann dagegen zu Grauem Star führen (zur Übersicht siehe Ulrich & Cerami 2001; Baynes 2001). Auch bei der Alterung des zentralen Nervensystems (ZNS) und verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere solchen, die mit der Aggregation von Proteinen (vgl. 1.2.3) einhergehen, scheinen AGEs eine wichtige Rolle zu spielen. So wurde eine altersbedingte Akkumulation von AGEs in Neuronen des ZNS beschrieben (Li et al. 1995; Kimura et al. 1996). Auch die mit zunehmendem Alter vermehrt zu beobachtenden Einschlussstrukturen im menschlichen Gehirn wie Corpora Amylacea (Hirnsand) oder Lipofuscingranulae enthalten vielfach AGE-modifizierte Proteine (Kimura et al. 1998). Bei der Parkinsonschen und der diffusen Lewy-Body-Krankheit wurden AGEs in betroffenen Hirnregionen und damit verbundenen Proteindepositionen (Castellani et al. 1996) nachgewiesen. Bei der Alzheimerschen Krankheit (AD) finden sich gleich eine ganze Reihe von Hinweisen auf eine zentrale Beteiligung von AGEs am Krankheitsprozess (zur Übersicht s. Münch et al. 2002a; Bär et al. 2003; Kikuchi et al. 2003): Beispielsweise sind die beiden hauptsächlichen Proteinablagerungen (senile Plaques und Neurofibrillary tangles) bei AD mit AGEs modifiziert (Smith et al. 1994), die Konzentration AGE-modifizierter Proteine in der Rückenmarksflüssigkeit bei AD erhöht (Shuvaev et al. 2001) und akkumulieren AGEs bei einer genetisch bedingten AD-Variante in pyramidalen Neuronen (Münch et al. 2002b). In-vitro-Glykierungsstudien zeigten darüber hinaus u.a., dass die AGE-Modifikation von A β und τ die Aggregation dieser AD-assoziierten Proteine beschleunigt (Vitek et al. 1994; Ledesma et al. 1994; 1998).

Ähnlich den ROS im Falle oxidativen Stresses (s. 1.2.1) nehmen die reaktiven α -Dicarbonyle durch ihre molekülschädigende Wirkung bei der Bildung von AGEs eine Schlüsselposition ein. Analog spricht man bei einer schädlichen Überproduktion reaktiver α -Dicarbonyle und Amadori-Folgeprodukte von "Carbonylstress", der eine Reihe von Konsequenzen hat. Proteine nehmen durch AGE-Modifikationen oftmals eine gelbbräunliche Färbung an, entwickeln Fluoreszenzeigenschaften, und die Wahrscheinlichkeit von Funktionsverlusten und Fehlkonformationen nimmt zu. Die Querverknüpfung von Proteinen durch AGEs kann Unlöslichkeit sowie verstärkte Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau zur Folge haben (vgl. Abs. 1.2.3) (zur Übersicht siehe Colaco & Harrington 1994). Darüber hinaus sind glykierte Proteine oftmals zytotoxisch (Loske *et al.* 1998; Cohen *et al.* 2001; Gasic-Milenkovic *et al.* 2001), was damit zusammenhängt, dass AGEs auf verschiedene Weise oxidativen Stress modulieren können: 1.) Bei der nicht-enzymatischen Glykierung von Proteinen entstehen hohe Mengen an ROS (Mullarkey *et al.* 1990). 2.) Indem einige AGEs wie CML Übergangsmetallionen wie Cu²⁺ und Fe²⁺ in aktiver Form binden, katalysieren und amplifizieren sie die Bildung von ROS und/oder AGEs. (Qian *et al.* 1998; Saxena *et al.* 1999). Außerdem sind sie Kandidaten für die Katalyse der Lipoxidation ungesättigter Fettsäuren in Lipoproteinen, die wiederum zur Bildung reaktiver α -Dicarbonyle und so zu verstärktem Carbonylstress führen kann (Fu *et al.* 1996). 3.) AGEs können mit einer Reihe zellulärer Rezeptoren wechselwirken und über verschiedene Signalkaskaden die Freisetzung von Cytokinen wie TNF- α oder die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ -B stimulieren. Dies kann direkt oder über Aktivierung von Makrophagen oder Mikrogliazellen des Immunsystems zur Apoptose und Entstehung von weiteren ROS führen. Hervorzuheben sind hierbei die Makrophagen-Scavenger-Rezeptoren I, II, Galectin-3 und der Rezeptor für Advanced Glycation Endproducts (RAGE-Rezeptor), zu dessen Liganden auch amyloide Fibrillen (vgl. 1.2.3) gehören (zur Übersicht s. Schmidt *et al.* 2000; Singh *et al.* 2001).

Die Bildung von AGEs und ROS kann sich also in mehrfacher Hinsicht wechselseitig bedingen und verstärken. Darüber hinaus können Enzyme, die zum Abbau von oxidativem Stress und/oder Carbonylstress benötigt werden, wie Superoxid-Dismutase (SOD), Gluta-thionperoxidase oder Aldehydreductase, selbst AGE-modifiziert und dadurch inaktiviert werden (Arai *et al.* 1987; Takahadshi *et al.* 1994; Niwa & Tsukushi 2001). Der selbstpoten-zierende autokatalytische ROS/AGE-Zyklus steht außerdem noch im Wechselspiel mit der Bildung und Wirkung von Proteinaggregaten, auf die im nächsten Abschnitt ausführlich eingegangen wird. Alle drei Phänomene scheinen eng mit altersassoziierten Veränderungen und Krankheiten verknüpft zu sein, insbesondere wenn sie das ZNS betreffen. Zur Übersicht zum Thema AGEs siehe: Monnier 1990; Singh *et al.* 2001; Baynes 2001; Ulrich & Cerami 2001.

1.2.3 Proteinaggregation und amyloide Erkrankungen

Wie Abb. 1.3 auf der folgenden Seite verdeutlicht, ist die native Proteinstruktur zwar die unter physiologischen Bedingungen thermodynamisch stabilste Konformation eines Proteins, dennoch können durch Falsch- oder Umfaltung andere Konformationen angenommen werden, die kinetisch stabil sind. Bei entsprechenden Umgebungsveränderungen oder Aggregation können Fehlkonformationen sogar thermodynamisch stabiler sein als die native Struktur. Alterungsbedingte Schädigung wie sie z.B. durch Oxidation (s. 1.2.1) oder nicht-enzymatische Glykierung (s. 1.2.2) hervorgerufen werden, können die Entstehung solcher Fehlkonformationen ebenso begünstigen, wie Fehler bei der Transkription oder Translation. Falschgefaltete Proteine haben im günstigeren Fall verminderte biologische Funktionalität, im schlechteren Fall entwickeln sie pathogene Funktionen und/oder aggregieren. Daher sorgt auf zellulärer Ebene eine ganze "Kontrollmaschinerie" dafür, dass die Qualität von Transkription und Translation gesichert ist, dass Chaperone etwa 15-30 % der frisch gebildeten Proteine bei der richtigen Faltung unterstützen, und dass etwa 20-30 % aller neu synthetisierten Proteine selektiert und im Proteasom degradiert werden (zur Übersicht siehe Ellgaard L. *et al.* 1999; Wickner S. *et al.* 1999; Turner & Varshavsky 2000; Schubert *et al.* 2000). Sowohl durch



Abb. 1.3: Energielandschaft der Proteinfaltung (Dill & Chan 1997, modifiziert)

Die dreidimensionale Energieprojektion einer Proteinfaltung ähnelt oftmals einem Trichter: Faltung folgt dabei nicht einer einzelnen Route, sondern kann in einem Trichter abnehmender Energie viele verschiedene Wege zur nativen energieärmsten Struktur (N) beschreiten. Je nach Form der Landschaft können dabei diskrete Faltungsintermediate (I) als Übergangsstrukturen, aber auch als signifikante kinetische Fallen auftreten, die das Protein in einem falschgefalteten Zustand einfangen.

sinkende Syntheserate als auch verminderte Qualitätskontrolle und Degradation der Proteine nimmt mit zunehmendem Alter der Proteingesamtumsatz ab (Goto *et al.* 2001; Chen & Fernandez 2001). In diesem Zusammenhang sah die "Fehlerkatastrophentheorie" (Orgel 1963; 1970) in der Proteinbiosynthese die Grundlage altersbedingter Veränderungen und postulierte, dass translations- und transkriptionsbedingte Fehler - insbesondere bei den Enzymen der Proteinbiosynthese - eine positive Rückkopplung hervorrufen würden, die letztlich in der "Katastrophe" von Alterung und Tod mündeten. Eine aktuelle Hypothese, die Theorie der "Protein-Schadens-Katastrophe" (Ryazanov & Nefsky 2002) erweitert dieses Szenario um die zuvor beschriebenen Phänomene der Falschfaltung und molekularen Schädigungen und setzt sie in den Kontext des abnehmenden Proteinumsatzes.

Unabhängig von der Ursachendiskussion altersbedingter Veränderungen ist es unstrittig, dass mit zunehmendem Alter unlösliche, nicht- oder schwer degradierbare Proteine anzutreffen sind, die zum Teil molekulare Schäden oder Modifikationen aufweisen. Diese finden sich beispielsweise im menschlichen Gehirn in Form lichtmikroskopisch sichtbarer Überstrukturen oder Abkapselungsprodukte. Zu solchen Strukturen oder Hirneinschlüssen gehören Lipofuscin-Granulae, senile Plaques, Corpora Amylacea, Hirano-Körperchen, Neurofibrillary Tangles oder Ubiquitin-positive granuläre Strukturen. Viele dieser Hirneinschlüsse treten gehäuft bei neurodegenerativen Krankheiten auf. Alle sind jedoch auch im scheinbar gesunden, gealterten menschlichen Gehirn beschrieben und enthalten Proteinaggregate bzw. bestehen aus ihnen (zur Übersicht siehe: Anderton 1997; Kimura *et al.* 1998). Den



Abb. 1.4: Mögliche Zustandsformen von Proteinen (nach Dobson 2002)

Idealerweise faltet sich das ungefaltene Protein (U) über verschiedene teildenaturierte Intermediate (I) in die native Form (N), die ggf. durch nachfolgende Oligomerisierung ihre volle biologische Funktion ausüben kann. Unter bestimmten Bedingungen können sich jedoch auch ungefaltete oder teildenaturierte Proteine, evtl. nach Degradierung, zu ungeordneten (amorphen) Aggregaten zusammenlagern. Ebenso können sich Degradationsprodukte oder teildenaturierte Proteine ggf. über präfibrilläre Zustände zu amyloiden Fibrillen zusammenlagern.

Ablagerungen scheint darüber hinaus ein ähnlicher Mechanismus zu Grunde zu liegen: Teildenaturierte oder fehlgefaltete Proteine lagern sich zusammen und aggregieren, ggf. über verschiedene oligomere Zwischenstufen zu großen fibrillären Strukturen oder amorphen Aggregaten, die schließlich zu den lichtmikroskopisch erkennbaren "Überstrukturen" führen. Abb. 1.4 gibt einen Überblick über mögliche Strukturzustände, die wahrscheinlich jedes Protein unter geeigneten Bedingungen annehmen kann. Von besonderer Bedeutung sind hier die hochgeordneten amyloiden Aggregate, da ihr Auftreten mit vielen gewebedegenerativen Krankheiten assoziiert ist. Eine Übersicht über diese Erkrankungen gibt Tab. 1.1 auf der nächsten Seite. Der Begriff Amyloid wurde ursprünglich von Virchow geprägt, nachdem er eine von ihm im menschlichen Rückenmark und Gehirn aufgefundene Substanz, aufgrund ihrer Reaktivität mit Iod und Schwefelsäure, für eine kohlenhydrathaltige Substanz hielt (Virchow 1854). Dies wurde jedoch später durch eine Elementaranalyse widerlegt, welche den proteinösen Charakter eindeutig belegte (Friedreich & Kékulé 1859). Heute werden unter dem Begriff "Amyloid" hochstrukturierte Proteinaggregate zusammengefasst, die elektronenmikroskopisch eine faserartige Form aufweisen. Sie sind ferner dadurch charakterisiert, dass sie sich mit den Farbstoffen Thioflavin T und Kongorot anfärben lassen. Letzteres geht mit einer Verschiebung des Absorptionsspektrums zu längeren Wellenlängen (Bathochromie) und

Tab. 1.1: Krankheiten, die mit amyloiden Proteinaggregaten einhergehen.

ALS= Amyotrophe Laterale Sclerose, ANP= Atriales natriuretisches Peptid, Apo= Apolipoprotein, BB= Bunina-Körperchen, CACNA1A= Calciumkanaluntereinheit, DRPLA= Dentatorrubale-pallidolysiale Atrophie, Gln= Glutamin, HCA = Hereditäre cerebrale Amyloidose, IAPP= Inselamyloid-Polypeptid, Ig= Immunglobulin, LB= Lewy-Körperchen, MSA= Multiple systemische Atrophie, PrP= Prion-Protein, PSP= Progressive supranucleäre Paralyse, SAA= Serum Amyloid A, SAF= Scrapieassoziierte Fibrillen, SCA= Spinocerebelläre Ataxie, SOD= Superoxid-Dismutase, ZNS= Zentrales Nervensystem. (Nach Anderton 1997; Saeger & Röcken 1998; Trojanowski & Lee 1999; 2001; Merlini et al. 2001; Taylor et al. 2002; Zerovnik 2002; Soto 2003)

Krankheit	Protein/Inklusion	Lokalisation	betroffenes Organ
Adenohypophysenamyloidose	Prolactin	vorw. extracellulär	Hypophyse
ALS	SOD-1/BB	cytoplasmisch	Gehirn
Ateriosklerose-assoziierte Amyloidose	Apo A-I	vorw. extracellulär	systemisch
Diabetes mellitus Typ II	IAPP	vorw. extracellulär	Pankreas
Hämodialyseassoziierte Amyloidose	β-Microglobulin	vorw. extracellulär	systemisch
HCA (Island-Typ)	Cystatin	vorw. extracellulär	Gehirn
HCA-Angiopathie	Gelsolin	vorw. extracellulär	systemisch
Hereditäre renale Amyloidose	Fibrinogen	vorw. extracellulär	Niere
Insulin-Amyloidose	Insulin	vorw. extracellulär	Subkutan
Lysozym-Amyloidose	Lysozym	vorw. extracellulär	systemisch
Medulläres Schilddrüsenkarzinom	Calcitonin	vorw. extracellulär	Schilddrüse
Poly-Gln-Krankheiten:			
Chorea Huntington	Huntingtin	intranucleär	Gehirn
SCA 1, 2, 3, 7	Ataxine 1,2,3,7	intranucleär	Gehirn
SCA 6	CACNA1A	intranucleär	Gehirn
DRPLA			
Friedreichsche Ataxie	Frataxin	intranucleär	Gehirn
Primäre systemische Amyloidose	Ig-γ-, Ig-κ-Kette	vorw. extracellulär	systemisch
Prion-Krankeiten (vgl. Abs. 1.3)	PrP/Plaques, SAF	extracellulär &	ZNS, z.T. periphere
		cytoplasmisch	Organe
Sekundäre systemische Amyloidose	SAA	vorw. extracellulär	systemisch
Senile systemische Amyloidose	Transthyretin	vorw. extracellulär	systemisch
Synucleinopathien:			
Diffuse LB-Demenz	α,β,γ -Synuclein/LB	cytoplasmisch	Gehirn
Morbus Parkinson	α,β,γ -Synuclein/LB	cytoplasmisch	Gehirn
Tauophatien:			
Morbus Alzheimer	Aβ/SPs	extracellulär	Gehirn
	τ/NFTs	cytoplasmisch	
Down-Syndrom	AB/SPs	extracellulär	Gehirn
	tau/NETs	cytoplasmisch	
	lau/101 15	cytoplusinisen	
	α -Synuclein /LB	cytoplasmisch	
Picksche Atrophie	τ/Pick-Körperchen	cytoplasmisch	Gehirn
PSP	τ/NFTs	cytoplasmisch	Gehirn
MSA	τ/gliale Inclusionen	cytoplasmisch	Gehirn
Vorhof-Amyloidose	ANP	vorw. extracellulär	Herz

1. Einleitung

einer gold-grünen Doppelbrechung im polarisierten Licht einher. Eine Gemeinsamkeit amyloider Aggregate aber auch vieler amorpher Aggregate ist, dass die beteiligten Proteine unabhängig von ihrer nativen Konformation in einer β -Faltblattreichen Struktur aggregieren (zur Übersicht siehe Dobson 2001; Zerovnik 2002). Einzige Ausnahme bilden bislang Aggregate des hyperphosphorylierten τ -Proteins, die vorwiegend α -helikale Strukturanteile aufweisen (Sadqui *et al.* 2002).

Viele der in Tab. 1.1 aufgeführten Krankheiten sind neurodegenerative Erkrankungen, die mit Gedächtnisverlust (Demenz) oder Bewegungsstörungen (Dysmetrie) einhergehen. Vielfach treten sie sporadisch im höheren Lebensalter oder erblich bedingt auf. Aufgrund der Häufigkeit distinkter Ablagerungen, die je nach Erkrankung in spezifischen Hirnregionen auftreten, wird oft ein kausaler Zusammenhang vermutet zwischen Proteinaggregation und Untergang der Neuronen. Dies wird insbesondere dadurch gestützt, dass bei familiären Formen dieser Krankheiten verschiedene Mutationen in den Genen gefunden werden, welche für die Proteinkomponenten der fibrillären Aggregate kodieren. Diese Mutationen führen, verglichen mit sporadischen Erkrankungsformen, zum Einsetzen der Krankheit in früheren Lebensaltern, einem verschärften Krankheitsbild und einer erhöhten Zahl von Proteinaggregaten (zur Übersicht s. Hardy & Gwinn-Hardy 1998). Unabhängig von der Ätiologie der Krankheiten werden zur Zeit drei Thesen zum kausalen Zusammenhang zwischen Proteinaggregation und Neurodegeneration diskutiert (zur Übersicht siehe Soto 2003):

Die "loss-of-function"-Hypothese besagt, dass der Verlust der normalen Proteinaktivität zu einer Fehlfunktion in der Zelle führt, die schlussendlich in der Neurodegeneration mündet. Dies scheint bei der Huntington-Krankheit plausibel zu sein, da Knock-out-Mäuse, bei denen das Huntingtin-Gen ausgeschaltet wurde, in einem frühen Embryonalstadium sterben. Dies wird zusammenhängend mit der Funktion von Huntingtin als Caspase-Substrat während der Apoptose diskutiert (zur Übersicht siehe Cattaneo *et al.* 2001). Bei anderen Erkrankungen dagegen, wie z.B. der Amyotrophen Lateralen Sklerose (ALS), bei der ein Funktionsausfall einer Superoxid-Dismutase zu erhöhtem Radikalstress führen sollte, zeigen Knock-out-Mäuse jedoch eine normale Entwicklung (Reaume *et al.* 1996). Auch bei anderen Krankheiten gibt es solche Widersprüchlichkeiten, daher ist es weiterhin strittig, ob der Funktionsverlust grundlegende Ursache spezifischer Neurodegeneration ist.

Der "brain-inflammation"-Hypothese zufolge wirken die Proteinaggregate als irritierendes Agenz, das eine chronische Entzündung im Hirn hervorruft, die wiederum zu synaptischen Veränderungen und schließlich neuralem Tod führt. Für diese These spricht z.B. die auffällige Astrozytose und Mikroglia-Aktivierung, die bei vielen der obigen Krankheiten in der Nähe von Proteinaggregaten beschrieben ist. Außerdem wurden inflammatorisch wirkende Proteine als zusätzliche Begleitsubstanzen in fast allen amyloiden Aggregaten nachgewiesen (zur Übersicht s. McGeer & McGeer 1995; Wyss-Coray & Muckle 2002). Die "gain-of-toxicity"-Hypothese besagt, dass die Missfaltung und Aggregation der Proteine zu einer neurotoxischen Funktion führt. Belege für diese Hypothese finden sich in zahlreichen *in-vitro*-Studien, die zeigen, dass viele dieser Aggregate zur Apoptose von Neuronen führen. Darüber hinaus können amyloide Aggregate z.B. mit dem RAGE-Rezeptor (s. 1.2.2) wechselwirken, dessen Stimulation seinerseits wieder zu oxidativem Stress und so zu neurotoxischen Effekten führen kann (zur Übersicht s. Soto 2003). In letzter Zeit mehren sich die Hinweise, dass kleinere Vorstufen amyloider Fibrillen weitaus toxischer sind als die amyloiden Fibrillen selbst (Bucciantini *et al.* 2002). Daher wird diskutiert, ob die Bildung der amyloiden Fibrillen nicht letztendlich ein Mechanismus der Detoxifizierung ist. Hierfür spricht auch, dass solche Aggregate zumindest im Fall zytoplasmatischer Ablagerungen nicht zufällig in der Zelle auftreten, sondern Resultat eines aktiven retrograden Transportes über Mikrotubuli sind (zur Übersicht siehe: Kopito 2000).

Ein großes Problem bei der Erforschung amyloider Erkrankungen ist, dass diese entweder spontan oder familiär bedingt auftreten. Daher sind Modelle, die einen definierten, induzierbaren Beginn der pathogenen Prozesse aufweisen, sehr wichtig für die Erforschung molekularer Ursachen und deren Pathogenese. In diesem Zusammenhang sind Prionkrankheiten, die im folgenden Abschnitt vorgestellt werden, aufgrund ihrer Infektiosität ein exzellentes Modell für die Erforschung amyloider Erkrankungen. Zur Übersicht zum Thema Proteinaggregation und amyloide Erkrankungen siehe: Dobson 1999; Kopito 2000; Merlini *et al.* 2001; Soto 2003.

1.3 Prionen

1.3.1 Prionkrankheiten und ihre Ätiologie

Von allen Krankheiten, die mit der Ablagerung amyloider Aggregate einhergehen, nehmen die Prionkrankheiten bzw. transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSEs) eine Sonderstellung ein. Diese in Tabelle 1.2 auf der nächsten Seite aufgeführte Gruppe neurodegenerativer Krankheiten bei Säugern zeichnet sich dadurch aus, dass sie in Ihrer Ätiologie sowohl sporadischen, familiären aber auch infektiösen Ursprungs sein kann. Infektiosität wird zwar auch bei einigen anderen amyloiden Erkrankungen diskutiert, dennoch konnte hier bislang keine wirkliche Erregernatur nachgewiesen werden. In seltenen Fällen scheinbarer Übertragung war stets ein zusätzlicher inflammatorischer Stimulus wie z.B. gleichzeitige Gabe von Silbernitrat nötig (zu Übersicht siehe Sigurdsson *et al.* 2002). Im Falle der Prionkrankheiten vermehrt sich in den erkrankten Individuen jedoch ein nachweisbarer Erreger, der unabhängig von der ursprünglichen Ätiologie in jedem Fall infektiös ist.

Gemeinsames Charakteristikum aller Prionkrankheiten ist eine langsame Degeneration des Gehirns, die sich nach außen in Verhaltensänderungen, Dysmetrien, oftmals Sensibilitätsstörungen und beim Menschen in Demenz manifestiert. Dabei ist im betroffenen Individuum

Krankheit	Wirt	Pathogenitätsmechanismus
Kuru	Mensch	Infektion durch rituellen
		Kannibalismus
iatrogene Creutzfeld-Jakob Krankheit (iCJD)	Mensch	Infektion durch kontaminierte
		Wachstumshormone,
		Transplantate, Operationsbestecke
		etc.
neue Variante der Creutzfeld-Jakob Krankheit (vCJD)	Mensch	Infektion durch kontaminierte
		Rinderprodukte?
spontane Creutzfeld-Jakob-Krankheit (sCJD)	Mensch	Somatische Mutation oder
		spontane Konversion von $PrP^{C} \rightarrow$
	-	PrP ^{sc}
familiäre Creutzfeld-Jakob Krankheit (fCJD)	Mensch	Keimbahnmutation im PrP-Gen
Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)	Mensch	Keimbahnmutation im PrP-Gen
Fatale familiäre Insomnie (FFI)	Mensch	Keimbahnmutation im PrP-Gen
Fatale sporadische Insomnie (FSI)	Mensch	Somatische Mutation oder
		spontane Konversion von $PrP^{C} \rightarrow$
		PrP ^{sc}
Scrapie	Schaf, Moufflon	Infektion in (genetisch bedingt)
	und Ziege	anfälligen Schafen
Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)	Rinder	Infektion durch kontaminiertes
		Fleisch- und Knochenmehl oder
		somatische Mutation
Transmissible Nerz Enzephalopathie (TME)	Nerz	Infektion über Schaf oder Rind
Chronische Auszehrungs Krankheit (CWD)	Hirsche und Elch	unbekannt
Feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)	Hauskatzen und	Infektion über kontaminierte
	Wildkatzen	Rinderprodukte?
Exotische Huftier Enzephalopathie	Antilopen	Infektion über kontaminiertes
		Fleisch- und Knochenmehl

Tabelle 1.2: Prion-Krankheiten (Verändert nach Prusiner et al. 1998)

keine spezifische Immunreaktion auf den Erreger beobachtbar, da er nicht als körperfremd erkannt wird (s. 1.3.3). TSEn enden immer tödlich, wobei vom Beginn der ersten Symptome bis zum Tod mehrere Monate bis zu 1-2 Jahre vergehen. Zur Zeit existiert keine Therapie oder Impfung und eine gesicherte Diagnose ist - mit Ausnahme risikoreicher Hirnbiopsien - erst post-mortem möglich. Histopathologische Befunde sind Astrogliose (abnormale Vermehrung der Astrozyten), spongiforme (schwammartige) Läsionen im Bereich der grauen Hirnsubstanz und oftmals eine Anreicherung diffuser Proteinablagerungen des Prionproteins (PrP) z.T. in Form amyloider Plaques oder Fibrillen in oder in der Nähe von Neuronen. Die höchste Infektiosität in Abhängigkeit von der jeweiligen TSE und betroffenen Spezies auch in einigen anderen Organen nachgewiesen werden. Sofern die Ätiologie infektiös ist, können Inkubationszeiten in Abhängigkeit von der Infektionsroute zwischen mehreren Monaten bis mehreren Jahrzehnten variieren (zur Übersicht s. Belay 1999; Hörnlimann 2001; Knight & Collins 2001; Dormont 2002).

Älteste bekannte Prionerkrankung ist die Traberkrankheit (engl. Scrapie) bei Schafen und Ziegen. Bereits 1759 von Leopoldt beschrieben, wurde ihr infektiöser Charakter erst 1936 nachgewiesen, indem gesunde Schafe an Scrapie erkrankten, nachdem man ihnen Hirnmaterial von Scrapie-erkrankten Schafen intraokular injiziert hatte (Cuillé & Chelle 1936). 25 Jahre danach wurde die Übertragbarkeit von Scrapie über Artengrenzen hinweg demonstriert, indem Scrapie auf Mäuse mittels intracerebraler Inokulation übertragen wurde (Chandler 1961). Der natürliche Übertragungsweg der Scrapie scheint jedoch die orale Aufnahme infizierten Plazentamaterials durch gesunde Schafe zu sein (Pattison & Millson 1961; Pattison *et al.* 1972; Onodera *et al.* 1993).

Der infektiöse Charakter menschlicher Prionkrankheiten wurde erstmalig für die Kuru-Krankheit beschrieben (Gajdusek et al. 1966). Kuru trat vor allem bei den Frauen des Fore-Stammes in Papua-Neuguinea auf, die sich bei der rituellen Präparation und dem Verzehr von u.a. Hirnen verstorbener Angehöriger infizierten. Seit Einstellung der kannibalistischen Riten zwischen 1950 und 1960 wurden keine weiteren Neuifenktionen bekannt (Gajdusek 1977). Die häufigste humane Prionerkrankung ist jedoch die Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD). Mit rund 85 % aller Fälle ist die sporadische CJD (sCJD) die häufigste (Palmer & Collinge 1993). Sie tritt spontan, d.h. ohne erkennbare Infektion oder Keimbahnmutation, mit einer Inzidenz von 1 Fall pro 1 Million Einwohner und Jahr auf. Als Ursache werden entweder somatische Mutationen oder spontane Strukturänderungen des Prionproteins angenommen (s. 1.3.2). Das Durchschnittsalter bei Beginn der Erkrankung beträgt etwa 60 Jahre. Die familiäre CJD (fCJD) macht etwa 5-15 % aller CJD-Fälle aus. Hierbei wird in einem autosomal-dominanten Erbgang eine genetische Prädisposition für diese Krankheit an die nächste Generation weitergegeben (zur Übersicht siehe: Brown 1992; Knight & Collins 2001). Verschiedene Mutationen des krankheitsassoziierten Prionproteins (PrP) sind bekannt, die mit der Manifestation der fCJD einhergehen. Die wenigsten CJD-Fälle (< 1 %) sind infektiöser Natur. Zu diesen gehört die iatrogene CJD (iCJD) und die variante Form der CJD (vCJD), die später behandelt wird. Die iCJD ist auf medizinische Unfälle zurückzuführen, die ihre Ursache in der Nutzung unzureichend dekontaminierter Operationsbestecke, der Verwendung kontaminierter Dura-materoder Korneatransplantate oder kontaminierter Wachstumshormonpräparate fand. Bedingt durch die langen Inkubationszeiten der iCJD können auch heute noch Fälle auftreten, die vor Jahrzehnten durch Unkenntnis der Erregerstabilität (s. 1.3.3) verursacht wurden.

Aufsehen erregte in den vergangenen Jahren jedoch eine andere Prionkrankheit, die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE), im Volksmund auch "Rinderwahnsinn" genannt. 1986 begann im Vereinigten Königreich (UK) eine Epidemie dieser bis dato unbekannten Krankheit bei Rindern (Wells *et al.* 1987), die ihren Höhepunkt 1992/1993 fand. Als Ursprung von BSE wird einerseits der Scrapieerreger (Wilesmith & Wells 1991), andererseits eine spontane Mutation bei wenigen Rindern (Phillips *et al.* 2000) diskutiert. Unabhängig vom Ursprung gilt als Verbreitungsweg der Rinderepidemie die Verfütterung von Fleischund Knochenmehl (engl. meat and bonemeal – MBM) an Rinder als wahrscheinlich. Ende der 70er Jahre wurden die Temperaturen beim Herstellungsprozess von MBM aus ökonomischen Gesichtspunkten gesenkt, unwissentlich, dass auf diese Weise der Erreger nicht mehr

1. Einleitung

ausreichend inaktiviert werden konnte (Prusiner 1997). Mittlerweile werden in vielen Ländern Europas aufgrund breit angelegter Tests BSE-Fälle zumeist vor Ausbruch der Krankheit aufgedeckt. Allein in Deutschland wurden seit Einführung der Tests im Dezember 2000 bislang 248 BSE-Fälle bestätigt (Quelle: Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, www.verbraucherministerium.de, Stand: 03. Juni 2003).

Die Beschreibung einer varianten CJD-Form (vCJD) im UK sorgte 1996 für Aufsehen, da sie auf einen Zusammenhang mit der BSE-Epidemie und dem Verzehr von infiziertem Rinderprodukten hinwies (Will et al. 1996). Erhärtet wurde diese These durch eine ganze Reihe von Befunden. So gleicht das neuropathologische Erscheinungsbild von mit BSEinfizierten Makakken demjenigen von vCJD-Erkrankten (Lasmezas et al. 1996). Nach Übertragung von BSE und vCJD auf Mäuse konnten identische Inkubationszeiten, neurologische Symptome und histopathologische Veränderungen beobachtet werden (Hill et al. 1997; Bruce et al. 1997; Scott et al. 1999a). Außerdem stimmen die Glykosylierungsmuster des Erregers von vCJD eher mit denen von BSE als mit denen von sCJD überein (Collinge & Rossor 1996). Im Vergleich zur "klassischen" sCJD ist das Durchschnittsalter der vCJD-Patienten mit 28 Jahren im Vergleich zu 60 Jahren weitaus niedriger. Allein im UK starben bisher 131 Menschen an vCJD (Quelle: UK Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit, www.cjd.ed.ac.uk, Stand: 29. Mai 2003), außerdem gab es sechs vCJD-Fälle in Frankreich und jeweils einen in Irland, Italien, Kanada und den USA (Quelle: World Health Organization, www.who.int, Stand: November 2002). Zur Zeit ist unklar, ob das Maximum der zu erwartenden vCJD-Fälle bereits überschritten ist, oder ob die bisherigen Zahlen den Beginn einer größeren Epidemie markieren. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen erscheint eine realistische Prognose schwierig. Aktuelle Schätzungen beziffern szenarienabhängig die noch zu erwartenden vCJD-Fälle auf 50 bis zu einigen Tausend (Fergusson et al. 2002).

Eine Einführung in das Thema Prionen und Prionkrankheiten geben folgende Monographien: Prusiner (*Ed.*) 1999; Hörnlimann *et al.* (*Eds.*) 2001.; Caughey (*Ed.*) 2001a.

1.3.2 Zur Natur des Scrapie-Erregers

Die Natur des TSE-Erregers, insbesondere der Scrapie gab lange Zeit Rätsel auf und ist auch heute noch nicht gänzlich unumstritten (zur Übersicht siehe: Prusiner 1996; Brown & Bradley 1998; Hörnlimann 2001; Riesner 2001a; 2001b). Nach dem Beweis von Infektiosität durch Übertragung (Cuillé & Chelle 1936) und aufgrund der Eigenschaften des Erregermaterials wurde die Idee eines "Filter-passierenden Virus" (Wilson *et al.* 1950) allgemein angenommen und die Krankheit als "slow virus disease" klassifiziert (Sigurdsson 1954). Dies änderte sich 1967 als Alper *et al.* veröffentlichten, dass der Scrapieerreger resistent gegenüber UV- und ionisierender Strahlung sei und sich der Erreger ggf. ohne Hilfe von Nukleinsäuren repliziere. Eine Vielzahl von Hypothesen bezüglich der Natur des Erregers wurde daraufhin veröffentlicht. Unter anderem sollte es ein selbstreplizierendes Protein sein (Griffith 1967;

Pattison & Jones 1967), ein selbstreplizierendes Oligo- oder Polysaccharid (Field 1967), eine durch Veränderung der exponierten Zuckerseitenketten verursachte pathogene Anordnung der Membran (Gibbons & Hunter 1967) oder ein durch eine übertragene Substanz aktivierter DNA-Subvirus (Adams & Field 1968). Andere Hypothesen sahen den Scrapieerreger als Viroid (Diener 1972), als Virino (Dickinson & Outram 1988) oder einfach weiterhin als Virus, nur eben ein "unkonventionelles" (Gajdusek 1977).

Anfang der 80er Jahre zeigten Prusiner und Mitarbeiter, dass sich keine nennenswerten Veränderungen der Infektiosität ergaben, wenn man den Scrapieerreger nukleinsäuremodifizierenden oder zerstörenden Behandlungen unterzog. Behandelte man ihn aber mit proteinmodifizierenden oder -zerstörenden Methoden, so ging dies mit einem Verlust der Infektiosität einher (Prusiner et al. 1981a; 1981b; Diener et al. 1982; Bellinger-Kawahara et al. 1987). Prusiner formulierte daraufhin 1982 die These, der Erreger der Scrapie sei ein proteinartiges infektiöses Partikel und nannte ihn "Prion", abgeleitet aus dem engl. "proteinaceous infectious particel" (Prusiner 1982). Mit der Entwicklung neuer Aufreinigungsmethoden, welche u.a. eine limitierte Proteinase-K-Verdauung beinhalteten (Prusiner et al. 1980; 1982; 1983), konnte als Hauptkomponente des Erregers das sog. Prion-Protein (PrP) mit einem Molekulargewicht von 27-30 kDa (PrP 27-30) isoliert werden. (Eine Erläuterung der Prionterminologie findet sich auf Seite VII am Anfang dieser Arbeit.) Diese auch "Prion rods" genannte Präparation gilt bis heute als die sauberste Aufreinigung des Erregers. Der Name stammt daher, dass ultrastrukturell fibrilläre Strukturen erkennbar sind, die alle Charakteristika amyloider Fibrillen (s. 1.2.3) erfüllen (Bolton et al. 1982). Die Aminosäuresequenzierung ergab, dass es sich bei PrP um ein Protein handelt, welches durch ein wirtseigenes Gen codiert wird (Oesch et al. 1985; Basler et al. 1986). Zwischen der natürlichen, zellulären Variante (PrP^C) und der im Scrapieerreger gefundenen Variante (PrP^{sc}) gibt es jedoch biophysikalische Unterschiede, die in Abs. 1.3.3 ausführlich beschrieben werden. Diese lassen sich dadurch erklären, dass es sich bei PrP^C und PrP^{Sc} um zwei unterschiedliche Konformationen desselben Proteins handelt. In seiner einfachsten Form, der sog. "Prion-Protein-only-Hypothese", besagt das Prion-Modell, dass PrP^{sc} das infektiöse Agenz sei, welches in einem autokatalytischen Zyklus PrP^c in PrP^{Sc} umzuwandeln vermag und so Prionerkrankungen auslösen kann. Dies ist in Abbildung 1.5 auf der folgenden Seite dargestellt.

Obwohl die Prion-Hypothese, für die Prusiner 1997 den Nobel-Preis bekam, heute die meiste Akzeptanz findet, wird vereinzelt nach wie vor die Virus-Hypothese diskutiert. Ihrer aktuellen Version zufolge ist PrP^{sc} lediglich das Resultat einer Virus-Infektion und wird zusammen mit dem "Scrapie-Virus" aufgereinigt (zur Übersicht s. Diringer 2001; Narang 2002). Dennoch konnte bis heute keine Scrapie-spezifische Nukleinsäure aufgereinigt werden. Vielmehr wurde nachgewiesen, dass auf eine infektiöse Einheit des Scrapie-Erregers Nukleinsäu-



Abb. 1.5 : Prion-Modell - Schema der Prionprotein-Only-Hypothese

Das Prnp-Gen wird transkribiert, translatiert und schließlich als zelluläres Prionprotein PrP^c auf der Zellmembran exprimiert und später innerhalb der Zelle degradiert. PrP^c kann spontan, oder im Infektionsfall durch exogenes PrP^{sc}, in seine pathogene Isoform umgewandelt werden, wobei der Ort der PrP^{sc}-Bildung noch unklar ist. Dieses neugebildete PrP^{sc} kann nun in einem autokatalytischen Kreislauf andere PrP^c-Moleküle in PrP^{sc} überführen.

ren länger als 50-80 Nukleotide (nt) und somit Viren kodierender Kapazität (i.A. >3.000 nt) oder Viroide (~300 nt) ausgeschlossen angesehen werden können (Meyer *et al.* 1991; Kellings *et al.* 1992; Kellings 1995).

1.3.3 Zelluläre Biologie des Prion-Proteins und Molekularbiologie der Prionen

PrP^c ist ein zelluläres Protein, das auf der Zellmembran von Neuronen und Gliazellen des ZNS und zu geringeren Konzentrationen in vielen anderen Geweben exprimiert wird. Das einzelne PrP-kodierende Gen (Prnp) setzt sich je nach Spezies aus zwei oder 3 Exons zusammen und besitzt nur einen open reading frame, der für etwa 250 Aminosäuren kodiert. Prnp ist bei Säugern hochkonserviert und mittlerweile auch für verschiedene Arten aus allen Chordaklassen beschrieben (zur Übersicht siehe Schätzl 2001).

Das Genprodukt PrP^c wird in das raue endoplasmatische Retikulum (ER) translatiert und dort prozessiert. Das PrP^c des Syrischen Goldhamsters (SHa-PrP^c), welches in Abbildung 1.6 auf der nächsten Seite dargestellt ist, hat als Primärtranskript eine Länge von 254 Aminosäuren (AS). N-terminal kodiert eine 22 AS umfassende Sequenz für die Prozessierung im rauen ER, C-terminal eine 23 AS-Sequenz für die Addition eines Glykophosphatidylinositol-(GPI)-Ankers. Beide Signalpeptide fehlen im maturierten PrP. Nach der Translation wird im ER der GPI-Anker an AS-Position 231 (Ser) angehängt, eine Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren 179 und 214 ausgebildet und die Positionen 181 und 197 (beide Asn) mit N-Oligosaccharidseitenketten vom "High-Mannosetyp" ausgestattet. Die beiden Glykosylierungsstellen sind im maturierten PrP nicht immer besetzt, so dass hier ein heterogenes



Abbildung 1.6: Zelluläres Prionprotein des Syrischen Goldhamsters (Schema)

α-helikale Struktur: AS 145-153, 166-168, 172-194, 200-226 (grüner Kasten); β-Faltblatt-Struktur: AS 129-133, AS 163-160; fünf Octapeptide: AS 51-91; Disulfidbrücke: AS 179-214; N-Glykosylierungen: AS 181, 197; GPI-Anker: AS 231; Aminosäurefarbcode: negativ geladene (saure) AS = rot, positiv geladene (basische) AS = blau, neutral hydrophile AS = violett, hydrophobe AS = braun (bei pH 7). 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.

Glykosylierungsmuster entsteht. Nach weiterer Prozessierung im Golgiapparat, bei der die N-Glykosylierungen und wahrscheinlich auch der GPI-Anker sialiert werden, wird das fertige PrP^c mit einem Molekulargewicht von 33-35 kDa an die Zelloberfläche transportiert und in caveolae-ähnlichen Domänen verankert (zur Übersicht siehe: Prusiner *et al.* 1999a; Lehmann *et al.* 1999; Harris 2001; Fournier 2001). Aus Zellkulturstudien ging hervor, dass der gesamte Biosynthese- und Expressionsvorgang nicht mehr als 1 h benötigt, bei einer durchschnittlichen Halbwertszeit des PrP^c auf der Zelloberfläche von 3-6 h (Caughey *et al.* 1989; Borchelt *et al.* 1990). Weitere Studien zeigten, dass etwa 10 % der PrP^c-Moleküle posttranslational weiter prozessiert werden. Dies kann auf zwei Arten geschehen: Einerseits kann im GPI-

1. Einleitung

Anker geschnitten werden, was PrP^{C} ins extrazelluläre Medium entlässt, andererseits kann proteolytisch in der konservierten hydrophoben Region (AS 113-128) geschnitten werden (Tagliavini *et al.* 1992; Borchelt *et al.* 1993; Harris *et al.* 1993). Die physiologische Bedeutung dieser posttranslationalen Prozessierungen ist bislang unbekannt. Anscheinend finden diese Prozessierungen in einer cholesterinreichen Domäne der Plasmamembran (Taraboulos *et al.* 1995), bzw. einem daraus entstehenden endozytotischen Kompartiment (Harris 1999) statt. Zwischen diesem Kompartiment und der Zellmembran zykliert PrP^{C} innerhalb von ca. 60 min, wobei etwa 1-5 % des PrP^{C} im GPI-Anker geschnitten und dann exozytotisch entlassen werden (Shyng *et al.* 1993).

Auch die eigentliche biologische Funktion von PrP^C ist noch nicht geklärt. Der hohe Konservierungsgrad des Prnp lässt eine wichtige Funktion vermuten. Prnp^{0/0}-Mäuse entwickeln sich jedoch normal und sind nicht anfällig gegenüber einer Infektion mit Prionen. Lediglich leichte circadiane Rhythmusstörungen sind zu beobachten (Büeler *et al.* 1992; Manson et al 1994). Die Octarepeatsequenz des PrP (SHa-PrP: AS 51-91) bindet unter physiologischen Bedingungen fünf bis sechs Cu²⁺-Ionen (Brown *et al.* 1997; Miura *et al.* 1999), weswegen PrP^C eine wichtige Funktion bei der Kupferhömeostase von Neuronen zugesprochen wird (zur Übersicht siehe: Herms & Kretzschmar 2001). In diesem Zusammenhang wurde auch eine, der SOD ähnliche, radikalabbauende Wirkung von PrP^C beschrieben (Brown *et al.* 1999; Wong *et al.* 2000), die z. Zt. aber noch strittig ist (Waggoner *et al.* 2000). Ergebnisse verschiedener Wechselwirkungsstudien deuten darüber hinaus auf eine Funktion von PrP^C bei Zelladhäsionsprozessen (Schmitt-Ulms *et al.* 2001) bzw. bei verschiedenen Signaltransduktionswegen hin (Mouillet-Richard *et al.* 2000; Hundt *et al.* 2001; Gaucynszki *et al.* 2002; Martins *et al.* 2002).

Unabhängig von seiner Funktion konnten in Bezug auf die chemische Zusammensetzung PrP^{C} bislang keine Unterschiede zum PrP^{Sc} , der Hauptkomponente von Prionen aufgedeckt werden. Sowohl die Aminosäurekomposition als auch die Zusammensetzung der N-Glykosylierungen sind identisch (Stahl *et al.* 1993; Rudd *et al.* 1999; 2001). Da allerdings etwa 10⁵ PrP^{Sc} -Moleküle eine infektiöse Einheit ausmachen (Prusiner 1996), kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige wenige Moleküle eine andere Chemie aufweisen. Nachweisbare Unterschiede zwischen PrP^{Sc} und PrP^{C} finden sich in Bezug auf ihre biogenen und physikalisch-chemischen Eigenschaften (zur Übersicht siehe Riesner 2001c). So sind Prionen pathogen, neurotoxisch und infektiös. Diese Eigenschaften sind mit PrP^{Sc} , nicht jedoch mit PrP^{C} korrelierbar. Beide Isomere unterscheiden sich in ihrer Sekundärstruktur. So beträgt der α -helikale Anteil von PrP^{C} etwa 42 % bei einem β -Faltblattanteil von rund 3 %, während bei PrP^{Sc} der α -helikale Anteil knapp 30 % ausmacht bei einem β -Strukturanteil von ca. 43 % (Pan *et al.* 1993; Safar *et al.* 1993). Die PrP^{C} -Struktur wurde mittels NMR-Spektroskopie anhand rekombinant hergestellten PrPs (rec PrP) aufgeklärt. Wie in Abbildung 1.7.A auf der nächsten Seite dargestellt ist, weisen rec SHaPrP(90-231) und rec SHaPrP(29-231) einen



Abbildung 1.7: Zelluläres Prionprotein und Scrapie-Isoform

A: NMR-Struktur des rekombinanten SHaPrP(90-231) (Liu *et al.* 1999, modifiziert), die als Modell für die PrP^c-Struktur gilt. AS 125-231 bilden den Kernstrukturbereich, AS 90-124 bilden einen flexiblen Schwanz. **B:** Auf Grundlage elektronenmikroskopischer Daten gewonnenes Modell des SHa-PrP^{sc}. Das gezeigte Monomer ist Teil eines Trimers aus Dimeren. **C**₁ und **C**₂ zeigen die Seitenansicht und die Aufsicht auf das Modell dieses SHa-PrP^{sc}-Hexamers (Wille *et al.* 2002, modifiziert).

flexiblen, scheinbar unstrukturierten Schwanz (AS 29-125), drei α-Helices (AS 145-153, 172-194 und 200-226), eine kurze α -helikale Domäne (AS 166-168) sowie zwei gepaarte β -Faltblattdomänen (AS 129-133 und 160-163) auf (James et al. 1997; Donne et al. 1997; Liu et al. 1999). Diese Molekülarchitektur geht im wesentlichen mit der NMR-Struktur einher, die von Wüthrich und Mitarbeitern zuvor für das rekombinant hergestellte PrP der Maus beschrieben wurde (Riek et al. 1996; 1997). Für PrP^{Sc} gibt es bislang keine hochauflösende Struktur. Die Abbildungen 1.7.B, C1 und C2 zeigen ein Modell, dass auf Basis elektronenmikroskopischer Daten aus 2D-Kristallen von PrP 27-30 aufgestellt wurde. Hierbei sollen sechs PrP^{Sc}-Monomere mit β-helikaler Struktur ein Trimer aus Dimeren bilden, welches einem 2D-Kristall entspricht (Wille et al. 2002). Ferner zeigen PrP^C und PrP^{Sc} auch bezüglich Löslichkeit ein unterschiedliches Verhalten. So ist PrP^c bei saurem pH bzw. in milden Detergenzien löslich, während PrP^{sc} unter diesen Bedingungen unlöslich ist. PrP^c tritt monomer auf, während PrP^{sc} in Aggregaten polymer vorliegt. Auch gegenüber proteolytischen Enzymen zeigen beide Isoformen unterschiedliches Verhalten: In Gegenwart niedriger Konzentrationen proteolytischer Enzyme wie Proteinase K (PK) wird PrP^C rasch abgebaut, während PrP^{Sc} unter diesen Bedingungen stabil bleibt. Es wird lediglich von PrP 33-35 N-terminal zu PrP 27-30 verkürzt, behält aber alle vorgenannten Eigenschaften (McKinley et al. 1991).
Trotz dieser Unterschiede lassen sich allein auf Basis von PrP^{Sc} nicht alle Eigenschaften von Prionen und Prionkrankheiten erklären (zur Übersicht siehe Aguzzi & Weissmann 1997). So zeigte sich bei Versuchen CJD auf Mäuse zu übertragen, dass es zwischen verschiedenen Spezies Barrieren bei der Übertragung gibt, die nicht ohne weiteres übersprungen werden können (Telling et al. 1994). In diesem Zusammenhang wird ein artspezifischer "Faktor-X" diskutiert, der als chaperonartiger Interaktionspartner bei der Umfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc} eine wichtige Rolle zu spielen scheint (zur Übersicht siehe Scott et al. 1999b, Prusiner et al. 1999; Safar et al. 2001). Dabei soll die Qualität der Bindung zwischen Faktor X und PrP^c speziesspezifisch sein. Darüber hinaus zeichnen sich einige Scrapie-Isolate unterschiedlicher Herkunft dadurch aus, dass sie in genetisch identischen Wirten unterschiedliche Inkubationszeiten und Verteilungsmuster von Läsionen und Proteinablagerungen im Hirn bewirken. Man spricht daher von "Scrapie-Stämmen". Die Existenz dieser Stämme dient auch heute oftmals noch als Argument für die Virus-Hypothese, obwohl mittlerweile gezeigt wurde, dass jeder Erreger dieser Stämme PrP^{Sc} mit spezifisch anderer Konformation enthält (Caughey et al. 1998; Safar et al. 1998; Clarke et al. 2001). Eine spezifische, transferierbare PrP-Konformation bzw. ein weiterer sog. "Faktor Y" werden als Erklärung für das Phänomen der Scrapie-Stämme diskutiert. "Faktor Y" soll in diesem Zusammenhang die spezifische PrP^{Sc}-Ablagerung und zumindest teilweise die neuronale Vakuolisierung kontrollieren (Prusiner 1996).

1.3.4 Das Prion-Modell und nicht-PrP-Komponenten von Prionen

Ein Beweis der "Prion-Protein-only-Hypothese" wäre auf zwei Arten denkbar. Eine Möglichkeit bestünde darin den Erreger in Lösung zu bringen und auszudünnen. Nach Fraktionierung wäre eine infektiöse Lösung, die einzig PrP^{sc} als Bestandteil hat, Beweis der Hypothese. Versuche hierzu (Riesner et al. 1996) zeigten, dass sich PrP 27-30 aus Prionrods mittels niedriger Konzentrationen des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bei gleichzeitiger Ultrabeschallung in lösliche Oligomere überführen ließ. Diese löslichen Oligomere zeigten jedoch eine PrP^C-ähnliche α -helikale Sekundärstruktur und beinhalteten nur noch eine kleine Menge Infektiosität. Diese Restinfektiosität wurde jedoch auf verbliebene PrP^{Sc}-Aggregate im Solubilisat zurückgeführt, da nach Aufkonzentrierung und Gelelution des solubilisierten PrP 27-30 (sol PrP 27-30 elu) keine Infektiosität mehr detektierbar war (Leffers 1999). Eine alternative Beweisstrategie bestünde darin, nichtinfektiöses PrP durch spezielle Behandlungsmethoden in infektiöses PrP^{sc} umzuwandeln. Dies wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen mit rekombinant hergestelltem PrP, mit PrP^C, mit verschiedenen PrP-Peptidfragmenten und auch mit solubilisiertem PrP 27-30 versucht (Kocisko et al. 1994; Caughey et al. 1995; 1997; Kaneko et al. 1995; 1997; Post 1998; Hill et al. 1999; Post et al. 2000). Obwohl vielfach Charakteristika von PrP^{Sc} wie Aggregation, Bildung amyloider Fibrillen, Unlöslichkeit, PK-Resistenz, erhöhter ß-Strukturanteil und sogar Neurotoxizität erreicht wurden, zeigte bislang keiner dieser Ansätze in vitro generierte Infektiosität. Im Rahmen zahlreicher Studien wurde belegt, dass mit Ausnahme des erhöhten β -Faltblattanteils die vorgenannten Eigenschaften von Prionen nicht unbedingt mit Infektiosität korrelieren müssen (zur Übersicht siehe Shaked *et al.* 1999; Wille *et al.* 2000). Die Erklärung, dass bisherige Versuchsbedingungen einfach nicht zur infektiösen PrP-Konformation geführt haben, scheint daher naheliegend. Dennoch könnten die ausgebliebenen Erfolge auch damit erklärt werden, dass *in vitro* generierte Infektiosität unterhalb der Detektionsgrenzen lag, dass sie zu schnell vom Ort der Injektion entfernt und ausgedünnt wurde (sog. Clearance-Rate), oder auch, dass die Prion-Hypothese generell falsch ist. Da für letztere zu viele Argumente sprechen, bestünde auch die Möglichkeit, dass ihre einfachste Interpretation, die "Prionprotein-only-Hypothese" inkorrekt ist, und eine essentielle Komponente von Prionen fehlt.

In diesem Zusammenhang wurde bereits erwähnt, dass Nukleinsäuren >50-80 nt als Bestandteil einer infektiösen Einheit von Prionen ausgeschlossen wurden (s. Abs. 1.3.2). Andere Proteine als PrP wurden jedoch beschrieben. So wiesen massenspektrometrische Untersuchungen und Sequenzierungen darauf hin, dass niedrige Mengen von Actin, und einem unbekannten Protein mit Ähnlichkeit zum Drosophilaprotein "daughterless" in Prion-Präparationen vorhanden sind (Stahl et al. 1993, Baldwin 2001). Darüber hinaus wurden immunohistochemisch sowohl die Co-Lokalisation von Proteinen des Komplementsystems (Ishii et al. 1984) als auch die von Apolipoprotein-E (Apo-E) (Nakamura et al. 2000) mit PrP^{Sc}-Ablagerungen nachgewiesen. Für erstere wurde eine Beteiligung bei der Ausbreitung des Erregers im erkrankten Individuum beschrieben (Klein et al. 2001; Mabbot et al. 2001). Für letzteres wird diskutiert, ob es sich dabei um Faktor X handeln könne (Wisniewski et al. 1998), was jedoch strittig ist (Chapman et al. 1998). Lipide wurden ebenfalls als Prionbestandteil beschrieben. Hierbei wurden Cholesterol, Galactosylceramid und Sphingomyelin in PrP 27-30-Aufreinigungen mittels Dünnschichtchromatographie und Massenspektrometrie bestimmt, allerdings enthielten Prionpräparate höherer Infektiosität weniger Lipide als solche niedriger Infektiosität (Klein et al. 1998; Appel 1999). Eine essentielle Bedeutung für die Infektiosität von Prionen wurde als unwahrscheinlich angesehen, allerdings wurde kürzlich eine Sphingolipid-Bindungsdomäne in PrP für AS 179-214 beschrieben, die auf eine Funktion der Lipide hindeutet (Mahfoud et al. 2002). Als weitere Bestandteile von Prionen wurden sulfatierte Glykosaminoglykane (GAG) nachgewiesen (Snow et al. 1989; Schumacher et al. 1991; McBride et al. 1998). Mittlerweile ist die direkte Bindung von verschiedenen GAGs an PrP^c vielfältig belegt (Gabizon et al. 1993; Shyng et al. 1995; Gonzalez-Iglesias et al. 2002; Pan et al. 2002), und es ist bekannt, dass PrP mehrere unabhängige Bindedomänen für GAGs (AS 23-52, 53-93 und 110-128) enthält (Warner et al. 2002). Dies wird jedoch hauptsächlich in Zusammenhang mit einer putativen zellulären Funktion von PrP^C als GAG-Rezeptor mit Signaltransduktionsfunktion diskutiert (vgl. Abs. 1.3.3).

Andere Saccharidkomponenten als die der N-Glykosylierungen und des GPI-Ankers von PrP spielten in der neueren Literatur keine Rolle, auch wenn sich Hinweise auf eine solche Prionkomponente in älteren Veröffentlichungen finden ließen. So wurden Prionrods nach Hydrolyse mit Trifluoressigsäure (TFA) für 4 h bei 100 °C mittels HPLC u.a. auf Kohlenhydrate untersucht. Dabei wurden Fucose, Galactosamin, Glucosamin, Galactose, Mannose, Sialinsäure und Glucose in unterschiedlichen Anteilen gefunden. Mit einer Ausnahme lassen sich alle diese Zucker durch die Zuckerkomposition der Oligosaccharidseitenketten (Endo et al. 1989, Rudd et al. 1999; 2001; 2002) und des GPI-Ankers (Stahl et al. 1992) erklären. Glucose jedoch, die im molaren Verhältnis von 1 pro mol PrP 27-30 gefunden wurde, ist kein Bestandteil dieser kovalenten PrP-Modifikationen (Safar et al. 1990). In einer weiteren Arbeit wurden Prionrods mit 3-(Trifluormethyl)-3-(m-iodophenyl)diazirin (TID) behandelt, einem Marker für hydrophobe organische Strukturen. Nach diskontinuierlicher SDS-PAGE wurde ein Hauptprodukt der TID-Markierung identifiziert, welches zwischen Sammel- und Trenngel verblieb und sich von PrP 27-30 unterschied. Diese TID-X genannte Substanz war resistent gegenüber der Behandlung mit PK, aber partiell empfindlich gegenüber Behandlungen mit NaOH, alkalischen Hydroxylaminen und Salpetersäure. Gelfiltration nach Denaturierung mit Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl) deutete auf eine Molmasse von mehr als 10⁶ Da hin. Dagegen zeigten Chromatographien in einem Puffer mit GdnHCl und dem Detergenz Nonidet P-40 (NP-40) eine Molmasse von knapp 60 kDa an. Daher wurde TID-X als eine aggregierte Substanz gedeutet, die mit einem GdnHCl/NP-40-Puffer reversibel dissoziiert werden kann. TID-X war anfärbbar mit Silberfärbung. Mittels Aminosäureanalytik konnten nur noch Spuren von Aminosäuren in TID-X nachgewiesen werden (Stahl et al. 1993). Eine dritte Arbeit zeigt, dass in Prionrods die über längere Zeit mit hohen Konzentrationen an PK verdaut werden, die Menge an PrP um zwei Zehnerpotenzen sinkt, wobei die Infektiosität um etwa 10³ abnimmt. Dennoch bleibt die ultrastrukturelle Stäbchenform erhalten (McKinley 1986). In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, dass die auch "ghostrods" genannten Strukturen eine "Gerüstsubstanz" der Prionrods enthalten, die gegenüber der PK-Behandlung resistent sei. Alle drei Arbeiten können als Hinweise auf eine polymere Kohlenhydratsubstanz gewertet werden.

Im Verlauf einer Doktorarbeit am Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurden weitere Hinweise auf eine solche Kohlenhydratkomponente gefunden (Appel 1999), die schließlich im Rahmen einer Diplomarbeit nach Etablierung und Weiterentwicklung entsprechender glykoanalytischer Methoden (Dumpitak 1998) analysiert werden konnte. Es zeigte sich, dass Prionrods zu etwa 5-15 % ein Glucosehomopolymer enthielten, dessen Monomere zum Hauptteil 1,4 verknüpft waren. Daneben fanden sich Anteile 1,6- und 1,4,6-verknüpfter Glucose. Da es sich bei diesem Polysaccharid um eine Substanz handelt, welche die Erhaltung der Ultrastruktur von Prionrods bei proteolytischer Verdauung erklären kann, wird sie im Folgenden auch "Prion-Scaffold" genannt. Die meisten der zuvor beschriebenen nicht-PrP-Komponenten von Prionen sind als assoziierte Komponenten vieler amyloider Ablagerungen (s. 1.2.3) bekannt (zur Übersicht s. Saeger & Röcken, 1998), weswegen Amyloide auch manchmal als "Müllhalde" des Zelltods bezeichnet werden. Ein Polysaccharid ähnlich dem Prion-Scaffold wurde jedoch bislang noch nicht beschrieben.

1.3.5 Fragestellung

Ein nicht-proteinöser Bestandteil wie das Prion-Scaffold könnte als generelle Komponente von Prionen große Bedeutung für die Pathogenese von Prionkrankheiten haben. In diesem Zusammenhang treten mehrere Fragestellungen auf:

1.) Die bisherigen strukturellen Daten wurden mit Prion-Scaffold aus Prionrods gewonnen und umfassten die Analyse der Zuckerkomponenten sowie deren Verknüpfung. Neben diesen Parametern bestimmt die Stereochemie der glykosidischen Bindungen in erheblichem Maße die physikalischen Eigenschaften und die Struktur eines Polysaccharides. Eine Analyse der Stereochemie des Prion-Scaffold, sowie eine Ausweitung der Analysen auf Prionmaterialien unterschiedlicher Herkunft bzw. auf Prionmaterialien, welche mittels unterschiedlichen Präparationsprotokollen gewonnen wurden, könnte daher Hinweise über das generelle Vorkommen, die Herkunft und ggf. die Funktion des Prion-Scaffolds geben. Daher sollten diese Analysen auf Basis enzymatischer, chemischer, gaschromatographischer und massenspektrometrischer Methoden durchgeführt werden.

2.) Ein Polysaccharid wie das Prion-Scaffold könnte einen starken Einfluss auf die Strukturumwandlung und Aggregation von PrP ausüben. Darüber hinaus ist es wichtig für Rekonstitutionsexperimente sicherzustellen, dass *in vitro* Koaggregate von Polysacchariden und PrP erzeugt werden können. Hierzu sollte das in unserem Institut zur Umfaltung von PrP entwickelte *in-vitro*-Konversionssystem von Post et al. (1998) adaptiert und um die Verwendung von Polysacchariden erweitert werden. Für die biophysikalische Charakterisierungen standen Methoden wie Circular-Dichroismus-Spektroskopie, differentielle Ultrazentrifugation und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie zur Verfügung.

3.) Eine zentrale Frage im Zusammenhang mit Nicht-PrP-Komponenten von Prionen ist, ob diese mit der Prioninfektiosität zusammenhängen. Bislang wurden keine Experimente zur *de-novo*-Generation von Prionen und Polysacchariden beschrieben. Daher sollten Rekonstitutionsexperimente mit Polysacchariden bzw. dem Prion-Scaffold und verschiedenen PrP-Spezies durchgeführt werden.

4.) Auf Basis des in 1.2. dargestellten Zusammenspiels von oxidativem Stress, AGEs und Proteinaggregation erscheint eine Beteiligung von AGEs bei den pathogenen Prozessen von Prionkrankheiten möglich. Daher sollte das Vorkommen von AGEs bei Prionen mit spezifischen Antikörpern analysiert und der mögliche Einfluss von AGEs auf die PrP-Strukturumwandlung durch *in-vitro*-AGEing untersucht werden.

2. Materialien und Geräte

2.1 Chemikalien und Gase

Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Gase entsprachen dem höchsten, kommerziell erwerbbaren Reinheitsgrad (zumeist *p. A. - pro Analysi*) und sind unter "9. Chemikalienverzeichnis" mit Bezugsquelle aufgeführt. Lösungen wurden mit hochreinem "Milli-Q-Wasser", welches durch ein hauseigenes Wasseraufreinigungssystem gefiltert wurde, angesetzt und ggf. 20 min bei 121 °C sterilisiert oder durch 0.2 µm Membranfilter steril filtriert.

2.2 Prion-Präparate

Sofern nicht anders erwähnt, wurden Prionpräparationen freundlicherweise von Prof. Dr. S. B. Prusiner und Mitarbeitern (University of California, San Fransisco, USA) zur Verfügung gestellt.

2.2.1 Prionrods (PrP 27-30) vom Scrapiestamm 263K

Prionrods, deren Hauptkomponente aufreinigungsbedingt das N-terminal verkürzte PrP 27-30 ist, wurden als Saccharosegradientenfraktion (ca. 50 % w/v Saccharose) bzw. von Prof. H. Diringer, Dr. Michael Beekes und Mitarbeitern (Robert-Koch-Institut, Berlin, D) als aufgereinigte Festsubstanz zur Verfügung gestellt. Präparationen erfolgten gemäß standardisierten Protokollen (Prusiner *et al.* 1983 bzw. Diringer *et al.* 1998) aus Hirnen syrischer Goldhamster, die mit dem Scrapiestamm 263K infiziert wurden.

2.2.2 PrP^{sc} (PrP 33-35) vom Scrapiestamm 263K

Prionaufreinigungen, deren Hauptkomponente PrP^{sc} (PrP 33-35) ist, wurden als Suspension in 50 mM TrisHCl, 5 mM EDTA, pH 7.4 zur Verfügung gestellt. Die Präparation erfolgte gemäß standardisiertem Protokoll (Turk *et al.* 1988) aus Hirnen syrischer Goldhamster, die mit dem Scrapiestamm 263K infiziert wurden.

2.2.3 Prionisolat vom Scrapiestamm RML

Ein Prionisolat des Scrapiestammes RML wurde als Festsubstanz zur Verfügung gestellt. Die Aufarbeitung erfolgte aus Hirnen syrischer Goldhamster, die mit dem Scrapiestamm RML infiziert wurden (Scott *et al.* 1997).

2.2.4 Prionisolat vom Scrapiestamm ME7

Ein Prionisolat des Scrapiestammes ME7 wurde als Festsubstanz zur Verfügung gestellt. Die Aufarbeitung erfolgte aus Hirnen syrischer Goldhamster, die mit dem Scrapiestamm ME7 infiziert wurden (Scott *et al.* 1997).

2.2.5 ScN2a-Zelllysate

Prion-Präparate aus Scrapie-infizierten Neuroblastoma- (ScN2a-)zellen der Maus (Butler *et al.* 1988) wurden freundlicherweise als aufgearbeitetes Zelllysat von Dr. Jörg Tatzelt und Mitarbeitern (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, D) zur Verfügung gestellt. Zellkultur, Lyse und Aufarbeitung erfolgte nach Winkelhofer & Tatzelt (2000).

2.3 Prion-Proteine

Sofern nicht anders erwähnt, wurden PrP-Präparate freundlicherweise von Prof. Dr. S. B. Prusiner und Mitarbeitern (University of California, San Fransisco, USA) zur Verfügung gestellt.

2.3.1 rec SHaPrP(90-231) und rec SHaPrP(29-231)

Rekombinantes SHaPrP(90-231), das der Aminosäuresequenz von PrP 27-30 und rekombinantes SHaPrP(29-231), das annähernd der Volllängensequenz (23-231) entspricht, wurden als HPLC-aufgereinigtes Lyophilisat aus *E. coli*-Zellkulturen gestellt. Die Klonierung und Aufarbeitung erfolgte gemäß standardisierten Protokollen (Mehlhorn *et al.*, 1996).

2.3.2 SHa-PrP^c

Zelluläres Prionprotein (PrP^C) wurde in gelöster Form zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigung erfolgte aus den Hirnen gesunder syrischer Goldhamster nach dem Protokoll von Pan *et al.* (1992).

2.3.3 CHO-PrP^c

Die Aufarbeitung von rekombinantem PrP^C aus Zellkulturen chinesischer Hamster-Ovarien (Blochberger *et al.* 1997) wurde in unserer Arbeitsgruppe nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. B. Prusiner (University of California, San Fransisco, USA) etabliert (Elfrink 2001; Schell 2001). Präparationen von CHO-PrP^C wurden freundlicherweise von Kerstin Elfrink und Ilka Ostermann zur Verfügung gestellt.

2.4 Antikörper

Maus anti PrP (3F4)

Der PrP-spezifische Maus-Antikörper 3F4 wurde freundlicherweise vom der Arbeitsgruppe Prof. Dr. S. B. Prusiner zur Verfügung gestellt. Die Herstellung und Aufarbeitung erfolgte nach Kascak *et al.* (1987).

Maus anti CML (4G9)

Der für das Advanced Glycation Endproduct (AGE) N^ε-(Carboxymethyl-)lysin (CML) spezifische monoklonale Maus-Antikörper 4G9 (Mellinghoff *et al.* 1997) wurde freundlicherweise von der Firma Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, D) zur Verfügung gestellt.

Maus anti Pyrralin (H-12)

Der für das AGE Pyrralin spezifische monoklonale Maus-IgG₁-Antikörper H-12 wurde von der Firma GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg, D) bezogen.

Maus anti Pentosidin (PEN-12)

Der für das AGE Pentosidin spezifische monoklonale Maus-IgG₁-Antikörper PEN-12 wurde von der Firma GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg, D) bezogen.

Maus anti Glykogen

Ein für Glykogen und Stärke spezifischer monoklonaler Maus-IgM-Antikörper (Baba 1993; Garcia-Rocha *et al.* 2001) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Otto Baba (University of Texas, Houston, USA) und Dr. Garcia-Rocha (Universitat de Barcelona, Barcelona, E) zur Verfügung gestellt.

Schaf anti Maus Peroxidase-markiert (SaM-PO)

Der mit Meerrettich-Peroxidase markierte Schaf anti Maus-IgG-Antikörper (SaM-PO) wurde von der Firma Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg, D) bezogen.

Ziege anti Maus Cy[™]-2-markiert (GaM-Cy2)

Der mit FluoroLinkTM CyTM2 markierte Ziege anti Maus IgG-Antikörper (GaM-Cy2) wurde von der Firma Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg, D) bezogen.

2.5 Weitere Biomaterialien und Enzyme

Kontrollpräparationen aus gesunden Hamstern

Kontrollpräparationen aus Hirnen gesunder syrischer Goldhamster wurde freundlicherweise von Prof. Dr. H. Diringer und Mitarbeitern (Robert-Koch-Institut, Berlin, D) als Festsubstanz zur Verfügung gestellt. Die Präparation erfolgte nach dem gleichen standardisierten Protokoll wie die PrP 27-30-Präparation (Diringer *et al.* 1998).

Kontrollpräparation N2a

Kontrollpräparate aus gesunden Neuroblastoma- (N2a-)zellen der Maus wurden freundlicherweise als aufgearbeitetes Zelllysat von Dr. Jörg Tatzelt und Mitarbeitern (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, D) zur Verfügung gestellt. Die Aufarbeitung erfolgte nach Winkelhofer & Tatzelt (2000).

Hirne gesunder Hamster

Hirne gesunder syrischer Goldhamster wurden in gefrorenem Zustand freundlicherweise von Dr. M. Beekes (Robert-Koch-Institut, Berlin, D) zur Verfügung gestellt.

Humanes Hirngewebe

Formalinfixiertes humanes Hirngewebe wurde freundlicherweise von PD Dr. E. Neuen-Jacob (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, D) zur Verfügung gestellt.

Enzyme

Proteinase K wurde von der Firma Boehringer Mannheim (Mannheim, D), α -Glucosidase aus *Saccharomyces cerevisiae*, β -Glucosidase aus *Prunus dulcis var. amara*, Cellulase aus *Trichoderma reesei* und Amyloglucosidase aus *Aspergillus niger* wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) bezogen.

Molekulargewichtsstandards

Als vorgefärbte Proteinstandards wurden der 14.2-200 kDa HMW-Standard von der Firma Gibco BRL (Paisley, GB), der 4-250 kDa SeeBlue[®]-Standard von der Firma Invitrogen (Groningen, NL) und der 14.3-220 kDa High-Range Rainbow[™]-Standard von der Firma Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg, D) bezogen.

Keyhole-Limpet-Hämocyanin-CML

CML-modifiziertes humanes Keyhole-Limpet-Hämocyanin (KLH) Protein, welches das Antigen für den 4G9-Antikörper ist, wurde freundlicherweise von der Firma Roche Diagnostics GmbH (Penzberg, D) zur Verfügung gestellt.

Rinder-Serum-Albumin

Rinder-Serum-Albumin (BSA) Fraktion V wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) bezogen.

Polysaccharide

Glykogen aus Rinderleber wurde von der Firma Fluka (Buchs, CH), Azurblau-markiertes Glykogen aus Rinderleber, Heparansulfat aus Rindernieren, Amylose (Fraktion III) aus Kartoffeln und Cellulose (20 micron Partikel) wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) bezogen.

Lektine

Mit AlexaFluor[™] 633 markiertes Concanavalin A wurde von der Firma Molecular Probes Inc. (Eugene, USA), mit FITC bzw. Meerrettichperoxidase markiertes Concanavalin A wurde von der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, D) bezogen.

2.6 Gefäße und Verbrauchsmaterialien

Verwendete Gefäße und Verbrauchsmaterialien sind im folgenden mit Hersteller oder Bezugsquelle angegeben:

Centricon[®]-Filterröhrchen Chambered Coverglasses Chromatographiepapier (3MM) Formvar[®]/Kohle-Kupfernetzchen (600 mesh) GC-Säule Optima[®] 1 (25 m / 0,25 mm iD) GC-Säule Optima[®] 1 (25 m / 0,32 mm iD) Millipore, Bedford, USA Nalge Nunc, Naperville, USA Whatman, Maidstone, GB Plano, Wetzlar, D Macherey und Nagel, Düren, D Macherey und Nagel, Düren, D

GC-Säule Optima [®] 1 (30 m / 0,25 mm iD)	Mache
Konische Probengefäße (3 ml) mit Schraubdeckel	Mache
Membranfilter (0,2 µm)	Schleic
Mikroschraubgefäße mit Teflon-Silikondichtung	Mache
Mikrozentrifugengefäße (1,5 ml)	Beckm
NAP [®] 5 Säulen	Pharma
Objektträger und Deckgläschen	Menze
Polyvinylidenfluoridmembran (0,45 µm)	Millipo
Röntgenfilm (X-Omat [®] AR)	Kodak
Schraubdeckel-Probengefäße (1,5 ml)	Sarstee
Slide-A-Lyzer Dialyse Kassetten	Pierce,
Spießampullen (Fiolax, 5 ml)	Welabo
Teflon-Dichtungsscheiben für Conical vials	Anferti
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Josef P

Macherey und Nagel, Düren, D Macherey und Nagel, Düren, D Schleicher & Schuell, Dassel, D Macherey und Nagel, Düren, D Beckmann, München, D Pharmacia Biotech AB, Uppsala, S Menzel-Gläser, Braunschweig, D Millipore, Bedford, GB Kodak, Rochester, USA Sarstedt, Nümbrecht, D Pierce, Rockford, USA Welabo, Düsseldorf, D Anfertigung in hauseigener Werkstatt Iosef Peske, Aindling-Pichl, D

2.7 Geräte

Die verwendeten Geräte sind im folgenden mit Herstellern angegeben.

Auftischzentrifuge EBA 12 Dot-Blotkammer Minifold I Einstrahl-FCS Confocor® GC/MS-System Varian® 1700/CH7A GC/MS-System HP5890 II/ HP5972 GC/MS-System SSQ 7000-MS GC/MS-System Varian® 3400/ IncosTM 50 Gelelektrophoresekammer SE 600 Heatblock Dri-Block DB2A Hybrid-MS API QStar[™] Pulsar i Konfokales Laserscanning Mikroskop TCS NT Polarisationsphotomikroskop III Semi-Dry-Blot-Apparatur Trans-Blot SD Sonifikator Labsonic U Spektralphotometer DU-640 Spektralpolarimeter J715 Spektrofluorometer SFM 23 Transmissions-EM Tecnai G² F20 Ultrazentrifuge L-8-55 Ultrazentrifuge Optima TL Wasseraufreinigungsanlage EPA 41237-MA-1 Untertischzentrifuge GS 6KR Zweistrahl-FCS Olympus®

Hettich, Tuttlingen, D Schleicher & Schuell, Dassel, D Carl Zeiss, Jena, D/Evotec, Hamburg, D Varian MAT, Bremen, D Hewlett-Packard, Böblingen, D Finnigan MAT, Austin, USA Finnigan MAT, Austin, USA Hoefer Pharmacia, San Fransisco, USA Thermo-Dux, Wertheim, D MDS Sciex, Toronto, CAN Leica Microsystems, Wetzlar, D Carl Zeiss, Oberkochen, D Bio-Rad, Brussels, B Braun Dissel, Melsungen, D Beckman, Palo Alto, USA Jasco, Groß-Umstadt, D Kontron, Zürich, CH FEI/Phillips, Hillsboro, USA Beckmann, Palo Alto, USA Beckmann, Palo Alto, USA Millipore, Neu Isenburg, D Beckmann, Palo Alto, USA Evotec OAI, Hamburg, D

3. Experimentelle Grundlagen und Methoden

3.1 Umgang mit Gefahrstoffen und infektiösem Material

Bei chemischen Arbeitsschritten wurde unter einem Abzug gearbeitet und entsprechende Schutzkleidung verwendet. Handschuhe wurden bei allen Arbeitsschritten benutzt, um organische Lösungsmittel frei von Fettsäureverschmutzungen im Spurenbereich zu halten. Arbeiten mit Butyllithium (reagiert stark exotherm mit Wasser unter Butanbildung) und Methyliodid (potentes Mutagen, reagiert mit Wasser zu Methanol und Iod) wurden in einer Schutzgasatmosphäre durchgeführt, um Einflüsse von Luftfeuchtigkeit zu verhindern. Alle Arbeiten mit infektiösem Material wurden im S2-Labor unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 und unter Verwendung entsprechender Schutzbekleidung durchgeführt. Für eine detaillierte Beschreibung siehe Post (1998). Für Pipettierschritte wurden "safe seal"-PCR-Pipettenspitzen und gestopfte Einmalpipetten benutzt. Festabfall wurde zur Dekontamination in doppelten Lagen Polyamid-Vernichtungsbeutel für 4 h bei 134 °C autoklaviert. Flüssigabfall wurde zur Dekontamination auf 2 N NaOH eingestellt, mindestens 24 h bei RT inkubiert und anschließend mit HCl neutralisiert oder unter den oben genannten Bedingungen autoklaviert. Gefäße wurden ebenfalls autoklaviert oder für mindestens 1 h in 2 N NaOH eingelegt.

3.2 Aufarbeitungen, Präparationen und Synthesen

3.2.1 Aufarbeitung von PrP 27-30-Präparationen

Die als Sucrosegradientenfraktionen (s. 2.2.1) gelieferten PrP 27-30-Präparationen wurden mit mindestens dem gleichen Volumen an sterilem H₂O_{deion.} auf 20 bis 25 % Saccharose eingestellt und auf Polycarbonatgefäße (38 ml) verteilt. Anschließend wurde in der L-8-55-Ultrazentrifuge mit SW-28-Rotor für 15 h bei 4 °C mit 24.000 rpm (100.000 × g) zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Pellets in 1 ml H₂O_{deion.} resuspendiert und in Mikrozentrifugengefäße überführt. Danach wurde in der TL 100-Ultrazentrifuge mit TLA-45-Rotor für 1 h bei 4 °C mit 42.000 rpm (100.000 × g) zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets mit jeweils 600 µl sterilem H₂O_{deion.} resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Nach Wiederholung des letzten Waschschrittes wurden die Pellets bei –70 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.2.2 Präparation des Prion-Scaffold (PS)

Präparationen des PS aus Prionen erfolgten z.T. modifiziert in mehreren Schritten (zur Übersicht s. Abb. 3.1, nächste S.) nach dem Protokoll von Dumpitak (1998). Nach jedem Präparationsschritt wurden ggf. mehrere Proben à 1 μ g PrP^{Sc} (bezogen auf die Ausgangsmenge) für weitere Untersuchungen aus der laufenden Präparation genommen.



Abb. 3.1: Präparation des Polysaccharidgerüstes aus Prionen (Prion-Scaffold)

Übersicht über die einzelnen Präparationsschritte. Dunkelgrauer Text bezeichnet Schritte, die während der Optimierung eingeführt wurden.

Für die Lipidextraktion wurden Prionproben zunächst mit H₂O_{deion.} auf eine Konzentration von ca. 0,5 µg PrP^{Se}/µl gebracht, resuspendiert und anschließend mit dem Sonifikator Labsonic U mittels Bechersonde für 1 min mit 50-70 W, bei 25-35 °C sonifiziert. Dann wurden die Proben in Mikrozentrifugengefäßen mit der Ultrazentrifuge TL im TLA-45-Rotor für 1 h bei 4 °C bei 42.000 rpm (100.000 × g) zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die Pellets wurden in je 100 µl n-Butanol resuspendiert. Nach 15 min Äquilibrierung bei RT wurde für 2 min in der Auftischzentrifuge EBA 12 bei 14.000 rpm (20.000 × g) zentrifugiert. Die Überstande wurden abgenommen und die Lipidextraktion der Pellets noch zweimal wiederholt, wobei die Proben nach jeder Extraktion in neue Probengefäße überführt wurden, da n-Butanol die Gefäße angriff. Anschließend wurde das Pellet bis zur völligen Trocknung evaporiert und optional bei –70 °C bis zur PK-Verdauung eingefroren.

Direkt vor der proteolytischen Verdauung wurden die Proben in 10 mM NaPi, pH 7,2 auf eine Konzentration von ca. 100 ng/µl PrP^{se} eingestellt, in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und anschließend mit dem Sonifikator Labsonic U mittels Bechersonde für 1 min mit 50-70 W, bei 25-35 °C sonifiziert. Dann wurden die Proben mit Proteinase K (PK) auf eine Konzentration von 100 ng PK/µl eingestellt, durchmischt und bei RT inkubiert. Nach 24 h wurde erneut mit PK auf eine Endkonzentration der (neu zugegebenen) PK von ca. 100 ng /µl eingestellt, intensiv durchmischt und für weitere 24 h bei RT inkubiert. Abschließend wurden die Proben in der TL 100 mit TLA-45-Rotor für 1 h bei 4 °C mit 42.000 rpm (100,000 × g) zentrifugiert. Der proteolytische Überstand wurde für weitere Untersuchungen bei –70 °C eingefroren, die das PS enthaltenden Pellets mit 700 µl H₂O_{deion}. resuspendiert, wie zuvor zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschritt wurde wiederholt und das resultierende Pellet bis zur weiteren Verwendung bei –70 °C aufbewahrt. Sofern das PS für Aggregationsansätze verwendet werden sollte, wurde es ggf. noch mit PMSF zur Inaktivierung evtl. verbliebener PK behandelt. Bei anfänglichen Präparationen wurde im Fall sehr resistenter Prionmaterialien die PK-Verdauung wie oben wiederholt.

Optimierung der Präparation:

Im Verlauf der Präparationen wurde bei Sonifikationen die Bechersonde durch eine Nadelsonde ersetzt. Bei späteren Präparationen wurde kurz vor jeder Zugabe von PK für 15 s mit der Nadelsonde sonifiziert und die PK-Verdauung bei 60-62 °C unter Schütteln durchgeführt. Bei den letzten Präparationen wurde vor der PK-Verdauung ein Denaturierungsschritt eingeführt. Hierzu wurden die Proben in einer 4,5 M wässrigen Guanidiniumthiocyanat-(GdnSCN-) Lösung auf eine Konzentration von 1 μ g/ μ l PrP^{sc} gebracht, mit dem Sonifikator Labsonic U mittels Nadelsonde für 1 min mit 50-70 W, bei 25-35 °C sonifiziert und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem doppelten Volumen an eiskaltem Ethanol (EtOH) versetzt ü.N. bei –70 °C zur Fällung inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 30 min mit der Ultrazentrifuge TL im TLA-45-Rotor für 30 min bei 4 °C und 42.000 rpm (100.000 × g) zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und die Pellets getrocknet. Danach wurden die Pellets zum Waschen auf 0,5 µg/µl PrP^{se} mit 10 mM Natriumphosphatpuffer (NaPi), pH 7,2 (s.u.) eingestellt und mit der Ultrazentrifuge TL im TLA-45-Rotor für 1 h bei 25 °C bei 42.000 rpm (100.000 × g) zentrifugiert. Überstände wurden verworfen und die Pellets optional ü.N. bis zur PK-Verdauung bei –70 °C eingefroren.

Natrium-Phosphatpuffer (NaPi)-Stammlösung:

100 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)

100 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂PO₄)

wurden in $H_2O_{deion.}$ auf einen pH-Werte von 6,8, 7,2, 7,7 bzw. 8,4 eingestellt, und ggf. unter Zusatz von SDS auf die gewünschte Molarität verdünnt.

3.2.3 Aufarbeitung von rec SHaPrP-Lyophilisaten

Die mit Acetonitril und TFA verunreinigten HPLC-Lyophilisate der rekombinanten Prionproteine (s. 2.3.1) mussten zunächst aufgearbeitet werden. Die hiermit verbundene De-, Renaturierung und Aufkonzentrierung erfolgten in modifizierter Form nach dem von Jansen 1998 und Birkmann 2000 optimierten Protokoll der Arbeitsgruppe Prusiner (Mehlhorn et al. 1996). Hierbei wurde 1-2 mg rec PrP-Lyophilisat in 200 µl H₂O_{deion} gelöst. Nach Bestimmung der Konzentration via Absorptionsmessung bei 280 nm (s. 3.3.1) wurde die Probe auf etwa 5 mg/ml Protein eingestellt. Anschließend wurde das gelöste Protein durch Zugabe des vierfachen Volumens 8 M GdnHCl-Lösung (Endkonzentration 6,4 M) vollständig denaturiert. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde 1:10 mit Refoldingbuffer (s.u.) verdünnt. Die Lösungen wurden dann in Centricon[®]-Röhrchen mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa in der Untertischzentrifuge GS 6KR mit den GA10-Rotor für ca. 4 h bei 4.600 rpm $(3.000 \times g)$ auf wenige hundert µl eingeengt. Da rec SHaPrP nur im sauren pH oder unter Zusatz von Detergenzien langzeitlöslich ist, wurden je nach Fragestellung die Präparation auf zwei unterschiedlichen Wegen fortgesetzt. Zur Präparation von rec SHa PrP in 10 mM NaAc, pH 4 wurde das Konzentrat zum Umpuffern dreimal mit 10 mM NaAc, pH 4 auf 2 ml aufgefüllt, aufkonzentriert und der Überstand anschließend abgenommen, die PrP-Konzentration mittels Mikro-BCA-Test (s. 3.4.2) bestimmt, aliquotiert und bei –20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Zur Präparation von rec SHaPrP in 10 mM NaPi, pH 7,2, 0,2 % SDS wurde das Konzentrat zum Umpuffern zunächst zweimal mit 1 mM NaAc, pH 4 wie oben behandelt, anschließend einmal mit 10 mM NaPi, pH 7,2 auf 2 ml aufgefüllt, aufkonzentriert und dann der Überstand abgenommen. Da rec SHaPrP unter diesen Bedingungen ohne SDS größtenteils ausfällt, wurden die Centricon[®]-Röhrchen (ggf. auch aus der NaAc-Präparation) mehrfach mit kleinen Volumina 10 mM NaPi, pH 7,2, 0,2 % SDS versetzt und unter gelegentlichem Vortexen für 1-5 h äquilibriert und die Lösungen getrennt gesammelt. Anschließend wurde auch der erste abgenommene Überstand auf 0,2 % SDS eingestellt und in allen Fraktionen die PrP-Konzentration mittels Mikro-BCA-Test bestimmt. Anschließend wurden die Proben aliquotiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

Refoldingbuffer:

25 mM Tris /HCl 5 mM EDTA wurden in H₂O_{deion.} auf pH 8,0 eingestellt.

Natrium-Acetatpuffer (NaAc) Stammlösung:

100 mM Natriumacetat

wurde in $H_2O_{deion.}$ mit Eisessig auf pH 4 oder 5 eingestellt und auf die gewünschte Molarität verdünnt.

3.2.4 Fluoreszenzmarkierung von PrP

Rekombinantes SHa PrP(29-231) wurde mit den hydrophilen Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor[®] 633 oder 488 markiert. Dies erfolgte über kovalente Bindung der Farbstoff-Succinimidylestergruppe an freie Aminogruppen der PrP-Moleküle. Farbstoffe und Methode sind dahingehend optimiert, dass der Farbstoff keine Aggregation des markierten Proteins induziert und dass im Schnitt weniger als ein Farbstoffmolekül pro PrP-Molekül bindet (Schäfer 2002). Zur Markierung wurden Reaktionsansätze 1 h bei RT im Dunkeln unter wiederholter Durchmischung inkubiert. Die Abtrennung des freien Farbstoffs erfolgte mittels Größenausschluß-Chromatographie über NAP[®] 5-Säulen. Die Säulen wurden zunächst mit dem vierfachen Eigenvolumen an Elutionspuffer äquilibriert, dann wurde der Reaktionsansatz auf die Säule gegeben und mit Elutionspuffer eluiert. Die Fraktionierung erfolgte dabei in 100 µl Aliquots. Durch Absorptionsmessung wurde die Fraktion bestimmt, welche markiertes Protein enthielt. Markierte Proteine wurden bei 4 °C oder –20 °C gelagert.

Markierungsansatz:

 10 μg
 rec SHa PrP(29-231)

 5 μg
 Alexa 633

 0,2 %
 SDS

 ad 50 μl NaPi, pH 8,4

Elutionspuffer:

150 mMNaCl0,2 %SDSwurden in 10 mM NaPi, pH 7,2 angesetzt.

3.2.5 Synthese von Protein-Advanced Glycation Endproducts (AGEs)

Anfänglich erfolgte die Darstellung von Protein-AGEs abgewandelt nach Eble *et al.* (1983) und Gasic-Milenkovic *et al.* (2001). Hierzu wurden Proteinlösungen mit 1 M Glucose (Glc) in 10 mM NaPi, pH 7,2 über 6 Wochen bei 50 °C in Schraubdeckel-Probengefäßen inkubiert. Ggf. wurde wöchentlich die Absorption aller Proben bei 400 nm gemessen und die Fluoreszenz bei einer Excitationswellenlänge von 370 nm und einer Emmissionswellenlänge von 440 nm bestimmt. Als Referenz diente hierbei eine korrespondierende Probe ohne Protein. Als Proteine wurden entweder 1 mM BSA mit einem Gesamtvolumen von 1 ml oder 80 ng/µl rec SHaPrP(29-231) mit einem Gesamtvolumen von 250 µl eingesetzt. Die PrP-Proben lagen

entweder als Aggregate der in-vitro-Konversion (s. 3.8.1) vor, oder wurden mit Ansetzen der Proben auf die gewünschte SDS-Konzentrationen eingestellt. Zur Überprüfung, ob AGE-Modifikationen auch durch Glykogen vermittelt werden können, wurden Proben angesetzt, die anstelle von 1 M Glucose 50 mg/ml bzw. 10 mg/ml Glykogen enthielten. Außerdem wurden Proben angesetzt um zu prüfen, ob das zur Priontherapie eingesetzte Medikament Quinacrin evtl. einen Einfluss auf die Prozesse der AGE-Bildung hat. Hierzu wurden den AGE-Proben in einem ersten Versuch zu Beginn 1 µM, bei späteren Versuchen wöchentlich 10 µM Ouinacrin zugesetzt. PrP-Proben wurden anschließend differentiell ultrazentrifugiert (s. 3.8.4), BSA-Proben in Slide-A-Lyzer Dialyse Kassetten mit einem Ausschlussvolumen von 10.000 Da gegen 10 mM NaPi, pH 7,2 dialysiert. Diese Arbeiten wurden z.T. mit freundlicher Unterstützung von Katrin Lecher im Rahmen ihres Fortgeschrittenenpraktikums durchgeführt. Alternativ wurden PrP-AGEs abgewandelt nach Westwood & Thornalley (1995) und Thornalley et al. (2000) synthetisiert. Hierzu wurden 180 ng/µl rec SHaPrP(29-231) in 200 mM NaPi, pH 7,5, 1 mM Glyoxal, 1 mM Methylglyoxal für 24-72 h bei 45 °C unter Schütteln inkubiert. Die PrP-Proben lagen als Aggregate der in-vitro-Konversion (s. 3.8.1) oder wurden mit Ansetzen der Proben auf die gewünschten SDS-Konzentrationen eingestellt. Abschließend erfolgte differentielle Ultrazentrifugation (s. 3.8.4).

In allen Fällen erfolgten weiterführende Untersuchungen mittels Dot-Blot (s. 3.5.4) oder PAGE (s. 3.5.1) mit nachfolgender Silberfärbung (s. 3.5.2) oder Westernblot (s. 3.5.3).

3.2.6 Präparation von Corpora Amylacea (CA)

Präparationen von CA aus formalinfixiertem humanem Hirngewebe bzw. aus Hirnen gesunder Goldhamster erfolgten nach dem Protokoll von Sakai *et al.* (1969). Die so gewonnenen Präparationen wurden mittels PAS-Färbung und Lichtmikroskopie untersucht. Sofern die CA-Präparationen noch mit Lymphozyten verunreinigt waren, wurden die Präparate mit CsCl auf eine Dichte von etwa 1,5 - 1,7 g/ml eingestellt. Danach wurde so lange verdünnt, bis erste Bestandteile der flotierenden Präparation sedimentierten (~1,4 g/ml). Anschließend wurde mit der Untertischzentrifuge bei $1.300 \times g$ für 20 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet noch zweimal mit H₂O gewaschen. Diese Arbeiten wurden mit freundlicher Unterstützung von Nicole Weinmann im Rahmen ihres Fortgeschrittenenpraktikums durchgeführt.

3.2.7 Synthese des Lithium-Methylsulfinylmethanid-Anions

Das für die Methylierungsreaktion notwendige Methylsulfinylmethanid-Anion wurde in einem abgewandelten Reaktionsansatz nach Carpita & Shea (1989) präpariert. Eine ausführliche Beschreibung inkl. der verwendeten Schutzgasapparatur findet sich in Dumpitak 1998. Zur Synthese wurde DMSO zunächst mit Argon gesättigt und anschließend in einer Argon-Atmosphäre unter Rühren tropfenweise mit Hexan-gelöstem Butyllithium (BuLi) versetzt. Unter ständiger Argonsättigung des Reaktionsgemisches wurde auf 40 °C erwärmt und die Reaktion für etwa 2 h fortgesetzt. Nach Evaporation des verbliebenen Hexans wurde das gewonnene Methylsulfinylmethanid-Anion unter Argon in Ampullen aliquotiert, eingeschmolzen und bei –70 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

3.3 Konzentrationsbestimmungen

3.3.1 Konzentrationsbestimmung von rec PrP mittels Absorptionsmessung

Zur Konzentrationsbestimmung von rec SHaPrP wurde die Absorption von Tryptophan und Tyrosin genutzt. Die Lösungen wurden im Spektralphotometer DU640 bei 280 nm gemessen. Die Konzentrationen wurden dann über die Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_{280 nm}(mg/ml) = 2,4724$ für rec SHaPrP(90-231) und $\varepsilon_{280 nm}(mg/ml) = 2,4925$ für rec SHaPrP(23-231) (Mehlhorn *et al.*, 1996) mittels des Lambert-Beerschen-Gesetzes bestimmt.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels Micro-BCA[™]-Test

Für jede Messreihe wurde eine Eichreihe mit BSA in Konzentrationen von 0,5-40 µg/ml angesetzt. Als Referenz diente der verwendete Puffer. Die Konzentrationsbestimmungen mit Hilfe des Micro-BCA[™] Protein-Assay-Reagent Kit wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurde eine 1:1 Mischung aus Proteinlösung und "Working Reagent" für eine Stunde bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf RT wurde die Absorption im Spektralphotometer DU640 bei 562 nm gemessen und die Konzentration der Proben mittels Eichgrade der BSA-Reihe bestimmt.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung von SDS

SDS-Konzentrationen wurden nach einer modifizierten Methode von Reynolds & Tanford 1970 (Kaimann 2002) bestimmt. Für jede Messreihe wurde eine SDS-Eichreihe im jeweiligen Probenpuffer von 0,005 – 0,06 % SDS angesetzt. Als Referenz diente ein entsprechendes Volumen des verwendeten Puffers. Dann wurden jeweils 10-50 µl der zu bestimmenden Probe mit 1 ml wässriger Methylenblaulösung (24 mg/ml) gemischt. Nach Zugabe von 4 ml Chloroform wurde der entstehende Methylenblau-SDS-Komplex extrahiert. Danach wurde die Absorption der Chloroformphase bei 655 nm im Spektralphotometer DU 640 bestimmt und die Konzentration mit Hilfe der Eichgraden ermittelt.

3.3.4 Bestimmung der kritischen micellaren Konzentration (cmc)

Die cmc von SDS-Lösungen ggf. in Gegenwart von Glykogen wurde mit Hilfe der Fluoreszenzerhöhung von 1-Anilinonaphthalen-8-sulfonsäure (ANS) bestimmt (De Vendittis *et al.* 1981; Jansen 1998). Verwendet wurden jeweils Lösungen mit 200 μ M ANS-Lösung in 10 mM NaPi, pH 7,2 bei verschiedenen SDS-Konzentrationen ggf. mit 10 mg/ml Glykogen. Die Fluoreszenz wurde bei einer Excitationswellenlänge von 395 nm und einer Emmissionswellenlänge von 510 nm im Spektrofluorometer SFM 23 bestimmt.

3.3.5 Konzentrationsbestimmung des Methanid-Anions

Hierzu wurden 100 μ l Methylsulfinylmethanid-Anion (s. 3.2.7) in 50 ml H₂O_{deion.} gegeben und die Veränderung des pH-Wertes elektropotentiometrisch verfolgt. Anschließend wurde nach York *et al.* (1985) mit 0,1 N HCl auf den Ausgangs-pH rücktitriert und der Verbrauch gemessen. Da Lithium-Methylsulfinylmethanid-Anion äquimolar mit H₂O zu LiOH und DMSO umgesetzt wird, wurde aus dem Verbrauch der HCl die Konzentration des Methanid-Anions ermittelt.

3.4 Bioassays zur Infektositätsbestimmung

Die für die Bestimmung von Infektiosität notwendigen Bioassayproben wurden sofort nach Probennahme auf 1 ml mit PBS-Puffer (s.u.) aufgefüllt und in sterilisierten Mikroschraubgefäßen mit Teflon-Silikondichtungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

PBS-Puffer:	
137 mM	Natriumchlorid (NaCl)
2,7 mM	Kaliumchlorid (KCl)
4,3 mM	Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ \times 2 H ₂ O)
1,4 mM	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)
wurden in H ₂ O _{deion.}	auf einen pH von ~7,3 eingestellt.

Die Bestimmung der Infektiosität erfolgte innerhalb verschiedener Kooperationen:

3.4.1 Tübingen

Durch Dr. M. Groschup und Mitarbeiter (Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, D) wurden die Proben aufgetaut und gut resuspendiert. Pro Ansatz wurden 6 syrische Goldhamster mit 30 μ l intracerebral inokuliert und über einen Zeitraum von 200 d beobachtet. Anschließend oder bei Erreichen des terminalen Krankheitsstadiums wurden die Tiere getötet, das Hirn entnommen und bei –70 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Berechnung des Infektiositätstiters für Hamster erfolgte über die Inkubationszeit und wurde über folgende Formel (Prusiner *et al.* 1982) vorgenommen:

$$\log ID_{50}/ml = 26,66 - 12,99 \log (T_i - 40) - \log D$$

Mit log ID_{50}/ml = Titer in log infektiösen Einheiten pro ml Originalprobe, T_i = Inkubationszeit in d und log D = Verdünnungsfaktor der Originalprobe im Inokulum. Anhand der eingesetzten Proteinkonzentration wurde in log $ID_{50}/\mu g$ umgerechnet.

3.4.2 Berlin

Durch Dr. M. Beekes und Mitarbeiter (Robert-Koch-Institut, Berlin, D) wurden die Proben aufgetaut und $1 \times$ sonifiziert. Pro Ansatz wurden 5 syrische Goldhamster mit 50 µl intracerebral inokuliert und über einen Zeitraum von 500 d beobachtet. Anschließend oder bei Erreichen des terminalen Krankheitsstadiums wurden die Tiere getötet, das Hirn entnommen und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

3.4.3 San Francisco

In Kooperation mit K.-W. Leffers wurden Rekonstitutionsexperimente durchgeführt. Ein Doppel-Ansatz enthielt 10 ng/µl sol PrP 27-30 elu mit Prion-Scaffold (entsprechend 19 ng/µl PrP 27-30) und 2,3 ng/µl einer 1:1:1-Mischung aus Prionrodlipiden (Sphingomyelin, Galactosylceramid und Cholesterol nach Klein et al. 1998). Ein weiterer Doppelansatz enthielt $\sim 17 \text{ ng/}\mu\text{l}$ SHa-PrP^C mit Prion-Scaffold (entsprechend 33 ng/ μl PrP 27-30) und 4 ng/ μl der Mischung aus Prionrodlipide. Die Ansätze wurden in 10 mM Na-HEPES-Puffer mit 250 mM NaCl und 0,01 % SDS über 35 d bei 37 °C inkubiert. Nach differentieller Ultrazentrifugation wurde das Pellet in 50 µl H₂O_{deion}, resuspendiert. Nach elektronenmikroskopischem bzw. Dot-Blot-Nachweis von PrP-Aggregaten wurden 20 µl (~ 1 µg PrP) für Bioassays, wie oben beschrieben, vorbereitet. Infektiositätsstudien wurden in freundlicher Kooperation mit Prof. Dr. S. B. Prusiner und Mitarbeiter (University of California, San Francisco, USA) durchgeführt. Pro Ansatz wurden 5 TgSHaPrP 7BHOZ- (Tg7-)Mäuse, also transgene Mäuse, die das SHa-PrP überexprimieren, mit 30 µl Inokulum intracerebral gespritzt und 2 der jeweils 5 Tiere über einen Zeitraum von 250 d der Rest über 500 d beobachtet. Anschließend oder bei Erreichen des terminalen Krankheitsstadiums wurden die Tiere getötet, das Hirn entnommen und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die Berechnung des Infektiositätstiters für Tg7-Mäuse erfolgte nach folgender Formel (Prusiner et al. 1999b):

$$ID_{50}/ml = 3680 \times T_i^{-1,622}$$

Mit $ID_{50}/ml = Titer$ in infektiösen Einheiten pro ml Inokulum und $T_i = Inkubationszeit in d.$ Anschließend wurde um die Verdünnung im Inokulum korrigiert.

3.5 Molekularbiologische und biochemische Methoden

3.5.1 PAGE

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht wurde, wie bei Sambrook *et al.* (1989), mittels denaturierender, diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) durchgeführt. Zur Herstellung vertikaler Plattengele (14 \times 14 \times 0,15 cm) wurde Trenngellösung (s.u.) nach Einfüllen zwischen zwei Glasplatten mit wassergesättigtem sekundärem Butanol überschichtet. Nach Polymerisation und Entfernung

des Butanols wurde Sammelgellösung darübergeschichtet. Proben wurden in Mikroschraubgefäßen mit gleichem Volumen an Laemmli-Auftragspuffer (s.u.) versetzt und im Heatblock für 5 min bei 100 °C denaturiert. Nach Abkühlen wurden sie, zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (s. 2.5), auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte, nach Füllen der Gelelektrophoresekammer mit Laemmlipuffer mit SDS (s.u.), für 30 min bei 180 V, danach für 2 h bei 200 V oder ü. N. bei 30V bis die gewünschte Trennstrecke erreicht war. Die Detektion erfolgte mittels Silberfärbung (s. 3.5.2) oder Westernblot (s. 3.5.3).

Polyacrylamid-Stammlösung (30:0,8):

0,8 % N, N'-Methylenbisacrylamid 30 % Acrylamid wurden in H₂O_{deion.} für 30 min mit Amberlite MB3 (Ionenaustauscher) unter Rühren inkubiert und nach Filtration bis zum Gebrauch gekühlt aufbewahrt.

Trenngellösung:

380 mM	Tris/HCl, pH 8,8
12-16 %	Polyacrylamid-Stammlösung
1 %	SDS
0,1 %	TEMED
0,1 %	APS
wurden in H ₂ O _{deion.}	angesetzt.

Sammelgellösung:

125 mM	Tris/HCl, pH 6,8
3-6 %	Polyacrylamid-Stammlösung
1 %	SDS
0,1 %	TEMED
0,1 %	APS
wurden in H ₂ O _{deion.}	angesetzt.

Auftragspuffer:

140 mM	Tris/HCl, pH 6,8
10 %	2-Mercaptoethanol
4 %	SDS (10 ⁹ %)
10 %	Glycerin (87 %)
wurden in H ₂ O _{deion}	angesetzt und je 50 ml Lösung 1 Spsp Bromphenolblau zugegeben.

Gelelektrophoresepuffer nach Laemmli (10× Stammlösung):

250 mM	Tris
1,9 M	Glycin
(ggf. 0,1 %	SDS)
wurden in H ₂ O _{deion.}	angesetzt.

3.5.2 Silberfärbung

Silberfärbungen von Gelen nach SDS-PAGE (s. 3.5.1) mit einer Nachweisgrenze von bis zu 1 ng Protein pro Bande (Heukeshoven & Dernick 1985) wurden wie folgt durchgeführt:

Fixierung:	50 % Ethanol 10 % Essigsäure	20 min (optional ü. N.)
SDS-Entfernung:	10 % Ethanol 5 % Essigsäure	10 min
Oxidation:	0,05 % Natriumcarbonat 0,15 % Kaliumhexacyanoferrat 0,3 % Natriumthiosulfat	10 – 30 sec
Waschung:	H ₂ O _{deion.}	3 × 15 min
Färbung:	0,012 M Silbernitrat	20 min
Waschung:	H ₂ O _{deion.}	5 min
Entwicklung:	3 % Natriumcarbonat 0,02 % Formaldehyd	nach Bedarf
Entwicklungsstop:	1 % Essigsäure	mind. 15 min

3.5.3 Westernblot

Nach SDS-PAGE (s. 3.5.1) wurden Gele ggf. nach Abtrennen des Sammelgels für 15 min mit 6 Chromatographiepapieren und einer ethanolgetränkten PVDF-Membran gleicher Größe in ca. 100 ml Laemmlipuffer ohne SDS (s. 3.5.1) geschwenkt. Das auf die PVDF-Membran aufgelegte Gel wurde zwischen je 3 Chromatographiepapieren in die Semi-Dry-Blot-Apparatur gebracht. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in Abhängigkeit von der Größe der Gele über 0,5-1 h bei 100-300 mA und max. 20 V. Anschließend wurden Proteine mittels immunologischen Proteinnachweis (s. 3.5.5) detektiert.

3.5.4 Dot-Blot

Für den Dot-Blot wurde die Dot-Blotkammer Minifold I benutzt. Zunächst wurde eine ethanolgetränkte Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran zusammen mit einem gleichgroßen Chromatographiepapier in TBST-Puffer (s.u.) geschwenkt. Das Papier wurde dann auf den unteren Teil der Dot-Blot-Kammer gelegt und darauf die PVDF-Membran gebracht. Nach Verschluss der Apparatur mit der oberen 96-Loch-Plexiglasplatte wurde Vakuum angelegt und zunächst 200 μ l TBST pro Loch durchgesogen. Nachfolgend wurden die vorbereiteten Proben in Volumina von 40 – 100 μ l unter schwächerem Vakuum durchgesogen. Nach der Vakuumübertragung der Probenproteine auf die PVDF-Membran erfolgten zwei weitere Waschungen mit 200 μ l TBST-Puffer pro Loch. Da der SHaPrP-spezifische Antikörper 3F4 nur denaturiertes Protein erkennt, wurden bei seiner Verwendung entweder die Proben vor dem Blotten in Auftragspuffer (s. 3.5.1) denaturiert, oder nach dem Blotten die PVDF-Membran 5 min in KOH-Lösung (2 %) geschwenkt. In diesem Fall wurde die Membran vor dem immunologischen Proteinnachweis (s. 3.5.5) noch zweimal für 5 min in TBST gewaschen.

TBST-Puffer:	
1 mM	Tris/HCl, pH 8,0
150 mM	NaCl
0,01 %	Tween 20
wurden in H ₂ O _{deion.}	angesetzt.

3.5.5 Immunologische Nachweise von Proteinen und AGEs

3.5.5.1 PrP-Detektion

Sofern PrP mit durchschnittlicher Empfindlichkeit nachgewiesen werden sollte, wurden nach Dot- (s. 3.5.4) oder Westernblot (s. 3.5.3) die unspezifischen Proteinbindestellen der PVDF-Membran für 2 h bei RT (optional ü. N. bei 4 °C) durch Schwenken in TBST (s. 3.5.4) mit 5 % Milchpulver geblockt. Danach wurde die Membran mit TBST abgespült und mit dem Antikörper 3F4 (s. 2.4) in einer 1:10.000-Verdünnung in TBST für 2 h bei RT (optional ü. N. bei 4 °C) geschwenkt. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen für jeweils 10 min in TBST. Danach wurde für 2 h bei RT mit dem SaM-PO-Zweitantikörper (s. 2.4) in einer 1:5.000-Verdünnung in TBST inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBST für jeweils 10 min erfolgte die Chemilumineszenzdetektion. Hierzu wurde das Chemilumineszenzkit ECL oder ECL Plus nach Herstellerangaben verwendet, wonach die Lumineszenz durch Exposition (5 s - 30 min) auf Röntgenfilm X-Omat[®] AR detektiert wurde.

3.5.5.2 PrP-Detektion mit hoher Sensitivität

Hochempfindliche Westernblots zur Detektion von Rest-PrP in PS-Präparationen (s.3.2.2) wurden freundlicherweise von Dr. Michael Beekes und Mitarbeitern (Robert-Koch-Institut, Berlin, D) nach dem dortigen Protokoll (Thomzig *et al.* 2003) durchgeführt. Hierbei wurde zur Chemilumineszenzdetektion ein CDP-Star[®]-Kit verwendet. Die Nachweisgrenze für PrP lag bei 10⁻⁷ HÄ, was etwa 10 pg PrP entspricht.

3.5.5.3 Detektion von AGEs

Sofern AGEs nachgewiesen werden sollten, wurden unspezifischen Proteinbindestellen für 2 h bei RT (optional ü. N. bei 4 °C) durch Schwenken in 1× Rotiblock geblockt. Danach wurde die Membran mit dem Antikörper 4G9, dem Antikörper H-12 oder dem Antikörper PEN-12 (s. jeweils 2.4) in einer 1:2.000-Verdünnung in 0,5× Rotiblock für 2 h bei RT (optional ü.N. bei 4 °C) geschwenkt. Anschließend erfolgte dreimaliges Waschen für jeweils 10 min in 0,5× Rotiblock. Danach wurde für 2 h bei RT mit dem SaM-PO-Zweitantikörper (s. 2.4) in einer 1:5.000-Verdünnung in 0,5× Rotiblock inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen in 0,5× Rotiblock für jeweils 10 min erfolgte die Chemilumineszenzdetektion. Hierzu wurde das Chemilumineszenzkit ECL oder ECL Plus nach Herstellerangaben verwendet, wonach die Lumineszenz durch Expositionen (5 s - 30 min) auf Röntgenfilm X-Omat[®] AR detektiert wurde.

3.5.6 Blotstripping

Um auf einem Blot mit verschiedenen Antikörpern immunologische Nachweise führen zu können, mussten die Antikörper des ersten Nachweises zuvor abgelöst ("gestrippt") werden. Hierzu wurden Blots 5 min in $H_2O_{deion.}$ geschwenkt. Anschließend wurde 5 min in 0,2 M NaOH gestrippt. Nachfolgend wurde für 5 min in $H_2O_{deion.}$ gewaschen und dann 2× für 10 min in TBST-Puffer (s. 3.5.4) oder 0,5× Rotiblock geschwenkt, bevor der immunologische Nachweis mit dem nächsten Erstantikörper begann. Dies wurde bis zu fünfmal durchgeführt.

3.5.7 PK-Resistenztest

Zum Nachweis der PK-Resistenz von PrP-Aggregaten wurden limitierte PK-Verdauungen nach der von Eva Birkmann im Rahmen ihrer Promotion an unserem Institut etablierten Methode durchgeführt. Hierzu wurde jede Probe der *in-vitro*-Konversion (s. 3.8.1) mit einer rec SHaPrP-Konzentration von 70-100 ng/µl sofort nach Ansetzen à 20 µl für Zeitreihen aliquotiert und i.d.R. für 3 d bei 37 °C inkubiert. Außer für die Nullproben wurden pro Aliquot anschließend 2,2 µl PK (200 ng/µl) in 10 mM NaPi, pH 7,2 auf eine Endkonzentration von 20 ng/µl zugegeben und den Zeitreihen entsprechend für unterschiedliche Zeiten bei RT inkubiert. Zum Stoppen wurden 22 µl 2× Auftragspuffer (s. 3.5.1) mit 0,1 M PMSF zugegeben und für 15 min im Heatblock bei 100 °C inkubiert.

3.5.8 Glykolytische Verdauungen

Zur Bestimmung der Stereochemie von Glucosepolysacchariden wurden Zucker in 10 mM NaPi, pH 6,8 (für α -Glucosidase), 10 mM NaAc, pH 5 (für β -Glucosidase) oder 1 mM NaAc, pH 4,5 (für Amyloglucosidase) aufgenommen. Sofern es sich um Standards wie Stärke, Glykogen oder Cellulose handelte, wurden 1 mg in 1 ml Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 2-4 U Enzym wurden Proben für 3,5 h bei 37-55 °C unter Schütteln inkubiert, wobei ggf. Proben für Zeitreihen aus den Ansätzen entnommen wurden. Zum Stoppen der Reaktion wurde entweder ein halbes Volumen Eisessig hinzugegeben oder 3 min bei 95 °C im Heatblock inkubiert. Beim Prion-Scaffold wurden Mengen, die 21,5 µg PrP 27-30 entsprechen, auf 50 µl mit 1 mM NaAc, pH 4,5 aufgefüllt. Der zu verdauenden Probe wurden 4 U Amyloglucosidase zugegeben. Alle Proben wurden anschließend für 3,5 h bei 55 °C unter Schütteln inkubiert und wie oben beschrieben im Heatblock inkubiert. Die Proben wurden bis zur massenspektrometrischen Untersuchung (s. 3.7.4) bei –20 °C eingefroren.

3.6 Chemische Glykoanalytik

3.6.1 Strategien der Glykoanalytik

Die strukturelle Studie von Polysacchariden bzw. Polysaccharidkomponenten von Glykoproteinen und Glykolipiden kann mittels Enzym-Assays, Massenspektrometrie (MS), Kernspinresonanz- (NMR-)spektroskopie oder colorimetrischen Methoden betrieben werden. Oftmals werden diese Methoden einander ergänzend eingesetzt. Dabei ist es eine gängige Strategie, zunächst die monomeren Komponenten des Polysaccharides und deren molare Verhältnisse zu bestimmen. Nachfolgend wird die Verknüpfung der Komponenten und ggf. die durchschnittliche Kettenlänge ermittelt. Abschließend erfolgt die Bestimmung der Stereochemie der Monomerenbindungen. Die Bestimmung der Monomerenkomposition und der Verknüpfung erfolgt oftmals mittels chemischer Derivatisierung und nachfolgender Analyse via Gaschromatographie mit gekoppelter Massenspektrometrie (GC/MS) (zur Übersicht siehe Mischnick 1995a; 1995b; Biermann & McGinnis 1989; York *et al.* 1985).

3.6.2 Prinzip der Komponentenanalyse mittels Alditolacetatmethode

Kohlenhydrate sind aufgrund ihrer polaren Seitengruppen nicht oder schwer flüchtig und zersetzen sich bei höheren Temperaturen. Um dennoch eine Analyse via GC oder GC/MS zu ermöglichen, kann man sie z.B. mit der Alditolacetatmethode derivatisieren (zur Übersicht s. Fox *et al.* 1989). Diese Methode hat einerseits den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu anderen Derivatisierungen bei der GC-Analyse nur ein Derivat und somit auch nur ein Signal pro Zucker liefert. Andererseits sind Alditolacetate sehr stabil, was nachfolgende Aufreinigungsprozeduren erleichtert und eine Lagerung über längere Zeiträume ermöglicht. Eine Übersicht über die chemischen Reaktionen der Alditolacetatmethode ist in Abb. 3.2 gezeigt. Das Poly-



Abb. 3.2: Derivatisierungsschritte der Alditolacetat-Komponentenanalyse (Übersicht):

Zunächst wird das zu untersuchende Polysaccharid durch Hydrolyse mit Trifluoressigsäure in seine Monomeren überführt. Danach werden die monomeren Saccharide durch Reduktion mit Natriumbordeuterid in Alditole bzw. Ketitole überführt. Abschließend erfolgt die Acetylierung zu Alditol- bzw. Ketitolacetaten. saccharid wird im ersten Schritt über Hydrolyse in Monosaccharide aufgespalten, wobei die Hydrolysemethode je nach Art der untersuchten Spezies zu wählen ist (Zur Übersicht s. White & Kennedy 1979, Hough et al. 1972). Die Monosaccharide werden im zweiten Schritt mit Natriumborhydrid (NaBH₄) zu Alditolen reduziert. Da jedoch korrespondierende Aldosen und Ketosen in gleichen Alditolen resultieren (z.B. Glucose und Fructose resultieren beide in Glucitol), ist die Verwendung von Natriumbordeuterid (NaBD₄) vorzuziehen. Die Deuterierung erfolgt spezifisch und ist bei den aus Aldosen und Ketosen resultierenden Alditolen an anderer Stelle lokalisiert, was durch die nachfolgende MS nachgewiesen werden kann. Außerdem ist so ersichtlich, ob Alditole ggf. schon zuvor vorhanden waren, da diese nicht deuteriert werden und dementsprechend ihre Masse um eins niedriger ist. Im letzten Schritt erfolgt die Per-O-Acetylierung der freien OH-Gruppen, welche die Alditole stabil und leichter flüchtig macht. Die Alditolacetate werden danach mittels GC und MS untersucht und identifiziert. Die MS dient dabei der Unterscheidung von Triosen, Tetraosen, Pentosen, Hexosen, usw., sowie der Differenzierung von z.B. Aminozuckern, sauren Zuckern oder Neutralzuckern. Außerdem ermöglicht sie, bei Verwendung von NaBD4, die Unterscheidung von Ketosen, Aldosen bzw. zuvor vorhandenen Alditolen. Stereoisomere können mittels MS alleine jedoch nicht unterschieden werden, da sich die Spektren zu sehr ähneln. Bei Wahl einer geeigneten polaren bzw. chiralen Säule erlaubt die GC jedoch eine Unterscheidung von Epimeren (unterschiedliche Konfiguration an einem C-Atom) und Enantiomeren (optischen Isomeren) über ihre unterschiedlichen Retentionszeiten.

3.6.3 Prinzip der Methylierungsanalyse (Verknüpfungsanalyse)

Die Identifizierung der Verknüpfungspositionen von Monosacchariden in Polysacchariden kann mittels Methylierungsanalyse erfolgen. (zur Übersicht siehe Jay 1996, Carpita & Shea 1989). Die Derivatisierungen entsprechen der Alditolacetatmethode, nur wird ein zusätzlicher Schritt, in Form einer Per-O-methylierung der freien Hydroxy-Gruppen im Polysaccharid *vor* der Hydrolyse eingefügt. Durch diese "Markierung" sind nach Hydrolyse und Reduktion zuvor freie OH-Gruppen von denen zu unterscheiden, die aus glykosidischen Bindungen und der Öffnung des Ringschlusses resultieren. Abb. 3.3 auf der nächsten Seite zeigt die Reaktionen der Methylierungsanalyse im Überblick. Die resultierenden partiell methylierten Alditolacetate (PMAA) zeigen charakteristische Fragmentierungsmuster bei der EI-Massenspektrometrie und sind anhand von zahlreich beschriebenen Schlüsselfragmenten zu identifizieren (Björndal *et al.* 1967; 1970a; 1970b; Lindberg 1972; Lindberg & Lönngren 1978; Rauvala *et al.* 1981; Waeghe *et al.* 1983). Epimere PMAA werden anhand ihrer Retentionszeiten in der GC unterschieden.

3.6.4 Durchführung und Präparation von GC-Standardsubstanzen

Konische Probengefäße (3 ml) und Teflondichtungen wurden vor Benutzung für mind. 48 h in H_2SO_4 (95 – 97 %) eingelegt und anschließend zusammen mit neuen Schraubdeckeln dreimal mit H_2O_{deion} und Methanol (MeOH) nachgespült.

Im Fall der Methylierungsanalyse wurde die Methylierung und nachfolgende Aufarbeitung in abgewandelter Form nach Hounsell *et al.* (1996), Blakeney & Stone (1985), Parente *et al.* (1985) und Harris *et al.* (1984) durchgeführt. Hierzu wurden Proben zunächst mit 60-100 μ l DMSO in ein gereinigtes Probengefäß überführt, ggf. mit 10 μ l myo-Inositol-Standard (s.u.) versetzt, mit Argon überschichtet und nach Verschluss des Gefäßes mindestens ü. N. bei RT äquilibriert. Anschließend wurde die Argonatmosphäre erneuert, 200-300 μ l frisch aufgetautes Methanid-Anion (s. 3.2.7) zugefügt und nach Verschluss des Gefäßes für mindestens 1 h bei RT gerührt. Danach wurden 120-180 μ l Methyliodid (MeI) hinzugegeben, erneut mit Argon überschichtet, das Gefäß verschlossen und für 24 h bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurde die Probe mit 200 μ l Dichlormethan (CH₂Cl₂), 100 μ l MeOH und 500 μ l Na₂S₂O₃-Lösung (10 μ g/ μ l) extrahiert. Die organische Phase wurde anschließend noch zweimal mit 200 μ l H₂O_{deion.} unter Verwurf der wässrigen Phasen extrahiert. Die organische Phase wurde abschließend mit 200 μ l 2,2-Dimethoxypropan (2,2-DMP) versetzt und mittels eines durchperlenden Argonstroms bei 40 °C bis zur völligen Trocknung evaporiert.



Abb. 3.3: Derivatisierungsschritte der Methylierungsanalyse (Übersicht):

Zunächst werden die freien OH-Gruppen im zu untersuchenden Polysaccharid methyliert. Durch Hydrolyse mit Trifluoressigsäure entstehen partiell methylierte Monosaccharide. Diese werden durch Reduktion mit Natriumbordeuterid in ihre Alditolform überführt. Abschließend führt die Acetylierung der verbliebenen freien OH-Gruppen zu partiell methylierten Alditolacetaten zu Alditolacetaten (PMAA). Die nachfolgenden Schritte der Methylierungsanalyse erfolgten analog zu denen der Komponentenanalyse mittels Alditolacetatderivatisierung. Hierbei wurden Proben als Festsubstanz oder Lyophilisat in ein gereinigtes Probengefäß überführt. Die Hydrolyse erfolgte modifiziert nach Albersheim *et al.* (1967). Hierzu wurde die Probe mit Argon überschichtet, 300 µl Trifluoressigsäure (2 M) hinzugegeben und, nach festem Verschluss des Gefäßes, für 2 h (Komponentenanalyse) oder 3 h (Methylierungsanalyse) im Trockenschrank bei 120 °C hydrolysiert. Nach Abkühlen wurde bei 40 °C mittels eines Argonstroms, der durch die Lösung perlte, bis zur völligen Trocknung der Probe evaporiert.

Die Reduktion erfolgte verändert nach Harris *et al.* (1984). Hierzu wurde die Probe mit Argon überschichtet, mit 500 µl frisch angesetzter Reduktionslösung (s.u.) versetzt und bei leicht geöffnetem Gefäßdeckel (H₂-Ausstrom!) für 60 min bei 60 °C reduziert. Die Reaktion wurde durch tropfenweise Zugabe von Eisessig gestoppt, bis keine H₂-Entwicklung mehr festzustellen war. Nach Zugabe von 500 µl MeOH (alternativ 2,2-DMP) wurde mittels einem, bei 40 °C durch die Lösung perlenden, Argonstrom evaporiert. Die Zugabe von MeOH (alternativ 2,2-DMP) wurde so oft wiederholt (in der Regel 3-6 mal) bis die Probe trocken war, oder sich nur noch ein Restvolumen von < 20 µl im Probengefäß befand.

Die Acetylierung wurde modifiziert nach Blakeney *et al.* (1983) durchgeführt. Hierbei wurde die Probe mit 100 μ l 1-Methylimidazol und 1 ml Acetanhydrid versetzt und 15 min bei RT acetyliert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem das Reaktionsgemisch in 2 ml H₂O_{deion}. (Vorlage in Birnenkolben) überführt wurde. Das Reaktionsgefäß wurde zweimal mit 1 ml H₂O_{deion}. ausgewaschen, das mit der Probenlösung vereinigt wurde. Nachfolgend wurde zweimal mit 2 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die organischen Phasen wurden dabei in einem anderen Gefäß vereinigt und die wässrige Phase verworfen. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann 4× mit je 4 ml H₂O_{deion}. unter Verwurf der wässrigen Phasen gewaschen. Die organische Phase wurde wieder in ein konisches Probengefäß transferiert und bei 40 °C, mittels eines durch die Lösung perlenden Argonstroms, bis zur völligen Trocknung evaporiert. Anschließend wurde die Probe bei –20 °C aufbewahrt. Vor der gaschromatographischen bzw. massenspektrometrischen Messung wurde die Probe je nach Konzentration in 40 – 100 µl MeOH aufgenommen.

myo-Inositol-Standard:

50 mg	myo-Inositol
ad 10 ml	DMSO

Reduktionslösung:

2 MNH4OH40 mg/mlNaBD4wurde kurz vor Gebrauch in H2Odeion. unter Argonatmosphäre angesetzt.

3.7 Gaschromatographische und massenspektrometrische Methoden

3.7.1 Prinzip der GC/MS

Die Gas-Chromatographie (GC) beruht auf der Trennung von Probengemischen, deren Komponenten unzersetzt verdampfbar sind. Dies geschieht einerseits aufgrund der dynamischen Verteilung der Komponenten zwischen einer chemisch inerten, gasförmigen Phase und einer immobilisierten flüssigen Phase, andererseits aufgrund des Weitertransports der Komponenten durch die mobile Gasphase (zur Übersicht siehe Skoog & Leary 1996, Gottwald 1995, Baars & Schaller 1994, Leibnitz & Struppe 1984).

Hauptfaktoren für die Trennleistung des GC-Systems, welches schematisch mit einem MS als Detektor in Abb. 3.4 dargestellt ist, sind neben Art und Parametern der GC-Säule, das verwendete Trägergas, dessen Flussgeschwindigkeit, die Siedepunkte der Analytkomponenten sowie die Wahl der Temperaturen für Injektor und Säule. Bei der GC wird die Probe nach Einschleusen in einem heißen Injektor schlagartig verdampft und dort als Dampfpfropfen auf den Anfang der Säule gebracht. Je schmaler dieser Pfropfen ist, desto schärfer werden die Peaks der Komponenten am Säulenende. Die Säule wird im Allgemeinen mit Heizraten von einigen Grad Celsius pro Minute aufgeheizt, um eine komplette Trennung in vertretbarer Zeit zu erreichen. Idealerweise verlassen die Komponenten des Probengemisches die Säule örtlich getrennt mit unterschiedlichen Retentionszeiten und gelangen in den Detektor.

Ein Massenspektrometer als GC-Detektor bietet den Vorteil, dass es zusätzliche Informationen über die detektierte Substanz bezüglich Struktur und atomarer Isotopenverhältnisse geben kann. Bei Benutzung eines internen Standards können darüber hinaus auch Aus-



Massenspektrometer

Abb. 3.4: Schematischer Aufbau eines GC/MS-Systemes:

Die Probe wird im Injektor verdampft und während des Laufes durch die GC-Säule in ihre Bestandteile aufgetrennt, die zeitlich getrennt die Säule verlassen. Die Probenmoleküle werden in der Ionenquelle ionisiert, über den Massenanalysator nach Ihrem Masse/Ladungs- (m/z-) Verhältnis aufgetrennt und detektiert. (I = Intensität, t = Zeit, BP = Basispeak).

sagen bezüglich der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der Probe getroffen werden (zur Übersicht siehe Lehmann 1996, Skoog & Leary 1996, Budzikiewicz 1992, Karasek & Clement 1988). Das Prinzip der MS beruht darauf, dass die in das Hochvakuum des Massenspektrometers eingelassenen Probenmoleküle zunächst ionisiert werden. Der erzeugte Strom positiver bzw. negativer Ionen wird dann zum Massenanalysator hin beschleunigt, der die Ionen nach Masse zu Ladungszahl (m/z) trennt. Klassische GC/MS-Systeme vermessen dabei in wenigen Sekunden einen Massenbereich von bis zu 2.000 m/z bei einer Auflösung von 500-2.000. Die Detektion der durch den Massenanalysator gelangten Ionen liefert für jede Substanzprobe ein Massenspektrum, aus dem abgelesen werden kann, welche Ionen in welchen relativen Mengen gebildet wurden. Da die Art der Ionisation erheblichen Einfluss auf das Erscheinungsbild der Massenspektren hat, werden die verwendeten Ionisationsarten im Folgenden vorgestellt.

Elektronenstoß-Ionisation (EI)

Die EI wird oftmals für flüchtige organische Verbindungen genutzt. Bei dieser "harten" Ionisation tritt ein Elektronenstrom mit einer Energie von etwa 70 eV mit den Probenmolekülen in Wechselwirkung. Die Primärreaktion eines Analytmoleküls M, welche das Radikalkation [M]⁺ mit gleicher Molekularmasse wie M erzeugt, lautet:





Aufgetragen sind Masse/Ladungs- (m/z)-Verhältnis (X-Achse) gegen die relative Signalstärke (Y-Achse) in der höchsten Signalintensität (Basispeak), in diesem Fall m/z = 43. Aufgrund der Substanzmasse wäre ein Molekülionenpeak bei m/z = 350 zu erwarten. Aufgrund der hohen Energie, die bei der Elektronenstoßionisation übertragen wird, dominiert die Fragmentierung jedoch so stark, daß kein Molekülion ($M^{+\bullet}$) mehr zu detektieren ist. Die Zahl rechts oben gibt die Gesamtzahl der detektierten Ionen (Counts) an.

$$M + e^{-} \rightarrow [M]^{+} + 2 e^{-}$$

Durch die hiermit verbundene hohe Energieaufnahme erfolgt eine weitreichende Fragmentierung des Molekülions, und es entsteht eine große Zahl positiv geladener Tochterionen mit geringerer m/z als das Mutterion. Bei einigen Molekülarten z.B. den PMAA aus der Methylierungsanalyse kann es passieren, dass die Fragmentierung so sehr dominiert, dass kein Molekülion mehr detektiert werden kann. Dies ist in Abb. 3.5 auf der vorigen Seite gezeigt. Die aus der EI resultierenden Massenspektren geben charakteristische Fragmentierungsbilder der Analytmoleküle wieder, die meist eine zweifelsfreie Identifizierung ermöglichen.

Chemische Ionisation (CI)

Bei der CI wird die zu analysierende Substanz mit einem großen Überschuss eines Reaktandgases zusammengebracht, das zuvor durch Elektronenbeschuss ionisiert wurde. Bei Verwendung von Ammoniak (NH₃) als Reaktandgas dominiert das protonierte NH_4^+ sowie dessen Clusterionen, bei Verwendung von Methan (CH₄) dagegen das protonierte CH_5^+ sowie dessen direktes Reaktionsprodukt $C_2H_5^+$. Diese Reaktandgasionen können nun Analytmoleküle in der Gasphase ionisieren. Dies kann einerseits durch Protonierung erfolgen, wenn die Protonenaffinität der Analytmoleküle größer ist als die der Reaktandionen. Andererseits kann eine



Abb. 3.6: CI-Massenspektrum eines Tri-O-methyl-tri-O-acetyl-hexitols (M = 350 g/mol):

Die chemische Ionisierung mit NH₃ führt i.d.R. zu einer Anlagerung des NH4+-Ions an die Analytmoleküle und so zur Entstehung von [M + NH4]+, bzw. [M + 18]+-Ionen, die das Massenspektrum dominieren. Aufgrund des Substanzmasse ist somit ein Molekülionenpeak bei m/z =368 zu erwarten. Aufgetragen sind Masse/Ladungs- (m/z)-Verhältnis (X-Achse) gegen die relative Signalstärke (Y-Achse) in der höchsten Signalintensität (Basispeak), in diesem Fall m/z = 368. Die Zahl rechts oben gibt die Gesamtzahl der detektierten Ionen (Counts) an. Anlagerung der Reaktandionen an die Analytmoleküle erfolgen, was z.B. bei NH₄⁺ häufig der Fall ist. Diese Form der "weichen" Ionisierung ist sehr viel schonender als die EI, da weniger Anregungsenergie übertragen wird. CI-Massenspektren weisen daher weniger Fragmentierung auf als EI-Spektren und zeigen höhere relative Intensitäten an intakten Analytmolekülionen. Die durch Protonierung entstehenden [M+H]⁺- bzw. [M+1]⁺-Ionen oder durch Anlagerung von beispielsweise NH₄⁺ entstehenden [M+NH₄]⁺-, bzw. [M+18]⁺-Ionen sind meist auch Basispeaks der Spektren. Ein Beispiel für ein CI-Spektrum, in dem das "Quasi-Molekülion" durch eine NH₄⁺-Anlagerung eine um 18 höhere Masse aufweist, ist in Abb. 3.6 auf der nächsten Seite dargestellt. Der Vorteil der CI liegt also darin, dass die Molekülmasse der Analytsubstanz direkt ermittelt werden kann. Die massenspektrometrische Untersuchung mittels CI ist insbesondere bei der Untersuchung von Substanzen, welche bei EI keine oder nur geringe Intensitäten des Molekülions aufweisen, zur zweifelsfreien Identifizierung des Analyten nötig.

3.7.2 Durchführung von GC/MS-Untersuchungen

GC/MS-Messungen wurden mit den GC/MS-Systemen HP5890 II/ HP5972 (Einzelquadrupol-MS), SSQ[®] 7000-MS (Einzelquadrupol-MS), Varian[®] 1700/CH7A (Sektorfeld-MS) oder Varian[®] 3400/ Incos[™] 50 (Einzelquadrupol-MS) unter Verwendung nicht-polarer Optima[®]-1-Säulen durchgeführt. Mit allen GC/MS-Systemen wurden EI-MS-Messungen, mit dem Varian[®] 3400/ Incos[™] 50 zusätzlich NH₃-CI-MS- bzw. mit dem SSQ[®] 7000-MS zusätzlich CH₄-CI-MS durchgeführt. Bei allen Messungen diente Helium als Trägergas. Injektor und Transfer-Line wurden bei 280 °C gehalten. Bei Messungen von Alditolacetaten der Komponentenanalyse wurde die Temperatur des GC-Säulenofens i.d.R. für 2,5 min bei 170 °C gehalten, stieg dann mit 1 °C/min auf eine Endtemperatur von 190 °C, die für 15 min gehalten





Zwischen dem Einlass des Massenspektrometers und einer metallbedampften Kapillare, in der sich die Probe befindet, wird eine Spannung angelegt. Negative Ionen der Probe werden entladen, während sich positive Ionen am Meniskus der Flüssigkeit sammeln. Hierdurch wird ein feiner Nebel aus Tröpfchen entlassen, deren Volumen durch Verdunstung des Lösungsmittels abnimmt. Durch die Zunahme der Ladungsdichte kommt es zu Coulombexplosionen, wodurch einzelne Ionen in der Gasphase entstehen, die in das Massenpektrometer gelangen. wurde. Bei Messungen von PMAA aus der Methylierungsanalyse wurde die Temperatur des GC-Säulenofens i.d.R. für 1 min bei 120 °C gehalten, stieg dann mit 1 °C/min auf 190 °C und danach mit 10 °C/min auf eine Endtemperatur von 280 °C, die für 15 min gehalten wurde. Probenvolumina von 0,5-2 μ l, wurden splitlos injiziert und 1 min nach Injektion wurde das Splitventil (1:10) geöffnet. Die Scanbereiche der Massenspektrometer betrugen i.d.R 40 – 550 amu (atomare Masseneinheit) in ca. 1,5 s. Bei geringen Probenkonzentrationen wurde ggf. auch durch selektives Scannen ausgewählter Massenbereiche (engl. *selective ion monitoring* – SIM) die Empfindlichkeit verstärkt. Die Messungen wurden in freundlicher Kooperation mit Herrn Dr. U. Matthiesen (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, D) und mit Herrn Dipl.-Ing. Fransiscus Susanto (Deutsches Diabetes Forschungsinstitut, Düsseldorf, D) durchgeführt.

3.7.3 Prinzip der Elektrospray-Ionisations-MS

Die Elektrospray-Ionisation (ESI) ist ebenfalls eine "weiche" Ionisation (zur Übersicht s. Meng *et al.* 1988; Fenn *et al.* 1989; Costello 1997), deren Prinzip in Abb. 3.7 auf der vorherigen Seite dargestellt ist. Die Probe befindet sich hierbei in einer dünnen metallbedampften Kapillare, zwischen der und dem Einlass des Massenspektrometers eine Spannung angelegt wird. Im sog. Positiv-Modus dient die Kapillare als Anode, an der negative Ionen der Probe entladen werden. Gleichzeitig sammeln sich positive Ionen am Meniskus der Flüssig-keit. Dadurch destabilisiert sich dieser und entlässt einen feinen Nebel aus Tröpfchen, die durch Verdunsten des Lösungsmittels immer kleiner werden. Durch die damit verbundene Zunahme der Ladungsdichte kommt es zu Coulombexplosionen, deren Resultat einzelne



Abb. 3.8: Hybrid-Massenspektrometer API QStarTM Pulsar i:

Schematischer Aufbau des ESI-QqTOF-Massenspektrometer: Das Gerät hat drei Quadrupol-Massenanalysatoren (Q1-3), die bei ESI-Einzel-MS-Messungen hauptsächlich der Fokussierung und Stabilisierung des Ionenstroms dienen. Die eigentliche Massenanalyse geschieht mit dem Flugzeit- (TOF)-Analysator, der aus einem Ionenbeschleuniger, einem Ionenreflektor und dem Detektor besteht. Für ESI-MS/MS-Untersuchungen werden einzelne Vorläuferionen mit Hilfe des Q1 aus dem Ionenstrom selektiert. Diese können in der Kollisionszelle durch Zusammenstöße mit N₂-Molekülen fragmentieren und die Fragmentionen mit dem TOF-Analysator detektiert werden. Ionen in der Gasphase sind. Aufgrund dieses Prozesses werden zumeist mehrfach geladene Analytionen erzeugt, was darin resultiert, dass sich ein Analytmolekül auf mehrere Peaks unterschiedlicher Ladung verteilt.

3.7.4 Durchführung von Nanospray-ESI-MS

Die Messungen wurden mit dem Hybrid-MS API QStarTM Pulsar I (ESI-QqTOF-MS) (s. Abb. 3.8, vorherige Seite) unter Verwendung von Nanospray-Nadeln (Probenvolumen ~1 μ l) durchgeführt. Gemessen wurden Positivionenspektren ggf. mit MS/MS-Analysen. Die Messungen wurden in freundlicher Kooperation mit Frau Dr. S. Metzger (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, D) durchgeführt.

3.8 Biophysikalische Methoden

3.8.1 Aggregation von PrP in vitro

Prinzip des in-vitro-Konversionssystems

Für die Induktion der Aggregation von PrP *in vitro* wurde das von Post *et al.* (1998) etablierte *in-vitro*-Konversionssystem genutzt, welches in Abbildung 3.9 dargestellt ist. Hierbei liegt rec PrP in Gegenwart mittlerer SDS-Konzentrationen (~0,2 %) in überwiegend α -helikal strukturierten Monomeren vor, die unstrukturierte Anteile (random coil) aufweisen. Die Verringerung der SDS-Konzentration führt über Dimere mit α -helikal dominierter Konformation zu löslichen β -strukturreichen Oligomeren, die schließlich bei SDS-Konzentrationen $\leq 0,01 \%$ SDS in Form unlöslicher Aggregate ausfallen (Post *et al.* 1998; Jansen *et al.* 2001; Birkmann 2000).



Abb. 3.9: Schema des in-vitro-Konversionssystem nach Post et al. (1998)

rec PrP oder PrP^C ist in Anwesenheit von 0.2 % SDS löslich und weist eine α -helikal dominierte Struktur mit Random-Coil-Anteilen auf. Bei Ausdünnen des SDS auf Konzentrationen \leq 0.01 % SDS weist PrP eine β -Faltblatt-dominierte Struktur auf, wird unlöslich und aggregiert. Durch Zugabe von Polysacchariden z. B. dem Prion-Scaffold zu diesem Prozess sollen Co-Aggregate von PrP und den zugegebenen Polysacchariden entstehen.

Durchführung:

Abhängig von nachfolgenden Untersuchungen wurden verschiedene Konzentrationen unterschiedlicher PrP-Spezies in 10 mM NaP_i mit 0,05 – 0,2 % SDS vorgelegt und mit 10 mM NaP_i auf die gewünschten SDS-Konzentrationen ausgedünnt. Der Einfluss von Polysacchariden wurde entweder durch Zugabe der Komponenten vor oder mit dem Ausdünnen des SDS untersucht. I.d.R. wurden die Proben für die gewünschten Zeiten bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen wurden auch andere Proteine als PrP eingesetzt.

3.8.2 Circulardichroismus-Spektroskopie

Prinzip des Circulardichroismus (CD)

Asymmetrische Moleküle haben verschiedene Absorptionskoeffizienten für rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht, deren Differenz durch die CD-Spektroskopie bestimmt wird. Bei Proteinen wird der CD-Effekt durch ihre asymmetrische Sekundärstruktur verursacht. Daher zeigen Sekundärstrukturelemente wie α -Helix oder β -Faltblatt jeweils unterschiedliche CD-Spektren im fernen UV-Bereich (170 – 260 nm, s Abb. 3.10). Anhand von CD-Spektren lassen sich so Rückschlüsse auf relative Anteile einzelner Sekundärstrukturelemente im Protein ziehen.

CD-Messungen

Messungen von CD-Spektren wurden mit dem Spektralpolarimeter J715 durchgeführt, welches zu Beginn jeder Messreihe mit Ammonium-d-Campher-10-Sulfat geeicht wurde. Sofern Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm genutzt wurden, betrug das Messvolumen 180-



Abb. 3.10: CD-Spektren typischer Sekundärstrukturelemente von Proteinen

Aufgetragen ist die molare Elliptizität (Y-Achse) gegen die Wellenlänge (X-Achse). Nach Greenfield & Fasman (1969).

200 µl bei einer Proteinkonzentration von 50-200 ng/µl. Bei Verwendung von Mikroküvetten mit 1 cm Schichtdicke betrug das Messvolumen ~75 µl bei einer Proteinkonzentration von 5-20 ng/µl. Spektren wurden i.d.R. mit einer Geschwindigkeit von 50 nm/min, einer Auflösung von 1 nm, einer Responsezeit von 1-4 s, bei RT von 185-260 nm (200-260 nm bei Mikroküvetten) aufgenommen. Dabei wurden je Probe 10-20 Spektren akkumuliert, gemittelt und gegen das entsprechende Pufferspektrum korrigiert. Während der Messungen wurde die Probenkammer mit Stickstoff gespült.

3.8.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Prinzip der FCS

Das Prinzip der FCS basiert auf der Messung von Signalfluktuationen welche entstehen, wenn einzelne Moleküle durch ein sehr kleines Messvolumen (~1 fl) hindurch diffundieren. Hierzu müssen die zu untersuchenden Probenbestandteile fluoreszent und löslich sein. Aus den Signalfluktuationen können dann mittels der Korrelationsfunktion die Diffusionszeiten der den Messfokus passierenden Probenbestandteile ermittelt werden. Hieraus wiederum lässt sich auch deren Molekulargewicht abschätzen. Die spezifische Helligkeit von Probenbestandteilen ist ein weiterer Parameter, der sich mit der Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (FIDA) ermitteln lässt. Dies kann zur Untersuchung von Aggregationskinetiken herangezogen werden. Insbesondere das Auffinden von größeren, mehrfach fluoreszenzmarkierten Aggregaten mittels FCS/FIDA lässt sich durch aktives Scannen der Probe verbessern. Die Wechselwirkung zweier verschiedener Spezies kann darüber hinaus mit der Zweifarbenanalyse untersucht werden. Hierzu müssen die zu untersuchenden Molekülspezies mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert sein, deren Emmisionspektren sich möglichst nicht überlagern. Binden nun Träger unterschiedlicher Fluorophore aneinander oder an einen gemeinsamen Interaktionspartner, so ergibt sich eine Koinzidenz, welche mittels 2D-FIDA untersucht werden kann. (Zur Einführung in FCS, FIDA und Zweifarbenanalyse s. Eigen & Rigler 1994; Völcker et al. 1996; Schäfer 2002)

Messungen

Messungen erfolgten am Einstrahl-FCS Confocor[®] und am Zweistrahl-FCS Olympus[®]. Vermessen wurden Proben der *in-vitro*-Konversion (s. 3.8.1), wobei die Ansätze zusätzlich fluoreszenzmarkiertes rec PrP (s. 3.2.4) in optimierter Verdünnung enthielten. Sofern Polysaccharide mittels Zweifarbenanalyse ebenfalls detektiert werden sollten, wurde fluoreszenzmarkiertes ConA (s.2.5.13) zu den Ansätzen gegeben.

3.8.4 Differentielle Ultrazentrifugation (Löslichkeitsspin)

Die Löslichkeit von Proteinen wurde mittels differentieller Ultrazentrifugation bestimmt. Hierbei gelten Partikel, die sich nach Zentrifugation für eine Stunde bei $100.000 \times g$ im Überstand befanden, als löslich (Hjelmeland & Chrambach 1984). Proben wurden in Mikrozentrifugengefäßen für 1 h mit 42.000 rpm ($100.000 \times g$) im TLA-45-Rotor bei 25 °C mit der Optima TL Ultrazentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände vorsichtig abgenommen und in Schraubdeckel-Probengefäße überführt. Im Falle von PrP-Ansätzen aus der *in-vitro*-Konversion (s. 3.8.1) wurde oftmals anschließend die relative Löslichkeitsverteilung mittels Dot-Blot (s. 3.5.4) oder SDS-PAGE (s. 3.5.1) und anschließender Silberfärbung (s. 3.5.2) oder Westernblot (s. 3.5.3) bestimmt. Hierzu wurden nach der Zentrifugation die Überstände auf 0,2 % SDS eingestellt und die Pellets in 10 mM NaPi, pH 7,2 mit 0,2 % SDS resuspendiert.

3.9 Mikroskopische Methoden

3.9.1 Lichtmikroskopie

Um lichtmikroskopisch erkennbare PrP-Aggregate aus der *in-vitro*-Konversion (s. 3.8.1) zu erhalten wurden PrP-Konzentrationen von ~100 ng/µl bei $\leq 0,01$ % SDS pro Ansatz verwendet. Nach 24 h Inkubation bei RT wurde ein Teil der Probe nach Resuspension auf einen Objektträger gebracht. Nach Auflegen eines Deckglases wurde dieses mit Nagellack versiegelt, und die Probe mit dem Polarisationsphotomikroskop III phasenkontrastmikroskopisch ggf. über längere Zeitintervalle betrachtet.

3.9.2 Fluoreszenzmikroskopie

Für Fluoreszenzmikroskopie mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie wurden rec PrP-Konzentrationen von ~100 ng/µl unter Zusatz verschiedener Mengen fluoreszenzmarkierten rec PrPs (s. 3.2.4) und ggf. 10 mg/ml Glykogen bei $\leq 0,01$ % SDS *in vitro* aggregiert (vgl. 3.9.1). Nach 36 h Inkubation bei 37 °C im Dunkeln wurde anti-Glykogen-Antikörper (s. 2.4) in einer Verdünnung von 1:25 zugegeben und weitere 3 h bei 37 °C im Dunkeln geschüttelt. Anschließend wurde GaM-Cy2-Antikörper (s. 2.4) in einer Gesamtverdünnung von 1:2.500 zugegeben und nochmals 2 h unter Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend wurden Teile der Proben nach sorgfältiger Resuspension auf einen Objektträger gebracht. Nach Auflegen eines Deckglases, wurde dieses mit Nagellack versiegelt und die Probe mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop TCS NT betrachtet. Diese Messungen wurden in freundlicher Kooperation mit Herrn Dr. Olaf Bossinger (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, D) durchgeführt.

3.9.3 Elektronenmikroskopie

Vorbereitend für die Elektronenmikroskopie wurden Formvar[®]/Kohle-Kupfernetzchen (600 mesh) zunächst beglimmt. Dann wurden Probenvolumina von 5 µl für 30 s an die Netzchen adsorbiert und anschließend für einige Sekunden mit frisch sterilfiltrierter Ammoniummolybdatlösung (2 % w/v) negativ gefärbt. Die Färbelösung wurde vorsichtig mit einem Filterpapier entfernt und die getrockneten Proben wurden abschließend im Transmissions-EM Tecnai G² F20 bei 80 kV und Standard-Vergrößerungen von 25.000 oder 40.000 betrachtet. Die Elektronenmikroskopische Untersuchung und Photodokumentation wurde freundlicherweise von K.-W.-Leffers in Kooperation mit Prof. Dr. H. Wille an der University of California, San Fransisco, USA durchgeführt.
4. Ergebnisse

In den folgenden Abschnitten werden zunächst die Ergebnisse der Glykoanalysen des Prion-Scaffold (Komponenten-, Verknüpfungs- und Stereochemieanalysen) dargestellt, gefolgt von denen zur Optimierung der Präparation des Prion-Scaffold. Hiernach werden die Resultate der Untersuchungen zum Einfluss von Polysacchariden auf die *in-vitro*-Konversion von PrP bezüglich Sekundärstruktur, Löslichkeit und Aggregationsverhalten sowie der Charakterisierung der Aggregatstrukturen vorgestellt. Anschließend erfolgt eine vorläufige Auswertung der noch bis März 2004 laufenden Infektiositätsstudien zur *de-novo*-Generation von Prionen. Abschließend werden die Ergebnisse der PrP-Analysen bezüglich Modifikationen mit Advanced Glycation Endproducts (AGEs) sowie der Untersuchungen zum Einfluss von AGEs auf die *in-vitro*-Konversion von PrP vorgestellt.

4.1 Glykoanalysen des Prion-Scaffold

Die bisherigen Informationen zum Prion-Scaffold (s. 1.3.4) beschränkten sich auf Material, das aus Prionrods (s. 1.3.2) gewonnen wurde (Dumpitak, 1998). Prionrods, deren Hauptkomponenten das N-terminal verkürzte PrP 27-30 ist, resultieren aus speziellen Aufreinigungsprozeduren des Scrapie-Erregers (Prusiner *et al.* 1983, Diringer *et al.* 1998). Daher war nicht auszuschließen, dass es sich bei dem gefundenen Polysaccharidgerüst um ein präparationsbedingtes Aufreinigungsartefakt handelte. Um weitere Informationen über das Vorkommen und die Struktur des Prion-Scaffolds zu erhalten, wurden Komponentenanalysen und Verknüpfungsanalysen mit Präparationen des Prion-Scaffold aus verschiedenen Prion- und Vergleichspräparationen durchgeführt. Zum Abschluss der glykoanalytischen Untersuchungen wurde die Stereochemie der glykosidischen Bindungen des Prion-Scaffolds analysiert.

4.1.1 Komponentenanalysen

Die Auswertung der GC/MS-Untersuchungen der Komponentenanalysen wird in 4.1.1.1 exemplarisch durchgeführt und die Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten tabellarisch zusammengefasst.

4.1.1.1 Komponentenanalyse des PK-Überstandes von PrP 27-30

Der nach der Präparation des Prion-Scaffold aus 465 µg PrP 27-30 (präpariert nach Prusiner *et al.* 1983) verbleibende Überstand der PK-Verdauung (s. 3.2.2) wurde mit einem Rotationsverdampfer aufkonzentriert und auf seine Zuckerbestandteile hin untersucht. Die GC/MS-Untersuchung der mittels Alditolacetatmethode (s. 3.6.2 und 3.6.4) derivatisierten Probe ergab das in Abb. 4.1 auf der nächsten Seite gezeigte Chromatogramm. Über die gesamte Zeit des Chromatographielaufes wurden Elektronenstoß-Ionisations- (EI-) Massenspektren (Scans)



Abb. 4.1: GC/MS-Chromatogramm zur Komponentenanalyse

Chromatogramm der GC/EI-MS-Analyse des löslichen Überstandes einer intensiven PK-Verdauung von 465 μ g PrP 27-30 nach Derivatisierung mittels Alditolacetatmethode zur Bestimmung der Saccharidkomponenten. Die Reduktion wurde mit NaBD₄ durchgeführt. Den Retentionszeiten sind massenspektrometrische Scans in aufsteigender Nummerierung zugeordnet (X-Achse). Die Signalintensität des stärksten Signals wird gleich 100 % gesetzt (Y-Achse). Die Zahl rechts oben ist ein Maß für den gemessenen Gesamtionenstrom (Counts).

(s. 3.7.1) aufgenommen. Solche EI-Massenspektren, die Substanzpeaks zuzuordnen waren, wurden entweder mittels computergestützter Spektrenbibliotheksrecherche, Vergleich mit Literaturspektren oder den Spektren selbstsynthetisierter Standardsubstanzen (s. 3.6.4) identifiziert. Abb. 4.2.A auf der folgenden Seite zeigt ein EI-Massenspektrum des Chromatogramms aus Abb. 4.1, das zum Substanzpeak bei Scan-Nr. 378 (Retentionszeit: 18:54 min:s) gehört. Der Vergleich mit dem EI-MS-Spektrum einer Standardsubstanz, die mittels Alditolacetat-Derivatisierung aus N-Acetylglucosamin gewonnen wurde, zeigt ein annähernd identisches Fragmentierungs- und Intensitätsverteilungsmuster (s. Abb. 4.2.B). Da im EI-MS-Spektrum kein Molekülion detektierbar war (vgl. 3.7.4), wurde das Molekulargewicht beider Substanzen mittels chemischer Ionisations-(CI-) Massenspektrometrie (s. 3.7.1) bestimmt. Dabei wurde für beide Substanzen ein identisches Molekulargewicht von 434 g/mol ermittelt. Auf Basis der MS-Daten kann die Substanz somit als 1,3,4,5,6-Penta-O-acetyl-(1-deuterio)-(2-N-methylacetamid)-hexitol identifiziert werden. Um Stereoisomere zu unterscheiden, wurden ferner die Retentionszeiten der zu identifizierenden Substanzen mit denen selbstsynthetisierter Standards (s. 3.6.4) verglichen. Auch diese stimmten für beide Substanzen überein. In diesem Fall konnte also auf Grundlage von drei Parametern – Fragmentierungsmuster, Molekulargewicht und Retentionszeit - die Substanz zweifelsfrei als 1,3,4,5,6-Penta-O-acetyl-(1-deuterio)-(2-N-methylacetamid)-glucitol identifiziert werden, das durch die Alditolacetat-Derivatisierung aus N-Acetylglucosamin entsteht (s. Abb. 4.3, nächste Seite). I.d.R.





A: El-Massenspektrum zum Substanzpeak bei Scan-Nr. 378 (Retentionszeit: 18:54 min:s) des Chromatogramms in Abb. 4.1. Die Fragmentionen sind nach ihrer Masse/Ladung (X-Achse) gegen ihre relative Intensität (Y-Achse) aufgetragen. Aufgrund der geringen Signalintensität wurde für diese Abbildung über die Scans 377-380 summiert (Retentionszeiten 18:51-19:00 min:s) und für eine bessere Auflösung der Signale niedrigerer Intensität das Signal der zweithöchsten Intensität (m/z=85) zum Basispeak (100 % Intensität) erhöht. **B:** El-Massenspektrum von N-Acetylglucosamin nach Alditolacetatderivatisierung mit NaBD₄-Reduktion.

sind bei der Komponentenanalyse jedoch auch nur die beiden Parameter Retentionszeit und Molekulargewicht zur Identifizierung ausreichend. In die durchgeführten Auswertungen gingen im weiteren nur solche Substanzpeaks ein, die im Vergleich zu den Referenzen zusätzlich vorkamen und die oberhalb der massenspektrometrischen Nachweisgrenze lagen (zumeist Peakflächen >1,5 %). Auf diese Weise wurden die in Tab. 4.1 aufgeführten Substanzen als Bestandteile des PK-Überstandes (s. 3.2.2) bestimmt, welcher bei der Präparation des Prion-



Abb. 4.3: Alditolacetatderivatisierung von N-Acetylglucosamin

N-Acetylglucosamin wird durch Hydrolyse, Reduktion mit NaBD₄ und anschließender Acetylierung in 1,3,4,5,6-Penta-O-acetyl-(1-deuterio)-(2-*N*-methylacetamid)-glucitol überführt.

Scaffold aus PrP 27-30 verblieb. Mit Ausnahme von Sialinsäure, die mit der genutzten Methode nicht nachgewiesen werden kann (Fox *et al.* 1989), wurden alle Hauptkomponenten der N-Glykosylierungen und des GPI-Ankers von PrP detektiert (i.E. Mannose, Galactose, Fucose, N-Acetylglucosamin). Darüber hinaus wurde Glucose als dominierende Zuckerkomponente detektiert. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass Anteile des Prion-Scaffold während der PK-Verdauung der Prionrods freigesetzt wurden und in Lösung gingen. Auch wäre es möglich, dass die detektierte Glucose in der löslichen Fraktion des PK-Überstandes auf Saccharose zurückzuführen ist, die von Saccharosegradientenzentrifugationen bei der Prionrod-Präparation herrührt. Da die verwendeten Prionrods vor der Präparation des Prion-Scaffolds jedoch mehrfach mit H₂O_{deion.} gewaschen wurden (s. 3.2.1), erscheint es höchst unwahrscheinlich, dass Saccharose-Verunreinigungen in den Präparaten verblieben waren.

Tab. 4.1: Ergebnisse der Komponentenanalyse des PK-Uberstandes von PrP 27-30:
Relative Verhältnisse auf Grundlage der Peakflächen des GC-EI-MS-Laufes normiert auf Glucose.
Die Zuordnungen beruhen auf Retentionszeit, Molekulargewicht (Mw) und El-MS-Identifizierung.
Verwendete GC-Säule: Optima [®] 1 (25 m / 0,32 mm iD).

Retentionszeit	Mw [g/mol]	Identifizierung (nach EI-MS)	Zuordnung	relatives
[min:s]	(nach CI-MS)			Verhältnis
6:00	377	1,2,3,4,5-Penta-O-acetyl-(1-	Fucose	0,8
		deuterio)-(6-deoxy)-hexitol		
12:18	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)-	Mannose	0,6
		hexitol		
12:39	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)-	Glucose	1
		hexitol		
12:57	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)-	Galactose	0,5
		hexitol		
18:54	434	1,3,4,5,6-Penta-O-acetyl-(1-	N-Acetylglucosamin	0,4
		deuterio)-(2-N-methylacetamid)-		-
		hexitol		
Weitere detektie	rte Substanzen [F	Retentionszeit in min:s]: Palmitinsäu	re [8:36], Stearinsäure	[15:36]

Tab. 4.2: Ergebnisse der Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 27-30 (AG Prusiner).

Die Zuordnung beruht auf Retentionszeit, Molekulargewicht (Mw) und El-MS-Identifizierung. Verwendete GC-Säule: Optima[®] 1 (25 m / 0,32 mm iD).

Retentionszeit [min:s]	Mw [g/mol] (nach CI-MS)	Identifizierung (nach EI-MS)	Zuordnung		
12:39	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)- hexitol	Glucose		
Weitere detektierte Substanzen [Retentionszeit in min:s]:					
Inositol [12.15]	(wurde der Pränar	ation als externer Standard zugegeb	pen)		

4.1.1.2 Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 27-30

Bislang lagen nur Komponentenanalysen des Prion-Scaffold aus PrP 27-30 vor, das mit der Präparationsmethode nach Prusiner *et al.* (1983) gewonnen wurde. Zum Vergleich wurde Prion-Scaffold aus 84,5 µg PrP 27-30 (nach Prusiner *et al.* 1983) und aus 4 Hirnäquivalenten (HÄ) PrP 27-30 (nach Diringer *et al.* 1998) gewonnen und mittels Komponentenanalyse auf seine Zuckerbestandteile untersucht. Dabei entspricht 1 HÄ etwa 100 µg PrP 27-30 (Thomzig *et al.* 2003). Die Ergebnisse dieser Analysen sind in den Tabellen 4.2 (Material der AG Prusiner) und 4.3 (Material der AG Diringer) aufgelistet. Einziger Zuckerbestandteil des aus PrP 27-30 der AG Prusiner gewonnenem Prion-Scaffold war Glucose, womit die Ergebnisse von Dumpitak (1998) reproduziert werden konnten. Die Präparation des Prion-Scaffold aus PrP 27-30 der AG Diringer zeigte darüber hinaus Mannose, Galactose, Fucose und N-Acetyl-glucosamin als Zuckerbestandteile. Da in dieser Präparation mittels Westernblot Reste von PrP detektierbar waren (s. 4.2.1) sind die detektierten Zucker auf N-Glykosylierungen und GPI-Anker des verbliebenen PrP zurückzuführen.

Tab. 4.3: Ergebnisse der Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 27-30 (AG Diringer):

Relative Verhältnisse auf Grundlage der Peakflächen des GC-EI-MS-Laufes normiert auf Glucose. Die Zuordnungen beruhen auf Retentionszeit, Molekulargewicht (Mw) und EI-MS-Identifizierung. Verwendete GC-Säule: Optima[®] 1 (25 m / 0,32 mm iD).

Retentionszeit	Mw [g/mol]	Identifizierung (nach EI-MS)	Zuordnung	relatives		
[min:s]	(nach CI-MS)			Verhältnis		
6:21	377	1,2,3,4,5-Penta-O-acetyl-(1-	Fucose	0,2		
		deuterio)-(6-deoxy)-hexitol				
12:48	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)-	Mannose	0,4		
		hexitol				
13:09	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)-	Glucose	1		
		hexitol				
13:27	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)-	Galactose	0,4		
		hexitol				
18:45	434	1,3,4,5,6-Penta-O-acetyl-(1-	N-Acetylglucosamin	<0,1		
		deuterio)-(2-N-methylacetamid)-				
		hexitol				
Weitere detektierte Substanzen [Retentionszeit in min:s]: Methylpalmitat [8:03], Methylstearat [14:27],						
Inositol [12:45]	Inositol [12:45] (wurde der Präparation als externer Standard zugegeben)					

Retentionszeit [min:s]	Mw [g/mol] (nach CI-MS)	Identifizierung (nach EI-MS)	Zuordnung	relatives Verhältnis
12:29	435	nicht möglich	Mannose	0,2
12:54	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)- hexitol	Glucose	1
13:13	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)- hexitol	Galactose	0,5
19:22	434	nicht möglich	N-Acetylglucosamin	<0,1

Relative Verhältnisse auf Grundlage der Peakflächen des GC-CI-SIM-MS-Laufes (Range 450-460), normiert auf Glucose. Zuordnungen beruhen auf Retentionszeit, Molekulargewicht (Mw) und, soweit möglich, EI-MS-Identifizierung. Verwendete GC-Säule: Optima[®] 1 (25 m / 0,32 mm iD).

Tab. 4.4: Ergebnisse der Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 33-35:

4.1.1.3 Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 33-35 (PrP^{Sc})

Die Präparation von PrP^{sc} (Turk *et al.* 1988) liefert das Volllängen-Protein PrP 33-35 (PrP^{sc}). Zum Vergleich mit dem aus PrP 27-30 gewonnenem, wurde Prion-Scaffold aus 240 µg PrP 33-35 (s. 2.2.2) präpariert und mittels Komponentenanalyse auf seine Zuckerbestandteile hin untersucht. Die Signale der Zuckerderivate waren bei der EI-MS-Messung sehr niedrig und aufgrund dessen z.T. eine Identifizierung über die Fragmentierungsmuster nicht möglich. Daher wurde zusätzlich eine CI-MS-Messung mit selektiver Ionendetektion (SIM) über die Massen 450-460 durchgeführt, um die Signale der Derivate von Neutralhexosen und N-Acetylhexosaminen zu verstärken. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.4 zusammengefasst. Glucose - als Marker für das Prion-Scaffold – wurde als Haupt-Zuckerkomponente detektiert. Darüber hinaus wurden Galactose, Mannose und N-Acetylglucosamin gefunden, was darauf hinweist, dass auch hier Rest-PrP in der Präparation vorhanden war. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Probe zusätzlich geringe Mengen anderer Zucker, wie z.B. Fucose, enthielt.

4.1.1.4 Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus ME7- und RML-Prionisolaten

Als weitere Prion-Präparation wurden Prionisolaten des ME7- und RML-Scrapiestammes (s. 2.2.3 und 2.2.4) untersucht. Aus jeweils 100 µg Prionisolat wurde Prion-Scaffold gewonnen und mittels Komponentenanalyse analysiert. Hierbei waren in beiden Proben mittels EI-MS keine Signale von Zuckerderivaten detektierbar. Daher wurden die Proben durch Verdampfung des Lösungsmittels aufkonzentriert und anschließend CI-SIM-MS-Messungen

Tab. 4.5: Ergebnisse der Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus ME7-Prionen: Relative Verhältnisse auf Grundlage der Peakflächen des GC-CI-SIM-MS-Laufes (Range 450-460), normiert auf Glucose. Zuordnungen beruhen auf Retentionszeit und Molekulargewicht (Mw). Verwendete GC-Säule: Optima[®] 1 (25 m / 0,32 mm iD).

Retentionszeit [min:s]	Mw [g/mol] (nach CI-MS)	Identifizierung (nach EI-MS)	Zuordnung	relatives Verhältnis
12:26	435	nicht möglich	Mannose	0,2
12:45	435	nicht möglich	Glucose	1
13:07	435	nicht möglich	Galactose	0,3

über die Massen 450-460 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 4.5 (ME7-Prionisolat) und 4.6 (RML-Prionisolat) aufgeführt. Bei beiden Proben waren Signalintensitäten sehr gering, was auf einen sehr geringen Gehalt an Sacchariden insgesamt hinwies. Dennoch wurde in beiden Fällen Glucose als hauptsächlicher Zuckerkomponente detektiert. Darüber hinaus wurde in beiden Präparationen Galactose und Mannose detektiert, die auch hier als Hinweis auf verbliebenes PrP gewertet wurden. Aufgrund der durchgeführten Untersuchungen kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass die Probe zusätzlich geringe Mengen anderer Zucker, wie z.B. Fucose, enthielt.

Tab. 4.6: Ergebnisse der Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus RML-Prionen: Relative Verhältnisse auf Grundlage der Peakflächen des GC-CI-SIM-MS-Laufes (Range 450-460), normiert auf Glucose. Zuordnungen beruhen auf Retentionszeit und Molekulargewicht (Mw). Verwendete GC-Säule: Optima[®] 1 (25 m / 0,32 mm iD).

Retentionszeit	Mw [g/mol]	Identifizierung (nach EI-MS)	Zuordnung	relatives
[min:s]	(nach CI-MS)			Verhältnis
12:26	435	nicht möglich	Mannose	0,4
12:46	435	nicht möglich	Glucose	1
13:07	435	nicht möglich	Galactose	0,3

4.1.1.5 Komponentenanalyse des PK-Pellets aus gesundem Hamsterhirn

Als Vergleichspräparation wurde eine Präparation nach Diringer *et al.* (1998) aus Hirnen gesunder Hamster (s. 2.5) herangezogen. Hierzu wurde aus 4 HÄ gesunder Hamsterhirne mittels Prion-Scaffold-Präparation ein PK-resistentes Pellet gewonnen und auf seine Zuckerbestandteile hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Komponentenanalyse sind in Tab 4.7 aufgelistet. Auch hier ist Glucose die Hauptkomponente der detektierten Zucker. Nur Galactose wurde als weitere Zuckerkomponente detektiert. Da unbekannt ist, welche Proteine mittels der Prionrod-Präparation aus gesunden Hirnen aufgereinigt werden, ist eine Zuordnung der detektierten Zucker nicht möglich. Aufgrund dieser Ergebnisse alleine kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Polysaccharid des Prion-Scaffold ein Bestandteil gesunder Hirne ist.

Tab. 4.7: Ergebnisse der Komponentenanalyse einer Vergleichspräparation aus gesunden Hamsterhirnen:

Relative Verhältnisse auf Grundlage der Peakflächen des GC-EI-MS-Laufes normiert auf Glucose. Zuordnungen beruhend auf Retentionszeit, Molekulargewicht (Mw) und EI-MS-Identifizierung. Verwendete GC-Säule: Optima[®] 1 (25 m / 0,32 mm iD).

Retentionszeit [min:s]	Mw [g/mol] (nach CI-MS)	Identifizierung (nach EI-MS)	Zuordnung	relatives Verhältnis	
12:54	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)-	Glucose	1	
		hexitol			
13:12	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)-	Galactose	0,6	
		hexitol			
Weitere detektierte Substanzen [Retentionszeit in min]: Methylpalmitat [7:45], Methylstearat [14:15],					
Inositol [12:30] (wurde der Präparat	ion als externer Standard zugegebe	n)		

Tab. 4.8: Ergebnisse der Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus ScN2a-Zelllysaten: Relative Verhältnisse auf Grundlage der Peakflächen des GC-CI-SIM-MS-Laufes (Range 450-460), normiert auf Glucose. Zuordnungen beruhen auf Retentionszeit, Molekulargewicht (Mw) und, soweit möglich, EI-MS-Identifizierung. Verwendete GC-Säule: Optima[®] 1 (25 m / 0,32 mm iD).

Retentionszeit	Mw [g/mol]	Identifizierung (nach EI-MS) Zuordnung		relatives	
[min:s]	(nach CI-MS)			Verhältnis	
12:29	435	nicht möglich	Mannose	0,2	
12:48	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)-	Glucose	1	
		hexitol			
13:09	435	nicht möglich	Galactose	0,3	
19:19	434	nicht möglich	N-Acetylglucosamin	0,1	
Weitere detektierte Substanzen [Retentionszeit in min:s]: Fettsäurederivat (Methylpalmitat?) [8:39],					
Fettsäurederivat	(Methylstearat?) [14:21]			

4.1.1.6 Komponentenanalyse des Prion-Scaffold aus ScN2a-Zelllysaten

Prionen können auch aus den Zellen Scrapie-infizierter Neuroblastoma-(ScN2a-) Zellen präpariert werden. Zur Analyse ob das Prion-Scaffold auch in diesem Prionmaterial nachweisbar ist, wurde Zelllysat von zwei Zellkulturansätzen ScN2a-Zellen (s. 2.2.5) mittels der Prion-Scaffold-Präparation prozessiert und dann via Komponentenanalyse auf seine Zuckerbestandteile hin analysiert. Bei EI-MS-Messungen zeigten sich die Signale derivatisierter Zucker als sehr niedrig, weshalb eine Identifizierung über die Fragmentierungsmuster nicht immer möglich war. Aus diesem Grund wurden auch mit dieser Probe CI-SIM-MS-Messungen über die Massen 450-460 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.8 aufgelistet. Die Analyse zeigte auch hier, dass Glucose als Marker für das Prion-Scaffold die Hauptkomponente der detektierten Zucker stellte. Darüber hinaus wurden geringe Mengen an Galactose, Mannose und N-Acetylglucosamin detektiert. Außerdem kann auch hier nicht ausgeschlossen werden, dass die Probe zusätzlich geringe Mengen anderer Zucker wie z.B. Fucose enthielt.

Tab. 4.9: Ergebnisse der Komponentenanalyse einer Kontrollpräparation aus N2a-Zelllysaten:

Relative Verhältnisse auf Grundlage der Peakflächen des GC-CI-SIM-MS-Laufes (Range 450-460), normiert auf Glucose. Zuordnungen beruhen auf Retentionszeit, Molekulargewicht (Mw) und, soweit möglich, El-MS-Identifizierung. Verwendete GC-Säule: Optima[®] 1 (25 m / 0,32 mm iD).

Retentionszeit [min:s]	Mw [g/mol] (nach CI-MS)	Identifizierung (nach EI-MS)	Zuordnung	relatives Verhältnis	
12:30	435	nicht möglich	Mannose	0,1	
12:53	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)-	Glucose	1	
		hexitol			
13:11	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)-	Galactose	0,3	
		hexitol			
19:16	434	nicht möglich	N-Acetylglucosamin	0,2	
Weitere detektierte Substanzen [Retentionszeit in min:s]: Fettsäurederivat (Methylpalmitat?) [8:44],					
Fettsäurederivat	(Methylstearat?)	14:25]			

4. Ergebnisse

4.1.1.7 Komponentenanalyse des PK-Pellets aus N2a-Zelllysaten

Als Vergleichspräparation zu den ScN2a-Zellkulturen wurde das PK-resistente Pellet aus dem Zelllysat von zwei Zellkulturansätzen N2a-Zellen (s. 2.5) präpariert und auf seine Zuckerbestandteile hin analysiert. Auch hier waren die Signale bei der EI-MS-Messung sehr niedrig und daher nicht immer eine Identifizierung über die Fragmentierungsmuster möglich. Daher wurde auch hier eine CI-SIM-MS-Messung wie zuvor durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.9 auf der vorherigen Seite zusammengefasst. Die Präparation aus N2a-Zellen zeigt annähernd die gleichen Ergebnisse, wie die aus ScN2a-Zellen und auch hier konnte nicht ausgeschlossen werden, dass geringe Mengen anderer Zucker vorhanden waren.

4.1.1.8 Zusammenfassung der Komponentenanalysen

Eine zusammenfassende Übersicht aller, inklusive der in anderen Arbeiten (Dumpitak 1998; Weinmann 2001) durchgeführten Komponentenanalysen gibt Tabelle 4.10. Die Ergebnisse der Komponentenanalysen des Prion-Scaffold von Dumpitak (1998) konnten mit PrP 27-30 der AG Prusiner eindeutig reproduziert werden. Somit ist Glukose als einziger Bestandteil des unlöslichen Prion-Scaffolds auszumachen. Darüber hinaus wurde durch die Komponen-

Ducha	Augo an og matorial	Dala	ting Vanh	iliniago d	at a leti ant an 7	
Probe	Ausgangsmalerial	Keiai	uve v erno	uinisse a	elekilerier Z	ucker
	(Menge)	Glc	Man	Gal	GlcNAc	Fuc
PK-Überstand von PrP 27-30	465 μg	1	0,6	0,5	0,4	0,8
Prion-Scaffold aus PrP 27-30 ¹⁾	$\sim 200 \ \mu g$	1	-	-	?	?
Prion-Scaffold aus PrP 27-30	84,5 μg	1	-	-	-	-
(AG Prusiner)						
Prion-Scaffold aus PrP 27-30	4 HÄ	1	0,4	0,4	<0.1	0,2
(AG Diringer)						
Prion-Scaffold aus PrP 33-35	240 µg	1	0,2 ²⁾	0,5	<0,1	? 2), 3)
Prion-Scaffold aus ME7-	100 µg	1 ²⁾	0,4 ²⁾	0,3 ²⁾	? 2), 3)	? 2), 3)
Prionisolat						
Prion-Scaffold aus RML-	100 µg	1 ²⁾	0,4 ²⁾	0,3 ²⁾	? 2), 3)	? 2), 3)
Prionisolat						
Prion-Scaffold aus ScN2a-	2 Kulturlysate	1 ²⁾	0,2 ²⁾	0,3 ²⁾	0,1 ²⁾	? 2), 3)
Zelllysat						
PK-Pellet aus gesunden	4 HÄ	1	-	0,6	-	-
Hamsterhirnen ⁴⁾						
PK-Pellet aus gesunden	5.6 HÄ	1	0,6	0,1	?	?
Hamsterhirnen ^{4), 5)}						
PK-Pellet aus gesunden Hirnen	2.5 HÄ	1	1	0,2	?	?
junger Hamster ^{5), 6)}						
PK-Pellet aus gesunden Hirnen	3 HÄ	1	0,9	0,6	?	?
alter Hamster ^{5), 7)}						
PK-Pellet aus N2a-Zelllysat	2 Kulturlysate	1	0,1 ²⁾	0,3	0,2 ²⁾	? 2), 3)

Tab. 4.10: Zusammenfassung der Komponentenanalysen:

Relative Verhältnisse normiert auf Glucose. HÄ = Hirnäquivalente (1 HÄ \cong 100 µg PrP 27-30); Glc = Glucose; Man = Mannose; Gal = Galactose; GlcNAc = N-Acetylglucosamin; Fuc = Fucose.

¹⁾ aus Dumpitak (1998), Fuc und GlcNAc wurden nicht untersucht; ²⁾ unterhalb der EI-MS-Nachweisgrenze; ³⁾ geringe Mengen aufgrund CI-SIM-MS-Messung nicht ausschließbar; ⁴⁾ Material stammt von Tieren gemischter Altersklassen; ⁵⁾ aus Weinmann (2001) Fuc und GlcNAc wurden nicht untersucht; ⁶⁾ Alter: 150 d; ⁷⁾ Alter: 246 d

tenanalyse des PK-Überstandes von PrP 27-30 klar gezeigt, dass das Scaffold von den Zuckern der N-Glykosylierungen und des GPI-Ankers von PrP zu unterscheiden ist. Die Zuckerkomponenten dieser kovalenten PrP-Modifikationen wurden löslich im Überstand der PK-Verdauung nachgewiesen. Auch in allen anderen untersuchten Prionmaterialien stellte Glucose den Hauptanteil detektierter Zucker in Präparationen des Prion-Scaffold. Hier waren jedoch auch oftmals Zucker zu detektieren, die Bestandteil der N-Glykosylierungen und des GPI-Ankers sind. In Zusammenhang mit den unter 4.2.1 dargestellten Ergebnissen zur Optimierung der Prion-Scaffoldpräparation, ist es wahrscheinlich, dass diese auf Rückstände von PrP in den jeweiligen Präparationen des Prion-Scaffold zurückzuführen sind. Auf Basis der Komponentenanalysen von Vergleichspräparationen aus gesunden Hirnen bzw. N2a-Zellen kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch in diesen Präparaten ein dem Prion-Scaffold ähnliches Polysaccharid vorlag. Allerdings wurden neben Glucose auch hohe Mengen anderer Zucker detektiert. Die Vergleichsmaterialien wurden vor der Analyse ebenfalls einer "Prion-Scaffold-Präparation" unterzogen. Daher müssen die hier detektierten Zucker zuvor entweder unlöslich gewesen sein, oder an unlösliche Komponenten gebunden haben. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Verknüpfungsanalysen wird dies in 5.1.3 diskutiert.



Abb. 4.4: Partiell methylierte Alditolacetate aus 1,4- und 1,4,6-verknüpften Hexosen:

Die Stellung der Acetylgruppen in partiell methylierten Alditolacetaten (PMAA) spiegelt die Verknüpfungen der Hexose im Polysaccharid wieder, wobei die Acetylierung am C5 aus der Ringöffnung resultiert. Die Stellung der Methylgruppen spiegelt die zuvor freien OH-Gruppen wieder. Die Stellung des Deuterium zeigt, ob es sich zuvor um eine Pyranose (D an C1) oder Furanose (D an C2) handelte. In der EI-MS sind unterschiedliche PMAA durch ihr spezifisches Fragmentierungsmuster identifizierbar.

4.1.2 Verknüpfungsanalysen

Die Auswertung der GC/MS-Messungen zu den durchgeführten Verknüpfungsanalysen erfolgte analog der unter 4.1.1.1 dargestellten Beispielauswertung. Durch die Derivatisierungsschritte der Methylierungsanalyse (s. 3.6.3 und 3.6.4) entstehen aus verschieden verknüpften Monomeren eines Polysaccharides unterschiedliche, partiell methylierte Alditolacetate (PMAA) (s. Abb. 4.4 auf der vorherigen Seite). Anhand der spezifischen Fragmentierungsmuster, welche PMAA in EI-Massenspektren aufweisen, können die zuvor im Polysaccharid vorhandenen Verknüpfungen eindeutig identifiziert werden.

4.1.2.1 Verknüpfungsanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 33-35

Zum Vergleich mit den Ergebnissen der Komponentenanalysen von PrP^{Sc} wurde Prion-Scaffoldmaterial aus 500 µg PrP 33-35 (s. 2.2.2) präpariert und die Verknüpfungen der Zuckermonomeren mittels Methylierungsanalyse (s. 3.6.4) analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.11 aufgelistet. Die Hauptmenge der detektierten Zucker stellte 1,4-verknüpfte Glucose. Daneben wurden geringe Mengen 1,3,4-verknüpfter Hexose, 1,6-verknüpfter Glucose, 1endständiger Glucose oder Mannose, 1,4-verknüpfter Mannose und jeweils Spuren 1,4,6verknüpfter Glucose und monomerer Glucose detektiert.

Tab. 4.11: Ergebnisse der Verknüpfungsanalyse des Prion-Scaffold aus PrP 33-35: Glc = Glucose; Man = Mannose; Gal = Galactose. Relative Verhältnisse auf Grundlage der Peakflächen des GC-EI-MS-Laufes normiert auf 1,4-verknüpfte Glucose. Die Zuordnungen beruhen auf Retentionszeit, Molekulargewicht (Mw) und EI-MS-Identifizierung. Verwendete GC-Säule: Optima[®] 1 (30 m / 0,25 mm iD)

Retentionszeit	Mw [g/mol]	Identifizierung (nach EI-MS)	Zuordnung	relatives
[min:s]	(nach CI-MS)			Verhältnis
6:48	323	1,5-Di-O-acetyl-(1-deuterio)-	1-endständige Glc	0,05
		(2,3,4,6-tetra-O-methyl)-hexitol	oder Man ¹⁾	
8:48	351	1,4,5-Tri-O-acetyl-(1-deuterio)-	1,4-verknüpfte Man	0,04
		(2,3,6-tri-O-methyl)-hexitol		
9:04	351	1,4,5-Tri-O-acetyl-(1-deuterio)-	1,4-verknüpfte Glc	1
		(2,3,6-tri-O-methyl)-hexitol		
9:56	351	1,5,6-Tri-O-acetyl-(1-deuterio)-	1,6-verknüpfte Glc	0,05
		(2,3,4-tri-O-methyl)-hexitol		
10:42	379	1,3,4,5-Tetra-O-acetyl-(1-	1,3,4-verknüpfte	0,09
		deuterio)-(2,6-tri-O-methyl)-	Hexose ¹⁾	
		hexitol		
12:12	379	1,4,5,6-Tetra-O-acetyl-(1-	1,4,6-verknüpfte Glc	≪0,01
		deuterio)-(2,3-tri-O-methyl)-	-	
		hexitol		
16:58	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)-	monomere Glc	≪0,01
		hexitol		

¹⁾Durch sehr ähnliche Retentionszeiten oder nicht verfügbaren Substanzstandard keine genauere Zuordnung möglich.

4.1.2.2 Verknüpfungsanalyse des Prion-Scaffold aus ScN2a-Zelllysaten

Zum Vergleich mit den bisherigen Ergebnissen wurde Prion-Scaffold aus dem Zelllysat von 30 Zellkulturansätzen ScN2a-Zellen (s. 2.2.5) präpariert und die Verknüpfungen der Zuckermonomeren mittels Methylierungsanalyse analysiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.12 aufgelistet. Auch hier stellt 1,4-verknüpfte Glucose die Hauptmenge der detektierten Zucker. Ferner wurde 1,3,4-verknüpfte Hexose, 1-endständige Glucose oder Mannose, 1,4-verknüpfte Galactose, monomere Glucose und geringe Mengen 1,4,6-verknüpfter Glucose und 1,4-verknüpfter Mannose detektiert. Die doch vergleichsweise hohe Menge monomerer Glucose ist wahrscheinlich auf Rückstände aus dem Zellkulturmedium zurückzuführen, die aufgrund der Beschaffenheit des Ausgangsmaterials (vgl. 4.2.1) nicht entfernt werden konnten.

Tab. 4.12: Ergebnisse der Verknüpfungsanalyse des Prion-Scaffold aus ScN2a-Zelllysat: Glc = Glucose; Man = Mannose; Gal = Galactose. Relative Verhältnisse auf Grundlage der Peakflächen des GC-EI-MS-Laufes normiert auf 1,4-verknüpfte Glucose. Die Zuordnungen beruhen auf Retentionszeit, Molekulargewicht (Mw) und EI-MS-Identifizierung. Verwendete GC-Säule: Optima[®] 1 (30 m / 0,25 mm iD)

Retentionszeit	Mw [g/mol]	Identifizierung (nach EI-MS)	Zuordnung	relatives
[min:s]	(nach CI-MS)			Verhältnis
6:50	323	1,5-Di-O-acetyl-(1-deuterio)-	1-endständige Glc	0,15
		(2,3,4,6-tetra-O-methyl)-hexitol	oder Man ¹⁾	
8:50	351	1,4,5-Tri-O-acetyl-(1-deuterio)-	1,4-verknüpfte Man	0,03
		(2,3,6-tri-O-methyl)-hexitol		
9:05	351	1,4,5-Tri-O-acetyl-(1-deuterio)-	1,4-verknüpfte Glc	1
		(2,3,6-tri-O-methyl)-hexitol		
9:22	351	1,4,5-Tri-O-acetyl-(1-deuterio)-	1,4-verknüpfte Gal	0,11
		(2,3,4-tri-O-methyl)-hexitol		
10:44	379	1,3,4,5-Tetra-O-acetyl-(1-	1,3,4-verknüpfte	0,3
		deuterio)-(2,6-tri-O-methyl)-	Hexose ¹⁾	
		hexitol		
12:13	379	1,4,5,6-Tetra-O-acetyl-(1-	1,4,6-verknüpfte Glc	0,04
		deuterio)-(2,3-tri-O-methyl)-		
		hexitol		
16:59	435	Hexa-O-acetyl-(1-deuterio)-	monomere Glc	0,11
		hexitol		

¹⁾Durch sehr ähnliche Retentionszeiten oder nicht verfügbaren Substanzstandard keine genauere Zuordnung möglich.

4.1.2.3 Zusammenfassung der Verknüpfungsanalysen

Eine zusammenfassende Übersicht aller, inklusive der in anderen Arbeiten (Dumpitak 1998; Weinmann 2001) durchgeführten Verknüpfungsanalysen gibt Tabelle 4.13 auf der nächsten Seite. In allen Präparationen aus Prionen war 1,4-verknüpfte Glucose überwiegend detektierte Bestandteil. Ebenfalls in allen untersuchten Prionmaterialien war 1,4,6-verknüpfte Glucose zu geringen Anteilen detektierbar. In Material aus PrP 27-30 und PrP 33-35, nicht jedoch bei Material aus ScN2a-Zellen, war darüber hinaus auch 1,6-verknüpfte Glucose detektierbar. Ferne wurde 1,3,4-verknüpfte Hexose ebenfalls in 3 der 4 Prion-Präparate gefunden. Die 1,3,4-Verknüpfung kann auf eine zu geringe Konzentration der Methylierungsreagenzien während der Derivatisierungsreaktion (vgl. 3.6.3) zurückzuführen sein. Bei Hexosen ist die OH-Gruppe in Position 3 diejenige mit der niedrigsten Reaktivität bezüglich Methylierung. Daher tritt Untermethylierung bevorzugt an dieser Position auf (Flores *et al.* 2000). Dass die Präparationen, bei denen 1,3,4-verknüpfte Hexose beobachtet wurde, verstärkte PK-Resistenz bzw. PrP-Restanteile zeigten (s. 4.2.1), spricht dafür, dass die Konzentration der Methylierungsreagenzien hierdurch herabgesetzt wurde. Daher ist eine Untermethylierung von tatsächlich 1,4-verknüpfter Hexose in diesen Fällen wahrscheinlich. Im Vergleich mit den Ergebnissen der Präparationen aus gesunden Hirnen deutet sich auch auf Grundlage der

Probe Hexose relative Verhältnisse detektierter Zucker				ickerverknüpf	ungen		
		1,4	1,6-	1,4,6-	1,3,4-	1- (endständig)	ohne (monomer)
Prion-Scaffold aus	Glc:	1	0,2	0,08			
PrP 27-30 (AG	Man:				_	-	_
Prusiner) ¹⁾	Gal:	-	-	-			
Prion-Scaffold aus	Glc:	1					
PrP 27-30 (AG	Man:	0,14	0,16)	$0,09^{6}$	$0.08^{6)}$	-	-
Diringer) ¹⁾	Gal:	-	-	-	-,		
Prion-Scaffold aus	Glc:	1	0,05	≪ 0,01		0,056)	≪ 0,01
PrP 33-35	Man:	0,04			0.09^{6}		-
	Gal:	-	-	-	,	-	-
Prion-Scaffold aus	Glc:	1		0,04			0,11
ScN2a-Zelllysaten	Man:	0,03	_		0,36)	0,15%	-
	Gal:	0,11		-	,	-	-
PK-Pellet aus	Glc:	1					
gesunden	Man:	0,14	0,326 0,126			_	-
Hamsterhirnen ^{1), 2)}	Gal:	-	-	-			
PK-Pellet aus	Glc:	1					
gesunden	Man:	2	0,036)	0,036)		-	-
Hamsterhirnen ^{2), 4)}	Gal:	-	-	-			
PK-Pellet aus	Glc:	1					
gesunden Hirnen	Man:	2	-	0,036)	-	0,16)	_
junger Hamster ^{3), 4)}	Gal:	0,3			-		
				-		0,03	
PK-Pellet aus	Glc:	1	4	0.026)		0.000	
gesunden Hirnen	Man:	1,5		0,03%)	-	0,08%)	-
aller Hamster ^{5, 5}	Gal:	0,3		-		0,03	

Tab. 4.13: Zusammenfassung der Verknüpfungsanalysen:

Relative Verhältnisse normiert auf 1,4-verknüpfte Glucose. Glc = Glucose; Man = Mannose; Gal = Galactose.

¹⁾ aus Dumpitak (1998) ²⁾ Material stammt von Tieren gemischter Altersklassen; ³⁾ aus Weinmann (2001) Fuc und GlcNAc wurden nicht untersucht; ⁴⁾ Alter: 150 d; ⁵⁾ Alter: 246 d; ⁶⁾ aufgrund zu geringer Retentionszeitenunterschiede in der GC oder nicht synthetisierbarem Standard nicht genauer zuzuordnen. Verknüpfungsanalysen an, dass ein dem Prion-Scaffold ähnliches Polysaccharid Bestandteil gesunder Hirne ist. Die Ergebnisse von Weinmann (2001) deuten darüber hinaus auf eine Zunahme dieses Polysaccharides mit zunehmendem Alter. Eine mögliche Erklärung hierfür wird in 5.1.3 diskutiert. Die Frage, ob ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei dem Prion-Scaffold trotz der Analyseresultate aus gesundem Hirn bzw. N2a-Zellen um ein Artefakt handeln könnte, wird in der zusammenfassenden Diskussion in 5.1 erörtert.

4.1.3 Stereochemie des Prion-Scaffold

4.1.3.1 Etablierung der Methodik

Zur Unterscheidung α - und β -glykosidischer Verknüpfungen sind in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben, die meist auf enzymatischen, chemischen oder massenspektrometrischen Methoden, NMR-Spektroskopie oder einer Kombination aus diesen beruhen (Cancilla et al. 2000, Reddy et al. 1993). Zumeist konnte in diesen Fällen jedoch auf Mikrogrammmengen der zu analysierenden Zucker zurückgegriffen werden, was jedoch im Fall des Prion-Scaffold nicht möglich ist. Daher wurden eine chemische Methode und verschiedene enzymatische Verdauungen auf ihre Stereospezifität im µg- bis ng-Maßstab getestet. Im Rahmen einer Diplomarbeit wurde gezeigt, dass in diesen Dimensionen die Methode der Chromtrioxid-Oxidation (Angyal & James 1970; Hoffman et al. 1972; Hellerqvist & Sweetman 1990) und enzymatische Verdauungen mit α-Amylase aus Aspergillus oryzae oder humanem Speicheldrüsensekret keine spezifischen Ergebnisse erbrachten (Weinmann 2001). Daher wurden weitere glykolytische Enzyme bezüglich ihrer Aktivität und Stereospezifität getestet (s. 3.5.8), und die verdauten Zucker anschließend mittels Nanospray-ESI-MS (s. 3.7.4) untersucht. Hierbei konnte mittels Verdauungen von Stärke, Glykogen bzw. Cellulose mit α -Glucosidase aus Saccharomyces cerevisiae, β -Glucosidase aus Prunus dulcis var. amara und Cellulase aus Trichoderma reesei ebenfalls keine zufriedenstellende Unterscheidbarkeit der α - und β -verknüpften Polysaccharide im μ g-Maßstab erzielt werden. Es zeigte sich jedoch, dass Amyloglucosidase aus Aspergillus niger spezifisch Glucose aus Glykogen, nicht aber aus Cellulose freisetzte. In weiteren Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass diese spezifische Verdauung für Polysaccharidkonzentrationen von bis zu 50 pg/µl detektierbar war. Hierbei lag die absolute Nachweisgrenze für Glucose bei 5 pg/µl in einem Messvolumen von 1 µl bei Messungen mittels Nanospray-ESI-TOF-MS (s. 3.7.4). Glucose wurde dabei durch Signale bei m/z = 203 (Glc + Na⁺), 181 (Glc + H⁺) und 163 (Glc - H₂O + H⁺) identifiziert, wobei die Signale bei m/z = 181 und 163 nur bei höheren Glucosekonzentrationen detektierbar waren.



Abb. 4.5: ESI-TOF-Massenspektren zur Stereochemieanalyse des Prion-Scaffold:

A: Prion-Scaffold aus ~20 μ g PrP 27-30, unverdaut. **B:** Prion-Scaffold aus ~20 μ g PrP 27-30 nach Verdauung mit Amyloglucosidase, die spezifisch α -1,4- und α -1,6-verknüpfte Glucosepolysaccharide unter Freisetzung von Glucose hydrolysiert.

4.1.3.2 Enzymatische Analyse der Stereochemie des Prion-Scaffold

Zur Analyse der Stereochemie des Prion-Scaffold wurden zwei Proben angesetzt, wovon eine als Vergleichsprobe diente und die andere mit Amyloglucosidase verdaut wurde (s. 3.5.8). Da PrP 27-30 der AG Prusiner etwa 5-15 % Prion-Scaffold enthalten (Dumpitak 1998), wurden pro Ansatz Scaffoldmaterial aus ~20 µg PrP 27-30 (\cong 1-3 µg Prion-Scaffold) eingesetzt. Die Ergebnisse der Nanospray-ESI-TOF-MS-Messung (s. 3.7.4) sind in Abb. 4.5 gezeigt. Aus Vergleichsmessungen war abschätzbar, dass die Fläche des Glucosepeaks in der verdauten Probe in guter Übereinstimmung mit der Signalstärke bei Proben vergleichbarer Mengen verdauten Glykogens war. Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass bei der Verdauung des Prion-Scaffold mit Amyloglucosidase eine adäquate Menge Glucose freigesetzt wurde und somit die Stereochemie der Bindungen in diesem Polysaccharid α-glykosidischer Natur ist.

4.2 Optimierung der Prion-Scaffold-Präparation für Rekonstitutionsexperimente

Für Experimente, die Aufschluss darüber geben können, ob das Prion-Scaffold eine für die Infektiosität von Prionen notwendige Komponente ist, muss das Scaffold in möglichst PrPfreier Form präpariert werden. In anderen Worten, es ist wünschenswert bis unabdingbar, bei Rekonstitutionsexperimenten, welche die *in-vitro*-Generierung von Infektiosität zum Ziel haben, von nicht-infektiösen Materialien auszugehen. Deshalb wurde die Präparation des Prion-Scaffolds (s. 3.2.2 und Abb. 3.1, S. 31) dahingehend optimiert.

4.2.1 Anfängliche Präparationen des Prion-Scaffolds

Prion-Scaffold aus Prionrods der Arbeitsgruppen Prusiner und Diringer und eine Vergleichspräparation aus gesunden Hamsterhirnen wurden zunächst nach Dumpitak (1998) präpariert (s. 3.2.2). Die Präparate wurden mittels Westernblot (s. 3.5.3 und 3.5.5.1) und Bioassays (s. 3.4 und 3.4.1) auf Rest-PrP und Infektiosität untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.14 aufgelistet. Obwohl mittels Westernblot im Prion-Scaffold aus Prionrods der AG Prusiner kein PrP mehr detektierbar war, zeigten Bioassays, (s. 3.4.1) eine Restinfektiosität in der Präparation. Unter den Annahmen, dass die Nachweisgrenze des Westernblotsystems unterschritten wurde und die PrP-Menge auch in diesen Konzentrationsbereichen mit der Infektiosität korreliert, lässt sich aus den ermittelten log ID₅₀-Werten die PrP-Abreicherung berechnen: Damit ergibt sich für Prion-Scaffold aus PrP 27-30 der AG Diringer eine PrP-Abreicherung um einen Faktor von etwa 1.600, d. h. von eingesetzten 1 µg PrP 27-30 verblieben also etwa 632 pg. Für das aus PrP 27-30 der AG Prusiner gewonnene Prion-Scaffold wurde eine Abreicherung um ca. Faktor 5.700 erzielt, entsprechend verblieben von 1 µg PrP 27-30 ca. 175 pg. Die Unterschiede sind wohl in der Beschaffenheit der beiden Prion-Präparate begründet. Prionrods der AG Prusiner ließen sich relativ gut in Suspension bringen und nach PK-Verdauung waren makroskopisch keine sichtbaren Partikel zu erkennen. Prionrods der AG Diringer dagegen waren schlechter zu suspendieren und enthielten größere Partikel

Tab. 4.14: Ergebnisse der ersten Prion-Scaffold-Präparationen:

Eingesetzte Probenmenge bezogen auf Ausgangsmaterial; WB = Westernblot; H \ddot{A} = Hirnäquivalente (1 H \ddot{A} entspricht ~100 μ g PrP 27-30); pro Bioassay wurden sechs Hamster eingesetzt.

Ausgangsmaterial	Status	WB- Signal für PrP ¹⁾	Eingesetzte Probenmenge	Durchschnittliche Inkubationszeit im Bioassay [d]	log ID ₅₀ /100 μg, bzw. log ID ₅₀ /HÄ Ausgangsmaterial
	Ausgangsmaterial	+++	$\sim 2 \ \mu g$	85,5 +/- 3,7	6,82
PrP 27-30	2 x 24 h PK-	+	$\sim 2 \ \mu g$	113,3 +/- 5,8	5,13
(AG Prusiner)	verdaut				
	4 x 24 h PK-	-	~ 8,8 µg	119,3 +/- 11,6	3,07
	verdaut				
PrP 27-30 (AG Diringer)	Ausgangsmaterial	++++	~ 0,04 HÄ	72 +/- 1	8,17
	2 x 24 h PK-	+++	~ 0,04 HÄ	87,7 +/- 1,1	5,92
	verdaut				
	4 x 24 h PK-	++	~ 0,19 HÄ	90,2 +/- 3,2	4,97
	verdaut				
Vergleichspräparat	Ausgangsmaterial	-	~ 0,04 HÄ	199 ²⁾	0
aus Hirnen	4 x 24 h PK-	-	~ 0,19 HÄ	199 ^{2), 3)}	0
gesunder Hamster	verdaut				

¹⁾ aus Dumpitak 1998); ²⁾ Experiment nach 199 d terminiert; ³⁾ ein Tier wegen Augenentzündung vorzeitig aus Experiment genommen.

als das Material der AG Prusiner. Nach PK-Verdauung waren ferner makroskopisch Schwebeteilchen erkennbar. Auch bei Präparationen von Prion-Scaffold aus anderen Prionen (s. 4.1) als dem PrP 27-30 der AG Prusiner wurden ähnlich unvorteilhafte Eigenschaften gefunden. So war die Prozessierung von PrP 33-35 mit der von PrP 27-30 der AG Diringer vergleichbar. ScN2a-Zelllysate dagegen waren aufgrund ihrer wachsähnlichen Konsistenz nicht in Suspension zu bringen und die PK-Verdauung resultierte in einer zähflüssigen Substanz die makroskopisch sichtbare Partikel aufwies. Auf Basis dieser Ergebnisse und denen der Komponentenanalysen (s. 4.1.1.9) wurde im Folgenden einzig PrP 27-30 der AG Prusiner zur Präparation des Prion-Scaffold genutzt.

4.2.2 Optimierung des PK-Verdauungsschrittes

Eine Möglichkeit der Optimierung lag bei den proteolytischen Verdauungen. Bei den Präparationen aus 4.2.1 wurden die PK-Verdauungen bei Raumtemperatur in 10 mM Natriumphosphatpuffer (NaPi), pH 7,2 durchgeführt. PK ist in einem pH-Bereich von 6,5-9,5 über mehrere Stunden aktiv, ihre Aktivität ist bei 65 °C jedoch zwölfmal höher, als bei 25 °C. Bei Temperaturen über 65 °C denaturiert sie allerdings rasch (Ebeling *et al.* 1974). Darüber hinaus ist die Aktivität der PK in Gegenwart von manchen Detergenzien, z.B. SDS erhöht (Hilz *et al.* 1975). Daher wurde die Präparation des Prion-Scaffolds zunächst dahingehend optimiert, dass die PK-Verdauungen unter Schütteln bei 60-62 °C erfolgten (s. 3.2.2). Da ein Zusatz von SDS das Prion-Scaffold in Lösung bringen könnte, wurde hierauf zugunsten der mit der Unlöslich-



Abb. 4.6: Abnahme des PrP-Signals während der Präparation des Prion-Scaffolds:

Während der Präparation des Prion-Scaffold wurden Proben entnommen und mittels PAGE und hochempfindlichem Westernblot mit 3F4-Antikörper auf verbliebenes PrP analysiert. Dabei wurde jeweils die 790 ng Ausgangsmaterial entsprechende Menge aufgetragen. **A** = Ausgansmaterial (PrP 27-30); **B** = Probe nach Lipidextraktion; **C** = Probe nach Lipidextraktion und 2 x 24 h PK-Verdauung bei 60-62 °C unter Schütteln; **k** = Positivkontrolle (1 x 10⁻⁷ HÄ \cong 10 pg PrP 27-30), **m** = Molekulargewichtsmarker.

keit verbundenen, einfacheren Aufreinigung des Prion-Scaffolds verzichtet. Außerdem wurde die Probe vor jeder PK-Zugabe für 15 s sonifiziert um PrP-Aggregate zugänglicher zu machen. Das Resultat dieser veränderten PK-Verdauung ist in Abb. 4.6 auf der vorherigen Seite gezeigt. Die Detektion von verbliebenem PrP in Prion-Scaffoldpräparaten geschah dabei mit Hilfe eines hochempfindlichen Westernblotsystems (s. 3.5.5.2) nach dem Protokoll von Thomzig *et al.* (2003). Wie man sieht, war trotz dieser Optimierungen PrP 27-30 im präparierten Prion-Scaffold detektierbar. Das in Spur C detektierte Rest-PrP entsprach etwa 10⁻⁶ HÄ PrP 27-30, also ~100 pg PrP 27-30. Hieraus ergab sich somit eine PrP-Abreicherung um etwa Faktor 7.900, womit von 1 μ g PrP 27-30 ca. 127 pg verblieben. Im Vergleich zu den in 4.2.1 gezeigten Ergebnissen war dies zwar eine Verbesserung, jedoch nicht ausreichend um nicht-infektiöses Prion-Scaffold zu präparieren.

4.2.3 Denaturierung und Präzipitation

Eine weitere Optimierungsoption lag in der Aufweichung bzw. Auflösung der Prion-Aggregate vor der PK-Verdauung. Es ist bekannt, dass durch Inkubation mit Guanidiniumthiocyanat (GdnSCN) Prion-Aggregate aufgelockert werden und, damit verbunden, ihre Proteaseresistenz erheblich sinkt (Serban *et al.* 1990; Madec *et al.* 1997; Manuelidis 1997). Daher wurde PrP 27-30 nach dem Lipidextraktionsschritt (s. 3.2.2) zunächst in 4,5 M GdnSCN denaturiert und anschließend mittels Methanol-Fällung präzipitiert. Das Ergebnis ist in Abb. 4.7 nach Optimierung gezeigt. Hier war in Prion-Scaffold aus 1 µg PrP 27-30 kein PrP mehr



Abb. 4.7: Rest-PrP nach optimierter Präparation des Prion-Scaffold:

Prion-Scaffold wurde mittels PAGE und hochempfindlichem Westernblot mit 3F4-Antikörper auf verbliebenes PrP analysiert. Die Probe entsprach 1 μ g PrP 27-30 Ausgangsmaterial. **A** = Prion-Scaffold nach Lipidextraktion, GdnSCN-Denaturierung, MeOH-Präzipitation und 2 x 24 h PK-Verdauung bei 60-62 °C; **k**₁ = Positivkontrolle (1 x 10⁻⁶ HÄ \cong 100 pg PrP 27-30); **k**₂ = Positivkontrolle (1 x 10⁻⁷ HÄ \cong 10 pg PrP 27-30); **m** = Molekulargewichtsmarker.

detektierbar. Die Nachweisgrenze des hochempfindlichem Westernblotsystems betrug 10^{-7} HÄ, also ~10 pg PrP 27-30. Das somit von 1 µg PrP 27-30 im Höchstfall <10 pg verblieben betrug die PrP-Abreicherung mehr als Faktor 100.000. Das so präparierte Prion-Scaffold wurde daraufhin für Rekonstitutionsversuche verwendet. Die aus Infektionsstudien folgenden Schlüsse auf die Abreicherung von PrP 27-30 in den optimierten Präparationen des Prion-Scaffold sind in 4.4.4 diskutiert.

4.3 Einfluss von Polysacchariden auf die in-vitro-Konversion von PrP

Das von Post *et al.* (1998) beschriebene *in-vitro*-Konversionssystem (s. 3.8.4) wurde adaptiert, um Prion-Scaffold und PrP^C als Koaggregat zu rekonstituieren. Da nur geringe Mengen an Prion-Scaffold und PrP^C zur Verfügung standen, wurde der Einfluss eines hochpolymeren Glucosescaffolds auf Strukturänderung und Aggregation des PrP anhand verschiedener Modellsaccharide und rekombinant hergestelltem PrP (rec PrP) untersucht.



Abb. 4.8: CD-Spektren von rec SHaPrP(29-231) in Abhängigkeit von SDS und Glykogen:

Alle Proben wurden in 10 mM NaPi, pH 7,2 angesetzt und bei 37 °C inkubiert. CD-Spektren wurden 10 min nach Probenansatz aufgenommen. Die Abbildungen zeigen **A:** die Sekundärstruktur von rec SHaPrP(29-231) bei verschiedenen SDS-Konzentrationen und **B-D:** bei 0,2 % SDS, 0,05 % bzw. 0,01 % SDS in Gegenwart verschiedener Glykogenkonzentrationen.

4.3.1 Einfluss von Polysacchariden auf die Sekundärstruktur und Löslichkeit von PrP

4.3.1.1 Untersuchungen mit Glykogen

Das *in-vitro*-Konversionssystem (Post *et al.* 1998) beruht auf Struktur- und Aggregationszustandsänderungen von PrP in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration. So wurde bereits für rec SHaPrP(29-231) bzw. rec SHaPrP(90-231) gezeigt, dass es in 0,2 % SDS monomerlöslich vorliegt und α -helikale- sowie random-coil-Strukturanteile aufweist. Bei Verdünnung auf ca. 0,05 % SDS nehmen die α -helikalen Strukturanteile zu. Verdünnt man SDS weiter auf etwa 0,03 %, so ist eine Erhöhung des β -Faltblattanteils in der Struktur zu sehen, sowie unterhalb 0,03 % SDS beginnende Aggregation bis zur totalen Unlöslichkeit bei \leq 0,01 % SDS (Jansen *et al.* 2001; Birkmann 2000).

Diese Struktur- und Aggregationszustandsänderungen wurden in Anwesenheit verschiedener Modellsaccharide untersucht (s. 3.8.1). Hierbei wurde insbesondere Glykogen aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zum Prion-Scaffold verwendet (s. Diskussion). Abb. 4.8 auf der vorherigen Seite zeigt die Ergebnisse der Sekundärstrukturanalysen mittels Circulardichroismus (CD-)Spektroskopie (s. 3.8.2) von rec SHaPrP(29-231) bei verschiedenen SDS- und



Abb. 4.9: Aggregationsverlauf über die Zeit in Abhängikeit von Glykogen und SDS:

Alle Proben wurden in 10 mM NaPi, pH 7,2 angesetzt und bei 37 °C inkubiert. CD-Spektren wurden 10 min, 24 h und 48 h nach Probenansatz aufgenommen um die mit fortschreitender Aggregation einhergehende Abnahme des CD-Signals zu dokumentieren. Die einzelnen Abbildungen zeigen rec SHaPrP(29-231) **A-C**: in 0,01 % SDS jeweils bei verschiedenen Glykogenkonzentrationen und , **B**: in 0,01 % SDS und 1 mg/ml Glykogen, **C**: in 0,01 % SDS und 10 mg/ml Glykogen und **D**: in 0,05 % SDS und 10 mg/ml Glykogen.



Abb. 4.10: Löslichkeit von rec SHaPrP(29-231) in Abhängigkeit von SDS und Glykogen:

Alle Proben wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 angesetzt und bei 37 °C über 48 h inkubiert. Nach differenzieller Ultrazentrifugation wurde die Verteilung von löslichem und unlöslichem PrP auf Überstand und Pellet mittels PAGE/Silberfärbung (Proben bei 0,2 und 0,01 % SDS) oder PAGE/Westernblot (Proben bei 0,05 % SDS) analysiert.

Glykogenkonzentrationen. In Abb. 4.8.A sind die oben beschriebenen Änderungen der Sekundärstruktur von rec SHaPrP(29-231) in 0,2, 0,05 und 0,01 % SDS zu sehen. In 0,2 % SDS zeigte die Anwesenheit von Glykogen im Konversionssystem keinen Einfluss auf das Verhalten des PrP (s. Abb. 4.8.B). Auch in 0,05 % SDS hatte 1 mg/ml Glykogen keinen Einfluss, die Anwesenheit von 10 mg/ml Glykogen induzierte jedoch einen Strukturverschiebung zu höheren β-Struktur-Anteilen (s. Abb. 4.8.C). In 0,01 % SDS zeigten alle Proben diese Struktur, allerdings wies die Abnahme des CD-Signals auf eine, mit zunehmender Glykogenkonzentration, beschleunigte Aggregation des rec PrP hin (s. Abb. 4.8.D). Die Beobachtung der Proben mittels CD-Spektroskopie über 48 h bestätigte die Beschleunigung der PrP-Aggregation durch Anwesenheit von Glykogen im Konversionssystem, was in Abbildung 4.9 auf der vorherigen Seite dargestellt ist. Hierbei zeigte rec PrP in 0,05 % bei Anwesenheit von 10 mg/ml Glykogen (s. Abb. 4.9.D) ein ähnliches Verhalten wie rec PrP ohne Glykogen in 0,01 % SDS (s. Abb. 4.9.A). Die in Abbildung 4.10 dargestellte Untersuchung der Löslichkeit mittels differentieller Ultrazentrifugation (s. 3.8.4) zeigte, dass alle Ansätze bei 0,2 % SDS löslich und bei 0,01 % SDS unlöslich waren. Bei 0,05 % SDS waren Proben ohne und mit 2 mg/ml Glykogen löslich, Proben mit 10 mg/ml Glykogen dagegen zu etwa 2/3 unlöslich.

Bei weiteren Experimenten (Daten nicht gezeigt) konnten diese Ergebnisse auch bei pH 5 und mit rec SHaPrP(90-231) reproduziert werden. Bei Messungen mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) (s. 3.8.3), die mit Alexa 488-markiertem rec SHaPrP(29-231) durchgeführt wurden, konnte keine vergleichende Aggregationskinetik ermittelt werden. Bereits 30 s nach Probenansatz (Totzeit dieser Methode) waren im Gegensatz zur Kontrolle in den Proben mit 10 mg/ml Glykogen die PrP-Aggregate zu groß, um Diffusionszeiten ermitteln zu können. Abbildung 4.11 auf der nächsten Seite zeigt Überlagerungen von Fluoreszenzfluktuationskurven der jeweils ersten fünf Minuten Messzeit. In 4.11.A sieht man eindeutig, dass ohne Glykogen innerhalb dieser Zeit keine Bursts in der Fluoreszenzintensität und somit keine größeren PrP-Aggregate zu beobachten waren. In Anwesenheit von 10 mg/ml Glykogen dagegen wurde bereits in den ersten fünf Minuten der SDS-induzierten PrP-



Abb. 4.11: Aggregation von rec SHaPrP(29-231) in Abhängigkeit von Glykogen:

In allen Ansätzen wurde rec SHaPrP(29-231) mit Alexa-488-markiertem rec SHaPrP(29-231) in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7.2 auf die angegebenen Bedingungen eingestellt und sofort FCS-Messungen á 60 s über 1 h durchgeführt. Dargestellt ist jeweils eine Überlagerung der ersten fünf Fluoreszenz-Fluktuationsmessungen. **A:** In 0.01 % SDS ohne Glykogen waren innerhalb der ersten fünf Minuten keine "Fluoreszenzbursts" zu beobachten. **B:** In Anwesenheit von 10 mg/ml Glykogen jedoch war in diesem Zeitraum eine große Zahl von "Fluoreszenzbursts" detektierbar, die auf Anwesenheit einer Vielzahl von rec PrP-Aggregate zurückzuführen ist.

Aggregation eine Vielzahl von Fluoreszenzbursts detektiert, die auf eine beschleunigte Aggregation und große Zahl von Aggregaten hindeuten. Eine derartige Beschleunigung und Förderung von Aggregation ist nur durch einen keiminduzierten Mechanismus zu erkären. Glykogenmoleküle scheinen daher als Keime für die PrP-Aggregation dienen zu können.

4.3.1.2 Untersuchungen mit anderen Modellsacchariden

Zur Untersuchung der Spezifität der beobachteten Effekte wurden der Einfluss weiterer Modellsaccharide auf das Verhalten von PrP im *in-vitro*-Konversionssystem untersucht. Hierzu wurden zunächst α -Methylglucosid als Beispiel für Monosaccharide und β -Cyclodextrin als Beispiel für eine Helixwindung eines α -1,4-verknüpften Glucosepolymers verwendet. Beide Zucker hatten den Vorteil, dass sie bei den CD-Messungen keinen bzw. nur wenig Hintergrund erzeugten. In Abb. 4.12 sind die Einflüsse von α -Methylglucosid und β -Cyclodextrin dargestellt. Die gewählten Konzentrationen waren auf die Anzahl Glucosyleinheiten abgestimmt, die bei den Experimenten mit Glykogen verwendet wurden (ca. 5,5 und 55 µmol/ml Glucosylreste). Wie in Abb. 4.12 A zu sehen ist, zeigte α -Methylglucosid keinen Einfluss auf die Struktur von PrP bei 0,05 % SDS. β -Cyclodextrin dagegen (s. Abb. 4.12 B) hatte bei dieser SDS-Konzentration einen großen Einfluss auf die Einstellung der PrP-Struktur. Schon eine β -Cyclodextrin-Konzentration von 0,9 mg/ml verursachte einen erhöhten β -Strukturanteil im Protein sowie beginnende Aggregation innerhalb von 24 h. Die Probe mit 9 mg/ml β -Cyclodextrin zeigte bereits 10 min nach Ansetzen der Proben kein messbares CD-Signal mehr, was auf eine komplette Aggregation des PrP hindeutete.

In weiteren Experimenten wurde rec SHaPrP(29-231) in 10 mM Natriumacetatpuffer, pH 4 mit und ohne α -Methylglucosid, Glykogen und β -Cyclodextrin in den oben beschriebenen Konzentrationen ohne SDS-Zusatz inkubiert. Alle Proben zeigten über 7 d α -helikal dominierte PrP-Struktur und blieben nach differentieller Ultrazentrifugation löslich im Überstand (Daten nicht gezeigt). Auch Proben von rec SHaPrP(90-231), welche in 10 mM NaPi, pH 7,2 ohne SDS-Zusatz über 48 h bei 37 °C inkubiert wurden, zeigten keinen Unterschied mit und ohne Zusatz von Modellsacchariden: In allen Proben wurde eine α -helikal dominierte PrP-Struktur beobachtet, die mit einer langsamen Signalabnahme über die Zeit einherging (Daten nicht gezeigt).



Abb. 4.12: CD-Spektren mit α -Methylglucosid und β -Cyclodextrin bei 0,05 % SDS:

Alle Proben wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 angesetzt und bei 37 °C inkubiert. Die CD-Spektren wurden 24 h nach Probenansatz aufgenommen. Die Abbildungen zeigen CD-Spektren von rec SHaPrP(29-231) bei 0.05 % SDS in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von **A:** α -Methylglucosid (α -MeGlc) und **B:** β -Cyclodextrin.





Alle Proben wurden in 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 angesetzt und bei Raumtemperatur für 5 d inkubiert. Nach differentieller Ultrazentrifugation wurde die Verteilung von löslichem und unlöslichem PrP auf Überstand und Pellet mittels Dot-Blot analysiert. Alle verwendeten Zuckerkonzentrationen enthielten ~55 μ mol/ml Glucose.

4.3.1.3 Löslichkeit von PrP in Abhängigkeit von SDS bei verschiedenen Zuckern

Die SDS-abhängige Löslichkeit von rec SHaPrP(29-231) in Anwesenheit verschiedener Modellsaccharide wurde genauer bestimmt. PrP-Proben wurden auf SDS-Konzentrationen von 0,01-0,06 % SDS eingestellt und mit verschiedenen Sacchariden bei Raumtemperatur für 5 d inkubiert. Anschließend erfolgte differentielle Ultrazentrifugation (s. 3.8.4) und Dot-Blotanalyse (s. 3.5.4) der Verteilung von PrP auf Überstand- und Pelletfraktionen. Die Ergebnisse sind in Abb. 4.13 dargestellt. Wie man sieht, zeigten die Proben mit 11 mg/ml α -Methylglucosid keine Veränderung verglichen mit den Proben ohne Saccharidzusatz. 10 mg/ml Glykogen dagegen verschob die Löslichkeitsgrenze von PrP um etwa 0,015 % hin zu höheren SDS-Konzentrationen. Die Proben mit 10 mg/ml Stärke und 9 mg/ml β -Cyclodextrin dagegen waren bei allen gemessenen SDS-Konzentrationen unlöslich.

4.3.2 Einflüsse von Glykogen auf die SDS-Konzentration und cmc von SDS

Um Hinweise zu bekommen, ob die beobachteten Effekte bezüglich Löslichkeit und Strukturänderung des PrP auf eine Wechselwirkung der Saccharide mit PrP oder mit SDS zurückzuführen sind, wurden die freie SDS-Konzentration mit Hilfe der Methylenblau-Methode (s. 3.3.3) bestimmt. Hierzu wurden SDS-Konzentrationsreihen mit und ohne 10 mg/ml Glykogen angesetzt und anschließend differentiell ultrazentrifugiert (s. 3.8.4). Die SDS-Konzentration



Abb. 4.14: Abhängigkeit der freien SDS-Konzentration von der Einwaage-Konzentration des SDS in Anwesenheit von Glykogen:

Proben einer SDS-Konzentrationsreihe wurden in 10 mM NaPi, pH 7,2 mit und ohne 10 mg/ml Glykogen über 24 h bei 37° C inkubiert. Nach differentieller Ultrazentrifugation wurde die SDS-Konzentration des Überstandes ermittelt und gegen die ursprünglich eingestellte SDS-Konzentration aufgetragen.

des Überstandes wurde anschließend bestimmt. Abb. 4.14 zeigt die Ergebnisse einer solchen Messung. Offensichtlich war die freie SDS-Konzentration bei Proben mit Glykogen erheblich niedriger als bei Ansätzen ohne Glykogen. Die relative Abweichung von der jeweiligen Einwaage-Konzentration an SDS betrug im Mittel 53 %. Bei anderen Experimenten wurden auch bis zu 70 % Abweichungen von der Einwaage-Konzentration beobachtet.

Darüber hinaus wurde die kritische micellare Konzentration (cmc) von SDS in 10 mM NaPi, pH 7,2 mit und ohne 10 mg/ml Glykogen bestimmt. Die Methode beruht auf der Fluoreszenzerhöhung des Farbstoffes 1-Anilino-8-sulfonsäure (s. 3.3.4), die u.a. durch Wechselwirkung mit Micellen induziert wird. Abb. 4.15 zeigt auf der folgenden Seite eine Auswertung dieser Experimente. Gemittelt ergaben vier unabhängige Experimente eine cmc von 0,115 % SDS in 10 mM NaPi und von 0,129 % SDS in Anwesenheit von 10 mg/ml Glykogen. Wie in Abb. 4.15 auf der nächsten Seite dargestellt ist, liegt die Abweichung in der cmc aufgrund der Wechselwirkung von ANS mit Glykogen im Rahmen der experimentellen Schwankungsbreite und daher ist die cmc als unverändert anzusehen. Deswegen kann ausgeschlossen werden, dass Glykogen die cmc von SDS soweit verändert, dass die Abweichungen der SDS-Konzentration in Anwesenheit von Glykogen auf die Bildung von SDS-Micellen zurückzuführen wäre.



Abb. 4.15: Kritische micellare Konzentration von SDS mit und ohne Glykogen:

Alle Proben wurden in 10 mM Napi, pH 7,2 mit 1 mM 1-Anilino-8-sulfonsäure (ANS) angesetzt. Für die abgebildeten Titrationen ergab sich eine kritische micellare Konzentration von ~0.113 % für SDS ohne und von 0.13 % für SDS mit Glykogen. **Ohne Glykogen (Dreiecke):** Unterhalb der kritischen micellaren Konzentration (cmc) bindet der Farbstoff an SDS mit nur sehr schwacher Fluoreszenzzunahme. Oberhalb der cmc tritt eine lineare Fluoreszenzerhöhung durch Wechselwirkung mit Micellen auf. Aufgrund des Titrationsverlaufes wird die cmc aus dem Schnittpunkt der beiden linearen Bereiche ermittelt werden. **10 mg/ml Glykogen (Quadrate):** Unterhalb der cmc bindet nicht an SDS-gebundenes ANS unter Fluoreszenzerhöhung an Glykogen. Mit zunehmender SDS-Konzentration sinkt daher die Fluoreszenz mit zunehmernder SDS-Konzentrationen. Oberhalb der cmc tritt erneut Fluoreszenzerhöhung, diesmal durch Wechselwirkung mit SDS-Micellen auf. Aufgrund der Titrationskurve wird die cmc in diesem Fall aus dem Minimum der Kurvefunktion ermittelt. Aufgrund der zusätzlichen Fluoreszenzerhöhung durch Bindung von ANS an Glykogen liegt die ermittelte Abweichung in der cmc im Rahmen der experimentellen Schwankung und daher eher als unverändert anzusehen.

Die Ergebnisse der SDS-Konzentrationsbestimmung zeigen also, dass Glykogen die freie SDS-Konzentration beeinflussen kann. Verglichen mit den Ergebnissen des Einflusses auf die Löslichkeit von PrP (s. 4.3.1.3) und denen der cmc-Bestimmung, sind die dort beobachteten Effekte weitaus schwächer, als es die Abweichung in der SDS-Konzentration von mehr als 50 % vermuten lässt. Daher muss die Wechselwirkung von SDS-Molekülen mit Glykogen sehr viel schwächer sein, als die von SDS-Molekülen mit PrP bzw. von SDS-Molekülen mit sich selbst innerhalb von Micellen. Dennoch kann aus diesen Experimenten nicht ausgeschlossen werden, dass die Wechselwirkung von SDS und Glykogen zu den beobachteten Effekten beitrug.

4.3.3 Einflüsse von Polysacchariden auf die PK-Resistenz von PrP-Aggregaten

Ob Polysaccharide einen Einfluss auf die Protease-Resistenz von PrP-Aggregaten haben wurde mittels Proteinase-K (PK-)Verdauung geprüft. Hierzu wurde rec SHaPrP(29-231) in 10 mM NaPi, pH 7,2 und 0,01 % SDS über 3 d bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde von jeder Probe eine Zeitreihe über die PK-Verdauung aufgenommen (s. 3.5.7) und PrP mittels PAGE/Westernblot/immunologischem Proteinnachweis (s. 3.5.1, 3.5.3 und 3.5.5.1) analysiert. Anfängliche Experimente deuteten auf eine höhere PK-Resistenz von PrP-Aggregaten hin, wenn die Aggregation zuvor in Anwesenheit von 10 mg/ml Glykogen stattgefunden hatte (Daten nicht gezeigt). Dies war jedoch nicht reproduzierbar. Bei weiteren Experimenten von



Abb. 4.16: PK-Resistenz von rec PrP-Aggregaten mit verschiedenen Polysacchariden:

Die Aggregation von rec SHaPrP(29-231) erfolgte über 3 d bei 37 °C in 10 mM NaPi, pH 7,2 und 0,01 % SDS. **A:** ohne Saccharide, **B:** mit 10 mg/ml Glykogen, **C:** mit 5 mg/ml β -Cyclodextrin, **D:** mit 2 mg/ml Heparansulfat, **E:** mit 5 mg/ml β -Cyclodextrin und 2 mg/ml Heparansulfat und **F:** mit 10 mg/ml Glykogen und 2 mg/ml Heparansulfat. Anschließend wurde Proteinase K mit einer Endkonzentration von 20 ng/ μ l zugegeben und über die angegebenen Zeiten verdaut. Die Zeitreihen wurden anschließend mittels PAGE/Westernblot analysiert. Hierbei wurde rec SHaPrP(90-231) als Kontrolle aufgetragen (Bande K).

denen typische Ergebnisse in Abb. 4.16 auf der vorangegangenen Seite dargestellt sind, zeigten PrP-Aggregate bei Glykogenanwesenheit (s. Abb. 4.16.B) schwächere bis annähernd identische PK-Stabilität, verglichen mit der Kontrolle (s. Abb. 4.16.A). Die Anwesenheit von 9 mg/ml β-Cyclodextrin (s. Abb. 4.16.C) führte im allgemeinen zu einer annähernd identischen bis schwach erhöhten PK-Resistenz gegenüber den Kontrollaggregaten. Das Glykosaminoglykan Heparansulfat (HS), das als Beispiel für geladene sulphatierte Polysaccharide verwendet wurde, führte in einer Konzentration von 2 mg/ml zu einer mit der Kontrolle identischen, bis leicht schwächeren PK-Stabilität (s. Abb. 4.16.D). Da Glykosaminoglykane ebenfalls als Bestandteil von Prionen beschrieben sind (s. 1.3.4) wurde HS auch in Kombination mit anderen Sacchariden verwendet. Hierbei zeigte die Anwesenheit einer Kombination von HS und ß-Cyclodextrin eine leicht erhöhte PK-Resistenz verglichen mit der Kontrolle (s. Abb. 4.16.E). Die gleichzeitige Anwesenheit von Glykogen und HS führte meist zu einer identischen bis leicht schwächeren PK-Resistenz, dargestellt in Abb. 4.16.F. Bei dieser Probe, dominierte beim Abbau des PrP ein Fragment bei etwa 14 kDa. Dieses Fragment läuft auf gleicher Höhe im Gel, wie rec SHaPrP(90-231), das von seiner Sequenz dem N-terminal verkürzten PrP 27-30 entspricht. Eine leichte Akkumulation dieses Abbauproduktes wurde bei fast allen PrP-Proben beobachtet, die in Anwesenheit von HS und/oder Glykogen aggregierten. Dennoch wurde dieses Fragment auch in den Kontrollen, allerdings über die gesamte PK-Verdauung gleichbleibend stark detektiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle untersuchten Ansätze PK-Resistenz aufwiesen. Da Aggregationsreaktionen keine Gleichgewichtsreaktionen sind, scheint es jedoch fragwürdig, ob die Ergebnisse der einzelnen Ansätze miteinander vergleichbar sind. Dies wird durch die teilweise stark schwankenden Ergebnisse und schlechte Reproduzierbarkeit gestützt.

4.3.4 Lichtmikroskopische Struktur der PrP-Aggregate

Bei genügend hoher PrP-Konzentration entstehen durch die *in-vitro*-Konversion in 10 mM NaPi, pH 7,2 und 0,01 % SDS lichtmikroskopisch sichtbare Aggregate (s. 3.9.1). Abb. 4.17 auf der folgenden Seite zeigt solche Aggregate von rec SHaPrP(29-231), die ohne Glykogen und in Anwesenheit von 10 mg/ml Glykogen entstanden. Verglichen mit den Kontrollproben wiesen die Proben mit Glykogen weit mehr Aggregate auf. Diese waren größtenteils kleiner, lichtmikroskopisch dichter und feiner strukturiert als bei den Proben ohne Glykogen. Glykogen alleine wurde in Form einer Verteilung kleiner punktförmiger Strukturen über die gesamte Probe beobachtet (nicht gezeigt). Augenscheinlich dienten diese Strukturen als Keime für PrP-Aggregate, die daher häufiger aber auch kleiner waren als in den Ansätzen ohne Glykogen. Innerhalb einer Woche wurden die PrP-Aggregate mit und ohne Glykogen größer, wobei jedoch die grundlegenden Unterschiede zwischen beiden Ansätzen erhalten blieben (Daten nicht gezeigt).

Aggregate von rec SHaPrP(29-231) ohne Glykogen



Aggregate von rec SHaPrP(29-231) mit Glykogen



Abb. 4.17: Lichtmikroskopische Struktur der PrP-Aggregate:

Die Aggregation von rec PrP erfolgte über 24 h bei 37 °C in 10 mM NaPi, pH 7,2 und 0,01 % SDS. Dann wurden die Proben mittels Phasenkontrastmikroskopie analysiert. Die linke und mittlere Teilabbildung zeigen unterschiedliche Bilder des jeweiligen Ansatzes mit 250-facher Vergrößerung. Die rechte Teilabbildung zeigt jeweils einen Ausschnitt der mittleren mit 400-facher Vergrößerung.

4.3.5 Ultrastruktur der PrP-Aggregate

Für diese Untersuchungen wurde rec SHaPrP(29-231) über 1 Woche in 10 mM NaPi, pH 7,2, 0,01 % SDS und ggf. 10 mg/ml Glykogen inkubiert. Nach differentieller Ultrazentrifugation (s. 3.8.4) und Ammoniummolybdatfärbung (s. 3.9.3) wurden die Proben elektronenmikroskopisch untersucht. Bei den Proben ohne Glykogen wurden nur amorphe Aggregate beobach-



Abb. 4.18: Elektronenmikroskopische Struktur von PrP-Aggregaten:

Proben von rec SHa-PrP(29-231) wurden über 1 Woche bei 37 °C in 10 mM NaPi, pH 7,2 und 0,01 % SDS inkubiert. Nach differentieller Ultrazentrifugation und Färbung mit Ammoniummolybdat wurden die Proben mittels Elektronenmikroskopie analysiert. **A:** PrP 27-30-Fibrillen; **B:** rec SHaPrP(29-231) liegt nach Aggregation in Form amorpher Aggregate vor; **C:** rec SHaPrP(29-231) liegt nach Aggregation in Anwesenheit von 10 mg/ml Glykogen hauptsächlich in Form amorpher Aggregate vor. Zusätzlich waren stäbchenartige Strukturen zu beobachten. (Aufnahmen von K.-W. Leffers). tet. In Abb. 4.18.B ist hierfür ein Beispiel dargestellt. Oftmals waren diese Aggregate so groß, dass sie elektronenmikroskopisch nicht analysierbar waren. Diese amorphen Aggregate dominierten auch die Ultrastruktur der Proben mit 10 mg/ml Glykogen. Bei diesen Proben wurden jedoch zusätzlich auch stäbchenartige Strukturen gefunden, für die in Abb. 4.18.C ein typisches Beispiel gezeigt ist. Diese stäbchenartigen Strukturen endeten in allen beobachteten Fällen in amorphen Aggregaten. Zum Vergleich ist in Abb. 4.19.A die Ultrastruktur von Prionrods dargestellt, deren Hauptkomponente PrP 27-30 ist.

4.3.6 Koaggregationsnachweis

4.3.6.1 Etablierung der Methodik

Um eine Koaggregation von PrP mit dem Prion-Scaffold in Rekonstitutionsexperimenten sicherzustellen, sollte der Nachweis für die Koaggregation von Glykogen und rec SHaPrP erbracht werden. Da das Prion-Scaffold etwa 5-15 % der Prion-Aggregate ausmacht, musste die Nachweisgrenze für Glykogen wenigstens im dreistelligen Nanogrammbereich liegen, damit der Rahmen des verfügbaren rec PrP eingehalten werden konnte.

Zuerst wurde ein Nachweisverfahren für Glykogen anhand der "Iod/Stärke"-Reaktion entwickelt. Hierbei wurde Glykogen zunächst durch langsames Auftropfen auf eine Nitrocellulose- oder Mischestermembran und nachfolgender Trocknung für 1 h bei 80 °C mäßig immobilisiert. Nach Anfärbung mit Iod/Kaliumiodidlösung lag die Nachweisgrenze für Glykogen nach verschiedenen Optimierungen im einstelligen µg-Bereich.

Da sich bei den ersten Versuchen die Immobilisierung von Glykogen schwierig gestaltete, wurde hiernach das Glykogen-bindende Lektin Concanavalin A (ConA) immobilisiert an Mikrotiterplatten verwendet. Nach Bindung von Glykogen an die Mikrotiterplatten sollte dieses in einer Art "Sandwich"-Verfahren mittels Peroxidase- oder fluoreszenzmarkiertem ConA (s. 2.5) nachgewiesen werden. Jedoch lag die Nachweisgrenze mittels dieser Methodik noch höher als bei der Iod-Methode.

Anschließend sollte die Koaggregation von Glykogen und PrP im Zweistrahl-FCS mittels Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (FIDA) (s. 3.8.3) nachgewiesen werden. Messungen erfolgten mit Alexa 633-markiertem rec SHaPrP(29-231) (s. 3.2.4) und FITC-markiertem ConA (s. 2.5) als Fluoreszenzsonde für Glykogen. Zwar deuteten die Ergebnisse eine Koaggregation an, jedoch waren die Messungen nicht eindeutig auswertbar. So überlagerten einerseits Streueffekte von Glykogen mit ConA-FITC die Messungen, andererseits wurde ConA-FITC zu kleinen Teilen auch ohne Glykogen in PrP-Aggregate eingebaut. Ein monoklonaler Maus-anti-Glykogen-Antikörper (Garcia-Rocha *et al.* 2001) (s. 2.4) war nicht in ausreichender Menge verfügbar, um ihn zur Verwendung in der FCS mit einem Fluorophor zu koppeln. Jedoch war der Nachweis von Koaggregation mittels Fluoreszenz-mikroskopie bei Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpers (s. 2.4) möglich.

4. Ergebnisse

4.3.6.2 Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis von Koaggregation

Die Proben wurden wie unter 3.9.2 beschrieben für 24 h in 10 mM NaPi, pH 7,2 und 0,01 % SDS inkubiert und anschließend mit Anti-Glykogen- und GaM-Cy2-Antikörper behandelt. Die Ergebnisse der Untersuchungen mittels konfokaler laserscanning Mikroskopie sind in Abb. 4.19 dargestellt. In Proben mit 10 mg/ml Glykogen, war eine Verteilung von punkt- bis kreisförmigen Strukturen zu erkennen, die mit einer Cy2-Fluoreszenz einhergingen (s. Abb. 4.19.A). In Proben mit Alexa-633-markiertem rec SHaPrP(29-231) waren kleine amorphe Strukturen erkennbar, die mit der Fluoreszenz von Alexa 633 einhergingen (s. Abb. 4.19.B). In den Proben mit 10 mg/ml Glykogen und rec SHaPrP(29-231) waren beide Strukturen erkennbar. Nur ein geringer Teil der, zumeist kleineren, Alexa 633-positiven, amorphen Aggregate ließ keine Kolokalisation mit den Cy2-positiven Strukturen erkennen. Der größte Teil der Alexa 633-positiven Strukturen war mit mindestens einer Cy2-positiven Strukturen



Abb. 4.19: Fluoreszenzmikroskopische Analysen der Koaggregate von PrP und Glykogen:

Proben wurden 24 h bei 37 °C in 10 mM NaPi, pH 7,2 und 0,01 % SDS inkubiert. Nach Inkubation mit den Antikörpern Anti-Glykogen und GaM-Cy2 wurden die Proben mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht. Alle Aufnahmen erfolgten mit einem Wasserimmersionsobjektiv bei 600-facher Vergrößerung + 1.88 Kamera-Zoom und Excitation bei 488 bzw. 647 nm. A: 10 mg/ml Glykogen; B: rec SHaPrP(29-231) + Alexa 633-markiertes rec SHaPrP(29-231); C1, C2: rec SHaPrP(29-231) + Alexa 633-markiertes rec SHaPrP(29-231) + 10 mg/ml Glykogen. Bei A-C1 wurde jeweils 1 Ebene aufgenommen. C2: 16 Ebenen á 3 μ m überlagert dargestellt. kolokalisiert, wovon wiederum ein Großteil mehr als eine Cy2-positive Struktur aufwies (s. Abb. 4.19.C und D). Somit konnte die Koaggregation von PrP und Glykogen unter diesen Bedingungen nachgewiesen werden. Beim Scannen durch verschiedene Ebenen solcher Koaggregate wurde darüber hinaus beobachtet, dass die Cy2-positiven Strukturen innerhalb der Alexa 633-positiven amorphen Strukturen lokalisiert war (s. Abb. 4.19.D). Dies zusammen mit der beobachteten Häufung von Glykogenpartikeln innerhalb der PrP-Aggregate deutet auf einen eher spezifischen Prozess bei der Koaggregation hin.

4.3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Adaption des in-vitro-Konversionssystems

Die Ergebnisse zeigten, dass α -Methylglucosid als Modell für Monosaccharide auch in hohen Konzentrationen keinen Einfluss auf das in-vitro-Konversionsverhalten von rec SHaPrP(29-231) hat. Glykogen und β-Cyclodextrin beschleunigten unter den gleichen Bedingungen die Aggregation von rec PrP konzentrationsabhängig. In Anwesenheit hoher Konzentrationen beider Zucker erfolgte eine Verschiebung zu verstärkt ß-strukturierten Konformationen des PrP bereits bei höheren SDS-Konzentrationen. Die beobachteten Effekte waren auch bei pH 5 und mit rec SHaPrP(90-231) reproduzierbar. In hohen Konzentrationen verschoben Glykogen, ß-Cyclodextrin und Stärke die Löslichkeitsgrenze von PrP hin zu höheren SDS-Konzentrationen. Dabei zeigten Stärke und ß-Cyclodextrin einen bedeutend stärkeren Effekt als Glykogen. FCS-Messungen deuteten darüber hinaus auf eine durch Glykogen keiminduzierte PrP-Aggregation. Die Konzentrationsbestimmung von SDS zeigte in Anwesenheit von 10 mg/ml Glykogen eine Abweichung von mehr als 50 % in der Konzentration des freien SDS. Die zugrunde liegende Wechselwirkung von SDS-Molekülen mit Glykogen schien jedoch schwächer zu sein, als die Wechselwirkung von SDS-Molekülen mit PrP bzw. mit sich selbst bei der Bildung von Micellen. Alle untersuchten rec SHaPrP(29-231)-Aggregate zeigten PK-Resistenz. Diese schien jedoch weitgehend unabhängig von der Anwesenheit der getesteten Polysaccharide. In Anwesenheit von Glykogen und Heparansulfat deutete sich die Akkumulation eines ~14 kDa großen Abbaufragments über die Zeit an. Dieses Fragment war jedoch in gleichbleibend hoher Menge auch in den Kontrollen zu beobachten. Polarisationsmikroskopisch waren in Anwesenheit von 10 mg/ml Glykogen mehr Proteinaggregate zu beobachten als in der Kontrolle. PrP-Aggregate waren darüber hinaus in Anwesenheit von Glykogen kleiner, lichtmikroskopisch dichter und stärker strukturiert als ohne Glykogen-Zusatz. Auch hier schien sich eine Keimfunktion von Glykogen für die PrP-Aggregation zu bestätigen. Elektronenmikroskopisch wiesen alle untersuchten rec PrP-Aggregate amorphe Ultrastruktur auf. Bei Aggregation in Anwesenheit von Glykogen waren darüber hinaus stäbchenartige Strukturen zu beobachten. Die Entstehung von PrP/Glykogen-Koaggregaten in 10 mM NaPi, pH 7,2 und 0,01 % SDS innerhalb von 24 h konnte mittels konfokaler Laserscanning-Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Die Häufung von Glykogenpartikeln innerhalb der Koaggregate deutete darüber hinaus auf einen spezifischen Prozess hin.

4.4 Versuche zur Rekonstitution von Infektiosität

4.4.1 Versuche mit rec SHa PrP(29-231) und Modellsacchariden

Die unter 4.3 beschriebenen Experimente zeigten, dass auch in Anwesenheit verschiedener Polysaccharide rec SHaPrP(29-231) mit einer β -Faltblatt-reichen PrP-Struktur in Form unlöslicher PK-resistenter PrP-Aggregate ausfiel (s. 4.3.4). Bei Verwendung von Glykogen konnte darüber hinaus sogar Koaggregation nachgewiesen werden. Zum Zeitpunkt dieser Experimente war noch kein zelluläres PrP wie CHO-PrP^c oder SHa-PrP^c für Rekonstitutionsexperimente verfügbar, und auch die Optimierung der Prion-Scaffoldpräparation war noch nicht abgeschlossen. Zwar war bekannt, dass Experimente zur *in-vitro*-Generation mit rec PrP alleine nicht erfolgreich waren (s. 1.3.4), polymere Zusätze waren dabei bis dato jedoch noch nicht verwendet worden. Daher wurden folgende Proben mittels Bioassays auf Infektiosität untersucht, die ihre Relevanz in Zusammenhang mit den späteren Infektiositätsstudien erhalten:

a: ~70 ng/µl rec SHaPrP(29-231),

b: ~70 ng/µl rec SHaPrP(29-231) + 10 mg/ml Glykogen,

c: ~70 ng/µl rec SHaPrP(29-231) + 2 mg/ml Heparansulfat,

d: ~70 ng/µl rec SHaPrP(29-231) + 10 mg/ml Glykogen + 2 mg/ml Heparansulfat,

sowie die zugehörigen Pufferkontrollen. Alle Ansätze wurden in 10 mM NaPi, pH 7,2 und 0,01 % SDS über 7 d bei 37 °C inkubiert. Bei den Proben handelte es sich um die gleichen Proben, mit denen die unter 4.3.3 beschriebenen Ergebnisse nachgewiesen wurden, wobei dort Aliquots verwendet wurden, die 3 d inkubierten. Von den Bioassayproben wurden jeweils 75 μ l Probenvolumen nach sorgfältiger Resuspension entnommen und, wie unter 3.4 beschrieben, zur Inokulation benutzt (s. 3.4.2.

Der Versuch wurde vor kurzem nach 500 d Inkubation beendet. Bei keinem der Versuchtiere wurde aufgrund klinischer Befunde ein Hinweis auf Infektiosität gefunden. Da eine histopathologische Analyse der Hirne jedoch bislang noch nicht möglich war, kann eine subklinische Infektion nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund der Dosis-Wirkungskurven dieses Bioassays wäre somit theoretisch noch eine Infektiosität von 2 ID₅₀/µg PrP möglich (Beekes, pers. Mitteilung).

4.4.2 Versuche mit CHO-PrP^c und Prion-Scaffold

Nach Optimierung der Prion-Scaffold-Präparation, Etablierung der Bedingungen unter denen PrP/Polysaccharid-Koaggregate gebildet werden (s. 4.3) und entsprechender Verfügbarkeit der Materialien, wurden Rekonstitutionsexperimente mit Prion-Scaffold und PrP^C aus Kulturen chinesischer Hamster Ovarien-Zellen (CHO-PrP^C) durchgeführt. Mittels differentieller Ultrazentrifugation wurde zunächst beobachtet, dass das verwendete CHO-PrP^C bei Konzen-



Abb. 4.20: Löslichkeit der Rekonstitutionsansätze:

CHO-PrP^C, CHO-PrP^C + Prion-Scaffold und Prion-Scaffold wurden 3 d Inkubation bei 37 °C in 10 mM NaPi, pH 7,2 und 0,00185 % SDS inkubiert. Anschließend wurde die Verteilung von PrP auf Überstand und Pellet nach differentieller Ultrazentrifugation mittels Dot-Blot und immunologischem Proteinnachweis (Erstantikörper: 3F4) analysiert.

trationen <0,004 % SDS größtenteils unlöslich vorliegt (Daten nicht gezeigt). Dann wurden von folgende Ansätzen jeweils zwei Proben für Bioassays sowie eine Probe für die Untersuchung der Löslichkeit vorbereitet:

- a: 10 ng/µl CHO-PrP^C
- b: 10 ng/µl CHO-PrP^C + Prion-Scaffold entsprechend 50 ng/µl PrP 27-30
- c: Prion-Scaffold entsprechend 50 ng/µl PrP 27-30

Alle Proben wurden in 10 mM NaPi, pH 7,2 in 0,002 % SDS für 3 d bei 37° inkubiert.

Jeweils 100 μ l Probenvolumen (entsprechend 1 μ g CHO-PrP^c) wurden wie unter 3.4.2 beschrieben als Inokulum für Bioassays genutzt.

Die Untersuchung der Löslichkeit mittels differentieller Ultrazentrifugation und nachfolgender Analyse der Verteilung von PrP auf Überstand und Pellet mittels immunologischer PrP-Detektion ist in Abb. 4.20 gezeigt. CHO-PrP^C ohne Scaffold wurde unter diesen Bedingungen hauptsächlich im Pellet detektiert, allerdings verblieb ein sehr kleiner Anteil löslich im Überstand. In Anwesenheit des Prion-Scaffold wurde das gesamte CHO-PrP^C-Signal im Pellet detektiert. Das Prion-Scaffold allein zeigte kein PrP-positives Signal. Die hierbei zu beobachtende Inversfärbung beim Pellet deutet darauf hin, dass das Prion-Scaffold unter diesen Bedingungen ebenfalls unlöslich im Pellet vorlag.

Mit Stand 05. Mai 2003 inkubieren die Bioassays seit 195 von 500 Tagen. Aufgrund klinischer Befunde konnte bislang keine Infektiosität nachgewiesen werden. Aufgrund der Dosis-Wirkungskurven dieses Bioassays kann daher bislang eine Infektiosität >15 $ID_{50}/\mu g$ CHO-PrP^C für die Rekonstitutionsansätze ausgeschlossen werden. Für die Prion-Scaffold-kontrolle kann somit bislang eine Infektiosität von >3 $ID_{50}/\mu g$ PrP 27-30 Ausgangsmaterial ausgeschlossen werden (Beekes, pers. Mitteilung).

4.4.3 Versuche mit SHa-PrP^c, sol PrP 27-30 elu, Prion-Scaffold und Prionrodspezifischen Lipiden

Als weitere PrP-Spezies wurden PrP^c aus Hirnen gesunder syrischer Goldhamster (SHa-PrP^c) und PrP 27-30 nach SDS-Solubilisierung und Gelelution (sol PrP 27-30 elu, Leffers 1999) für Rekonstitutionsexperimente mit dem Prion-Scaffold verwendet. Ursprünglich waren Proben mit dem Prion-Scaffold alleine, und unter Zusatz einer Mischung von Prionrod-spezifischen Lipiden, welche die von Klein *et al.* (1998) in Prionrods detektierten Lipide Sphingomyelin, Galactosylceramid und Cholesterol im Verhältnis 1:1:1 enthielt, geplant. Leider zeigte sich, dass die Proben ohne Lipidmischung durch eine in der Scaffold-Präparation verbliebene Restaktivität von PK denaturiert waren. Aus Zeitgründen konnten diese in Kooperation mit der AG Prusiner in San Francisco durchgeführten Experimente bislang nicht wiederholt werden. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit nur die folgende Proben untersucht:

- a) 10 ng/µl sol PrP 27-30 elu + Prion-Scaffold entsprechend 19 ng/µl PrP 27-30 +
 - 2,3 ng/µl Prionrodlipidmischung.
- b) 17 ng/μl SHa-PrP^c + Prion-Scaffold entsprechend 33 ng/μl PrP 27-30 + 4 ng/μl Prionrodlipidmischung.

Alle Ansätze wurden, wie unter 3.4.3 ausführlicher beschrieben, in 10 mM Na-HEPES-Puffer mit 250 mM NaCl und 0,01 % SDS über 35 d bei 37 °C inkubiert. Nach differentieller Ultrazentrifugation wurde das Pellet in 50 μ l H₂O_{deion.} resuspendiert, und die 1 μ g eingesetztem PrP entsprechende Menge, wie unter 3.4 beschrieben als Inokulum vorbereitet. Als Kontrollansatz wurde c) die aus 5 μ g PrP 27-30 gewonnene Menge Prion-Scaffold als Inokulum vorbereitet. Bioassays wurden, wie unter 3.4.3 beschrieben, durchgeführt.

Mit Stand 06. Mai 2003 inkubieren die Bioassays zu Ansatz a) seit 257 von 500 d, die zu Ansatz b) und Kontrollansatz c) seit 222 von 500 d. Bislang konnten aufgrund klinischer Befunde bei keinem Tier Infektiosität nachgewiesen werden. Daher ergeben sich bis zum Abschluss der Bioassays und nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen folgende, vorläufige Ergebnisse: Somit kann bisher für die Proben aus den Ansätzen a) und b) eine Infektiosität >3 ID₅₀/µg sol PrP 27-30 elu bzw. SHa-PrP^C und für die Scaffoldkontrollen c) eine Infektiosität >0,6 ID₅₀/µg PrP 27-30 Ausgangsmaterial, ausgeschlossen werden.

4.4.4 Zusammenfassung der Infektiositätsstudien

Keiner der Rekonstitutionsansätze zeigte bislang Hinweise auf Infektiosität. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Rekonstitutionsexperimente nicht zu *de novo* Infektiosität führten. Das verwendete Prion-Scaffold wurde aus PrP 27-30 mit einer Infektiosität von 8,61 log $ID_{50}/\mu g$ präpariert. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse der Bioassays ergibt sich ferner für die unter 4.2.3 beschriebene Optimierung der Präparation des Prion-Scaffold eine PrP-Abreicherung um einen Faktor >680.000.000 (6,8 × 10⁸).

4.5 Advanced Glycation Endproducts und Prionen

Da Prionproteinaggregate *in vivo* eine hohe Lebenszeit haben, steigt die Wahrscheinlichkeit altersbedingter Modifikationen und damit verbundener pathogener Eigenschaften (vgl. 1.2.1). Advanced Glycation Endproduct (AGEs) sind altersassoziierte Modifikationen, die Proteine quervernetzen können. Dies kann zu Unlöslichkeit, erhöhter Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau und zytotoxischen Eigenschaften bei den modifizierten Proteinen führen (vgl. 1.2.2). Daher wurde das mögliche Vorkommen von AGEs in Prionen und Prionprotein-präparaten untersucht.

4.5.1 AGE-Modifikation von BSA in vitro

Rinderserumalbumin (BSA) wurde in vitro mit AGEs modifiziert, einerseits zur Synthese eines AGE-modifizierten Standards, andererseits um zu untersuchen, ob ein Polysaccharid wie das Prion-Scaffold zur Bildung von AGEs beitragen kann. Hierzu wurden BSA-Proben, wie unter 3.5.2 beschrieben, mit Glucose und Glykogen inkubiert. Der Verlauf der BSA-AGE-Bildung wurde, wie bei Loske et al. (1998) beschrieben, durch Messung der Absorptionszunahme bei einer Wellenlänge von 400 nm und durch Messung der Fluoreszenzzunahme beobachtet. Die Fluoreszenzanregung erfolgte bei 370 nm und die Detektion bei 440 nm. Abb. 4.21 auf der folgenden Seite zeigt Ergebnisse für Ansätze mit BSA, BSA + Glucose und BSA + Glykogen. Bei allen untersuchten Proben stieg die Absorption von BSA in Anwesenheit von Glucose bei 400 nm über 6 Wochen stark und linear an, während die Absorption der BSA-Kontrollen annähernd unverändert blieben (s. Abb. 4.21.A). In Anwesenheit von Glykogen schien die Absorption von BSA bei 400 nm leicht über die der BSA-Kontrolle zu steigen. Die Probe mit BSA und Glucose zeigte darüber hinaus einen erheblichen Anstieg der Fluoreszenz innerhalb der ersten Woche (s. Abb. 4.21.B). Diese fiel jedoch über die folgenden Wochen allmählich auf weniger als ein Drittel des Maximalwertes ab. Die Fluoreszenz der BSA-Kontrolle und der Probe mit BSA und Glykogen blieb dagegen annähernd gleich. Die Ergebnisse der Probe mit BSA + Glucose sprechen für eine stark zunehmende AGE-Modifikation des BSA über 6 Wochen. Die Abnahme der Fluoreszenz bei dieser Probe lässt sich mit Selbst-Quenching und/oder fortschreitender Reaktion/Oxidation unter Verlust der Fluoreszenzeigenschaften erklären. Die Absorptionszunahme bei 400 nm gilt als Marker für viele der möglichen AGE-Modifikationen, die Fluoreszenzzunahme spiegelt dagegen nur die fluoreszierenden AGEs wieder. Daher wäre es allein auf Basis der Ergebnisse mit BSA + Glykogen möglich, dass Glykogen AGE-Modifikationen über sehr lange Zeiten vermitteln könnte. So könnten z.B. radikalische Zwischenprodukte der AGE-Reaktionen eine allmähliche Freisetzung von Glucose aus Glykogen bewirken (s. auch Diskussion in 5.4). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass das genutzte Glykogen durch Glucose oder andere niedermolekulare Verbindungen mit Carbonylfunktion "verunreinigt" war, die eine leichte AGEung bewirkten.
Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Methode der AGE-Modifizierung von Proteinen in vitro erfolgreich etabliert wurde, und BSA-AGE-Standards als Positivkontrollen synthetisiert werden konnten.





Proben mit 1 mM Rinderserumalbumin (BSA), 1mM BSA + 50 mg/ml Glykogen und 1 mM BSA + 1 M Glukose wurden in 10 mM NaPi, pH 7,2 über 6 Wochen bei 50 °C inkubiert. **A**: Entwicklung der Absorption bei 400 nm über die Inkubationszeit. (An den Tagen 21 und 35 funktionierte das genutzte Spektralphotometer nicht einwandfrei. Daher wurden die in Klammern gesetzten Werte nicht weiter berücksichtigt). **B**: Entwicklung der Fluoreszenz über Inkubationszeit (Excitationswellenlänge = 370 nm, Emmissionswellenlänge = 440 nm). Als Referenz diente der jeweilige Ansatz ohne BSA.

4.5.2 Untersuchungen zum Einfluss von Quinacrin auf AGE-Modizierungen

Das zugelassene Medikament Quinacrin und weitere Acridin- und Phenothiazinderivate zeigten in Zellkultur Inhibierung der PrP^{sc}-Bildung (Korth *et al.* 2001). Quinacrin wird zur Zeit sogar als potentielles Anti-Prion-Medikament klinisch evaluiert (May *et al.* 2003). Der Wirkungsmechanismus von Quinacrin ist in diesem Zusammenhang jedoch gänzlich unbekannt (Korth *et al.* 2001). Quinacrin weist Ähnlichkeiten zu Substanzen auf, die AGE-Crosslinks auflösen können, sog. "AGE-Breakern" wie z.B. N-Phenacylthiazoliumbromid (Vasan *et al.* 1996). Daher wurde ein möglicher Einfluss von Quinacrin auf das AGEing untersucht.

Hierzu wurden Proben von BSA und BSA + Glucose mit und ohne Zugabe von Quinacrin, wie unter 3.5.2 beschrieben inkubiert und die Absorption bei 400 nm sowie die Fluoreszenz (Excitation bei 370 nm, Emmissionsdetektion bei 440 nm) wöchentlich bestimmt. Die Ergebnisse zeigten bei einmaliger Zugabe von Quinacrin keine auffälligen Unterschiede zu Proben ohne Quinacrin (Daten nicht gezeigt). Auch bei wöchentlicher Zugabe von Quinacrin zeigten die Proben mit BSA + Glucose identische Absorptionszunahmen bei 400 nm (s. Abb. 4.22). Offensichtlich stieg die Absorption der BSA-Kontrolle mit Quinacrin ebenfalls. Diese





Je zwei Proben 1 mM Rinderserumalbumin (BSA) bzw. 1 mM BSA + 1 M Glukose wurden in 10 mM NaPi, pH 7,2 über 6 Wochen bei 50 °C inkubiert. Jeweils einem dieser Ansätze wurde wöchentlich Quinacrin 10 μ M zugegeben. Gezeigt ist die Entwicklung der Absorption bei einer Wellenlänge von 400 nm. (An den Tag 14 funktionierte das genutzte Spektralphotometer nicht einwandfrei. Daher wurden die in Klammern gesetzten Werte nicht weiter berücksichtigt). Als Referenz diente der jeweilige Ansatz ohne BSA. Steigung entsprach etwa 1/3 der Proben mit BSA + Glucose. Die BSA-Kontrolle ohne Quinacrin dagegen wies keine Veränderung im Absorptionsverhalten über die Zeit. Die Fluoreszenzmessungen bei einer Excitationswellenlänge von 370 nm und einer Emmissionswellenlänge von 440 nm bestätigten diese Entwicklungen (Daten nicht gezeigt). Hierbei wiesen die Proben mit BSA + Glucose, BSA + Glucose + Quinacrin, aber auch die mit BSA + Quinacrin einen raschen Anstieg in der Fluoreszenz bis zur zweiten Woche auf, gefolgt vom Absinken der Fluoreszenz auf annähernd die Höhe der Ausgangswerte in Woche 6. Dabei war die Intensität der gemessenen Fluoreszenzen für alle drei Proben vergleichbar hoch. Die Quinacrin-Kontrolle alleine wies keinen vergleichbaren Anstieg in Absorption und Fluoreszenz auf.

Die Ergebnisse wiesen auf eine dem AGEing ähnliche Reaktion von Quinacrin mit BSA über die Zeit hin. Dabei war auffällig, dass die Absorption der Probe mit BSA, Quinacrin und Glucose keine vermehrte Absorptionszunahme im Vergleich zur Probe mit BSA und Glucose zeigte. Unter der Annahme, dass die beobachtete Reaktion von Quinacrin und BSA, ähnlich den AGE-Reaktionen (vgl. Abb. 1.2, S. 5), über sekundäre Aminogruppen von Lysin und Arginin abläuft, kann diese Differenz durch die Absättigung dieser Seitengruppen erklärt werden.

4.5.3 Immunologische Detektion von AGEs in PrP-Präparaten

Proben von rec SHaPrP(90-231), rec SHaPrP(29-231), CHO-PrP^C, SHaPrP^C, und dem Infektiositätsassoziierten PrP 27-30 wurden auf AGE-Modifikationen hin untersucht. Zusammen mit den Positivkontrollen KLH-AGE (s. 2.5) und BSA-AGE wurden die PrP-Proben in den in Abb. 4.23 auf der nächsten Seite angegebenen Konzentrationen mittels Dot-Blot (s. 3.5.4) und nachfolgendem immunologischem PrP- (s. 3.5.5.1) bzw. AGE-Nachweis (s. 3.5.5.3) analysiert. Als Erstantikörper wurden der anti-PrP-Antikörper 3F4 und die Antikörper gegen definierte AGE-Modifikationen 4G9 (anti-CML), PEN-12 (anti-Pentosidin) und H12 (anti-Pyrralin) verwendet. Die Positivkontrollen zeigten starke Signale bei Verwendung des anti-CML-Antikörpers 4G9, nicht jedoch bei den anderen Antikörpern. Alle untersuchten PrP-Spezies zeigten positive Signale bei allen drei anti-AGE-Antikörpern. Die stärksten Signale waren mit dem 4G9-Antiköper zu detektieren. Da eine densitometrische Auswertung nicht möglich war, wurde der Gehalt an AGEs unter der Annahme gleicher Bindungsspezifitäten im direkten augenscheinlichen Vergleich abgeschätzt. Hierbei entsprachen die CML-positiven Signale des 4G9-Antikörpers bei allen "nicht-infektiösen" PrP-Spezies etwa 10-15 % und bei PrP 27-30 etwa 1 % des Gesamt-PrP-Signals. Der Anteil Pentosidin-positiver und Pyrralin-positiver Signale entsprach bei allen Prionproteinspezies ca. 1 % des Gesamt-PrP-Signals. Zusammenfassend ergibt sich, dass in allen untersuchten PrP-Spezies die AGEs CML, Pentosidin und Pyrralin nachgewiesen wurden. Darüber hinaus deuteten sich Unterschiede zwischen dem Infektiositäts-assoziierten PrP 27-30 und den anderen PrP-Spezies an. So wies PrP 27-30 insgesamt geringere Anteile an CML auf, als die anderen PrP-Materialien.





rec SHaPrP(90-231), rec SHaPrP(29-231), CHO-PrP^C, SHa-PrP^C, PrP 27-30 sowie die Kontrollen BSA-AGE und KLH-AGE wurden in den angegebenen Mengen mittels Dot-Blot und immunologischer Detektion analysiert. Zur PrP-Detektion wurde der anti-SHaPrP-Antikörper 3F4, zur Detektion von AGEs der anti-CML-Antikörper 4G9, der anti-Pentosidin-Antikörper PEN-12 und der anti-Pyrralin-Antikörper H12 verwendet.

PAGE/Westernblotanalysen (s. 3.5.1 und 3.5.3) von rekombinanten PrP-Spezies zeigten ähnliche Ergebnisse. Hier wurde zusätzlich beobachtet, dass auch PrP-Dimere AGE-positive Signale aufwiesen. Darüber hinaus konnte mittels Strippen der Westernblots (3.5.6) und mehrfacher immunologischer Detektion auf demselben Blot gezeigt werden, dass die AGEpositiven Banden keine detektierbare Verschiebung zu den PrP-Banden aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Daher ist auszuschließen, daß AGE-Modifikationen nur bei einer spezifischen Subklasse der jeweiligen PrP-Probe vorhanden sind.

4.5.4 AGE-Modifikation von rec PrP und Auswirkung auf das Aggregationsverhalten

Die Auswirkung von AGE-Modifikationen auf die Löslichkeit von rec SHaPrP(29-231) wurde in einem Doppelansatz untersucht. AGE-Modifikationen wurden hierbei durch Inkubation mit 1 mM Methylglyoxal und 1 mM Glyoxal induziert (s. 3.2.5). Untersucht wurden lösliche PrP-Proben (0,2 % SDS) und PrP-Proben bei denen die Verschiebung zur β -reichen Konformation sowie Aggregation und Unlöslichkeit im Ansatz induziert wurde (0,01 % SDS). Alle Ansätze wurden über 3 d in 200 mM NaPi jeweils ohne und mit Glyoxal und Methylglyoxal inkubiert. Nachfolgend wurde mittels differentieller Ultrazentrifugation und anschließender Dot-Blotanalyse die Verteilung von PrP bzw. CML-modifiziertem PrP auf Überstand und Pellet analysiert. Wie aus Abb. 4.24 ersichtlich, wurden die Proben in denen keine AGE-Modifikation induziert wurde, bei 0,2 % SDS hauptsächlich im Überstand und bei 0.01 % hauptsächlich im Pellet detektiert. Dies war sowohl mit dem Anti-PrP-Antikörper 3F4, als auch mit dem Anti-CML-Antikörper 4G9 nachweisbar. Bei den Proben in denen AGE-Modifikation induziert wurde, war mit dem 3F4-Antikörper bei allen Proben kein Signal detektierbar. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass das 3F4-Epitop (Aminosäuren 109-112) ein Lysin enthält, welches AGE-modifiziert werden kann. In den AGE-Ansätzen würde somit durch Epitopmaskierung eine Detektion mit 3F4 unmöglich. Mit dem 4G9-Antikörper waren bei 0,2 % SDS in Überstand und Pellet Signale zu detektieren, wobei die



Antikörper: 4G9 (anti-CML)



Proben von rec SHaPrP(29-231) wurden in 0,2 % SDS bzw. 0,01 % SDS inkubiert. Jeweils eine Probe wurde zusätzlich mit 1 mM Methylglyoxal/Glyoxal intensiv AGE-modifiziert. Nach differentieller Ultrazentrifugation wurden Überstände und Pellets in den angegebenen Verdünnungen mittels Dot-Blot auf PrP und CML analysiert. Der der untere Dot-Blot mit dem 4G9-Antikörper wurde länger exponiert als der obere Dot-Blot mit dem 3F4-Antikörper. Verteilung etwa 1:3 für Überstand:Pellet betrug. Hier führte die AGE-Modifizierung anscheinend zu Unlöslichkeit von PrP in 0.2 % SDS. Bei der PrP-Probe in 0,01 % SDS wurden mit 4G9 schwache Signale im Pellet detektiert. Entweder waren die PrP-Proben hier degradiert, oder der AGE-Modifizierungsansatz führte bei aggregierendem PrP zu weitergehenden Modifizierung der CML-Addukte hin zu anderen AGEs. Diese Ergebnisse waren in einem Doppelansatz reproduzierbar, dennoch wurden diese Untersuchungen bislang nur mit einer Charge von rec SHaPrP(29-231) durchgeführt. Daher wurden diese Ergebnisse eher als richtungsweisend für zukünftige Fragestellungen gewertet.

4.5.5 Zusammenfassung der Untersuchungen zu AGEs bei Prionen

Im Verlauf der Untersuchungen zu AGE-Modifikationen bei Prionen wurden Methoden zu AGE-Modifizierung von Proteinen *in vitro* erfolgreich etabliert und hierdurch BSA-AGES als Positivkontrollen synthetisiert. Ferner deutete sich die Möglichkeit an, dass ein Polysaccharid wie Glykogen über sehr lange Zeiten zur Bildung von AGE-Modifikationen führen kann. Es konnte ausgeschlossen werden, dass Quinacrin, welches als Anti-Prion-Therapeutikum eingesetzt wird, eine Funktion als AGE-Breaker hat. Vielmehr schien Quinacrin in einer AGE-ähnlichen Reaktion zur Modifikationen von BSA zu führen. Versuche zur in-vitro-Konversion von rec PrP deuteten an, dass intensive AGEung lösliches PrP trotz Anwesenheit von 0,2 % SDS in unlösliches überführen kann. Dot-Blot-Analysen verschiedener PrP-Präparate mit spezifischen anti-AGE-Antikörpern zeigten, dass rec SHaPrP(90-231), rec SHaPrP(29-231), CHO-PrP^c, SHa-PrP^c und auch PrP 27-30 signifikante Anteile an AGE-modifiziertem PrP aufwiesen. Dabei zeigte sich, dass das Infektiositäts-assoziierte PrP 27-30 weniger AGE-Modifikationen aufwies, als die "nicht-infektiösen" PrP-Spezies.

5. Diskussion

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit umfasste strukturelle Analysen des Prion-Scaffold aus verschiedenen Prionpräparationen und Vergleichspräparaten, Untersuchungen zum Einfluss von Polysacchariden auf die Strukturumwandlung des Prionproteins (PrP), Rekonstitutionsversuche mit Polysacchariden, dem Prion-Scaffold und verschiedenen PrP-Spezies, ferner Analysen von Advanced Glycation Endproducts (AGEs) in PrP-Präparaten und Prionen sowie erste Versuche zum Einfluss von AGEs auf die PrP-Strukturumwandlung. Im Folgenden wird daher zunächst die Natur des Prion-Scaffold sowie seine mögliche Verbindung zu altersassoziierten Prozessen diskutiert. Anschließend wird der Einfluss von Polysacchariden auf die Strukturumwandlung und Aggregation des Prionproteins behandelt, gefolgt von einer Erörterung der vorläufigen Ergebnisse der Rekonstitutionsversuche. Die Ergebnisse der AGE-Analysen sowie der Untersuchungen zum Einfluss von AGEs auf die PrP-Strukturumwandlung werden danach diskutiert, bevor abschließend alle Ergebnisse im Kontext alterungsassoziierter Prozesse bei neurodegenerativen Krankheiten betrachtet werden.

5.1 Zur Natur des Prion-Scaffold

In dieser Arbeit wurde bestätigt, dass es sich bei dem Prion-Scaffold um ein Glucosehomopolymer handelt, dessen Monomere hauptsächlich 1,4- verknüpft sind und das zudem Verzweigungspunkte in Form 1,4,6-verknüpfter Glucosyleinheiten aufweist (s. 4.1). Es konnte ferner eindeutig von den N-Glykosylierungen und dem GPI-Anker des Prionproteins unterschieden werden. Außerdem wurde die Stereochemie der glykosidischen Bindungen des Prion-Scaffold als α-glykosidisch aufgeklärt. Die Untersuchungen von PrP 33-35 und ScN2a-Zelllysaten, weisen darauf hin, dass es sich bei dem Prion-Scaffold um eine generelle Komponente von Prionpräparaten handelt. Auch in Isolaten von RML- bzw. Me7-Prionen wurde Glucose als Marker für das Prion-Scaffold gefunden. Auf Basis der Analysen von Vergleichspräparaten aus gesunden Hamsterhirnen konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese ebenfalls ein dem Prion-Scaffold ähnliches Polysaccharid enthielten. Die untersuchten Präparate aus gesunden Hamsterhirnen wurden jedoch mit der gleichen Präparationsmethode wie PrP 27-30 gewonnen, die auf einer limitierten PK-Verdauung und Saccharosegradienten-Zentrifugation beruht (vgl. 2.5). Die Präparation von PrP 33-35 erfolgte dagegen auf Basis von Mikrofiltration, und das Prion-Scaffold wurde dennoch nachgewiesen. Ferner zeigten quantitative Glykoanalysen, dass der Gesamtgehalt an Zuckern in Präparationen aus gesunden Hirnen wesentlich geringer war als in den Prionpräparaten (Dumpitak 1998). Daher erscheint es insbesondere in Zusammenhang mit den in 1.3.4 vorgestellten Daten von McKinley et al. (1986) als sehr wahrscheinlich, dass das Prion-Scaffold mit Prionen vergesellschaftet vorliegt und nicht Artefakt der Präparationsmethodik ist. Eine Erklärung für das Vorkommen eines vergleichbaren Polysaccharides in gesunden Hirnen wird in 5.1.3 diskutiert.

5.1.1 Das Prion-Scaffold weist große Ähnlichkeit zu Glykogen auf.

Von den bekannten wirtseigenen Polysacchariden weist Glykogen die größte Ähnlichkeit zum Prion-Scaffold auf. Unter dem Begriff "Glykogen" wird eine Klasse verzweigter Polymere zusammengefasst, die in unterschiedlicher Verzweigungsdichte und Größe in fast allen Geweben von Säugern vorkommt. Die hauptsächliche, wenn nicht alleinige Zuckerkomponente von Glykogen ist Glucose. Diese ist primär α -1,4-glykosidisch verknüpft und weist bei einer durchschnittlichen Kettenlänge von 10-15 Glucosyleinheiten Verzweigungen durch α -1,6-glykosidische Bindungen auf. Das durchschnittliche Glykogen, z.B. der Skelettmuskulatur, besteht aus 12 Reihen äußerer α -1,4-verknüpfter Glucosylketten, hat eine Masse von 10 MDa und enthält etwa 55.000 Glucosyleinheiten. Es liegt *in vivo* meist als Komplex (sog. β -Parti kel) mit den Enzymen seines Metabolismus vor (zur Übersicht s. Smith *et al.* 1968; Preiss & Walsh 1981; Roach 2000). Das reduzierende Ende (1'OH-Gruppe) des Glucosepolymers ist hierbei kovalent an das 37 kDa-Protein Glykogenin gebunden. Dieses liegt als Dimer vor und initiiert als eine Art Primer die Glykogenbiosynthese (zur Übersicht s. Alonso *et al.* 1995, Roach 2000). Ein hierauf basierendes Strukturmodell für Glykogen ist in Abb. 5.1 gezeigt.



Abb. 5.1: Schematische Darstellung eines Glykogenmoleküls:

Glykogen besteht aus Ketten α -1,4-verknüpfter Glucose, die durch α -1,4,6-verknüpfte Glucose verzweigt sind. Das reduzierende Ende (1'-OH-Gruppe) des Glucosepolysaccharides ist an Glykogenin (grauer Kasten) gebunden. Dieses 37 kDa große Protein liegt als Dimer vor und ist das Initiatorenzym der Glykogensynthese. Innerhalb der Helices, die durch α -1,4-verknüpfte Glucose gebildet werden, können Moleküle wie Iod, aber auch z.B. Fettsäuren komplexiert werden.

Der Glykogengehalt im Gehirn ist, verglichen mit dem der Leber oder der Skelettmuskulatur, eher gering (~1,5 % des Leberglykogens). Die Glykogenpartikel im Gehirn scheinen jedoch größer zu sein. So beträgt die durchschnittliche Masse von Glykogen aus Kaninchenhirn etwa 24 MDa bei maximalen Massen von 90-100 MDa (Chee *et al.* 1983). Glykogen ist im adulten Hirn hauptsächlich in Astrozyten lokalisiert, wurde aber gelegentlich auch in Neuronen beschrieben (zur Übersicht s. Magistretti *et al.* 1993).

Neben seiner Hauptfunktion als Energiequelle der Zelle erscheint eine weitere Funktion von Glykogen aufgrund seiner strukturellen Beschaffenheit als möglich: α -1,4-verknüpfte Glucosylketten, wie sie in Glykogen oder den Stärkebestandteilen Amylopektin und Amylose vorkommen, bilden in Abhängigkeit vom Wassergehalt verschiedene helikale Sekundärstrukturen aus. Andere Molekülen, wie z.B. Iod, können durch das Polysaccharid innerhalb einer sog. V-Helix-Struktur komplexiert werden (zur Übersicht s. Pfannemüller 1985; Yalpani 1988; Pérez & Kouwijzer 1999). Studien an Amylose zeigten, dass die hydrophilen Regionen des Polysaccharides in der V-Helix-Struktur nach außen gekehrt sind, während die hydrophoben Regionen im Inneren der Helix eine unpolare Kavität schaffen. Bei Wechselwirkung mit kleineren Substanzen bilden 6 Glucosyleinheiten eine Helixwindung mit einem Gefälle von etwa 8 Å. In diesem Fall beträgt der Durchmesser der gesamten Helix 13,5 Å, bei einem Durchmesser der inneren Kavität von 5,4 Å (Immel & Lichtenthaler 2000). Diese Ausmaße sind jedoch in Abhängigkeit von der Größe der komplexierten Substanz flexibel. So wurden bei Versuchen mit u.a. Fettsäuren, *tert*-Butanol, α -Naphtol und Vitamin-A-Acetat Helixwindungen von bis zu 8 Glucosyleinheiten, Kavitätsdurchmesser von bis zu 12,5 Å und Helixdurchmesser von bis zu 16,2 Å gemessen. In allen Fällen blieb jedoch das Helix-Gefälle von etwa 8 Å erhalten. (zur Übersicht s. Kubik et al. 1996). Bislang wurde noch nicht beschrieben, dass diese Möglichkeit zur Komplexbildung biologische Relevanz haben könnte. Dennoch erscheint Glykogen nicht nur aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeiten, sondern auch aufgrund seiner Interaktionsmöglichkeiten als idealer Kandidat für das Prion-Scaffold.

In den Präparationen des Prion-Scaffold aus Hamsterhirnen (PrP 27-30 und PrP 33-35) wurde jedoch auch 1,6-verknüpfte Glucose detektiert (s. Tab. 4.1.3). Diese Verknüpfung kann anhand der Literatur nicht mit Glykogen erklärt werden, da außer 1,4- und 1,4,6-verknüpfter Glucose bislang nur 1,3-verknüpfte Glucose als kleinerer Bestandteil von Glykogen beschrieben wurde (Wolfrom & Thompson 1957). In Präparationen aus ScN2a-Zelllysaten dagegen wurde diese Verknüpfung nicht gefunden. Auch dies erscheint zunächst wenig einleuchtend.

5.1.2 Molekulare Alterung als Erklärung für die 1,6-Verknüpfungen des Prion-Scaffold – Ein Modell für die Bindung von Glykogen an Proteinaggregate

Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, dass 1,6-verknüpfte Glucose intrinsischer Bestandteil des Prion-Scaffold ist und aus der normalen Hirnphysiologie herrührt; ein solches Polysaccharid wurde jedoch bislang noch nicht beschrieben. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass mit dem Prion-Scaffold ein weiteres Polysaccharid aufgereinigt wird. Beschrieben ist α -1,6verknüpfte Glucose jedoch nur als Hauptkomponente von Dextran, einem bakteriellen Polysaccharid (zur Übersicht s. Yalpani 1988). Zwar kann eine bakterielle Infektion der Tiere, aus denen das Prion-Scaffold präpariert wurde, nicht ausgeschlossen werden. Als Ursache für die im Prion-Scaffold detektierte 1,6-verknüpfte Glucose erscheint sie jedoch abwegig.

Eine wahrscheinlichere Erklärung bietet der Glykogenstoffwechsel: Wie in Abb. 5.2 gezeigt, katalysiert Glykogen-Phosphorylase die phosphorolytische Abtrennung von Glucose vom nichtreduzierenden Ende (freie 4'-OH-Gruppe) des Glykogens. Dieser Abbau stoppt vier Glucosyleinheiten vor einer Verzweigung. Hiernach muss zunächst eine Transferase einen Strang von drei Glucosyleinheiten auf einen anderen Zweig übertragen, bevor die 1,6-Glucosidase (*debranching enzyme*) die verbliebene α -1,6-glykosidische Bindung hydrolysieren kann. Der nun lineare Glucosylstrang kann anschließend weiter von der Glykogen-Phospho-



Abb. 5.2: Schematische Darstellung des Glykogenabaus:

A: Glykogen-Phosphorylase baut Glykogen phosphorolytisch vom nicht-reduzierenden Ende (freie 4'-OH-Gruppe) her ab. Vier Glucosyleinheiten vor einer Verzweigung stoppt dieser Vorgang. **B:** Anschließend überträgt eine Transferase drei Glucosyleinheiten vom 6'-Strang auf einen anderen Glucosylstrang. **C:** Hiernach erst kann das *debranching enzyme* die verbliebene α -1,6-glyko-sidische Bindung hydrolysieren. **D:** Abschließend erfolgt der weitere Abbau durch die Glykogen-Phosphorylase. **E:** Ist das 4'-OH-Ende, z.B. durch Einbau in ein PrP-Aggregat blockiert, kann also dieser Strang sowie ein Großteil des Glykogenmoleküles nicht auf enzymatischem Wege abgebaut werden. Bei langlebigen Aggregaten besteht nun die Möglichkeit, dass z.B. durch Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies oder durch mechanische Belastung Kettenbrüche stattfinden, die u.a. in 1,6-verknüpfter Glucose resultieren können.

rylase abgebaut werden. Wie in 5.1.1 beschrieben, können die V-Helices α -1,4-verknüpfter Glucose andere Moleküle komplexieren bzw. mit ihnen in Wechselwirkung treten. Die Fähigkeit von Glykogen, Iod zu komplexieren, sinkt rapide nach Entfernung der äußeren α-1,4-Ketten mittels
ß-Amylase. Dies wurde dahingehend gedeutet, dass nur die äußeren Glucosylketten Helices ausbilden können (Bullivant et al. 1983; Mohazzeb 1988). Wie in Abb. 5.2.E dargestellt, ist es also wahrscheinlich, dass zunächst nur die endständigen Helices von Glykogen in Proteinaggregate eingebaut werden. Dies würde dazu führen, dass sämtliche am Glykogenabbau beteiligten Enzyme blockiert wären, und die betroffenen Glucosylzweige konserviert würden. Der Abbau einer Majorität eines gesamten Astes wäre verhindert, wenn nur das Ende einer einzelnen Verzweigung in ein Proteinaggregat eingeschlossen würde. Aufgrund der Langlebigkeit der Koaggregate stiege die Wahrscheinlichkeit von Kettenbrüchen an den 1,4,6-Verzweigungspunkten, die in 1,6-verknüpfter Glucose resultieren können. Solche Brüche könnten z.B. durch Radikalstress (vgl. 1.2.1) oder mechanische Belastungen verursacht werden. Daher wäre das Vorkommen 1,6-verknüpfter Glucose auf molekulare Alterung des Glykogens zurückzuführen. Dies kann auch erklären, warum die 1,6-verknüpfte Glucose nicht im Prion-Scaffold aus ScN2a-Zelllysaten gefunden wurde. Im Gegensatz zu Prionen aus Hamsterhirnen fand hier keine monatelange Inkubation statt und somit traten keine intensiven molekularen Alterungsprozesse auf.

Zusammenfassend erscheint es daher am wahrscheinlichsten, dass sich das Prion-Scaffold von Glykogen ableitet, welches mit seinen V-Helices in Wechselwirkungen mit aggregierendem PrP trat. Ein Modell des Prion-Scaffold auf Grundlage sämtlicher Analysedaten ist in Abb. 5.3 gezeigt. Die Analyse des Prion-Scaffold impliziert darüber hinaus verschiedene Anwendungsmöglichkeiten, die in zukünftigen Experimenten zu evaluieren sind. Es wäre denkbar, die Kolokalisation des Prion-Scaffold mit PrP^{Sc}-Aggregaten für die Diag-



Abb. 5.3: Modell des Prion-Scaffold:

Repetetives Strukturelement auf Basis der Analysedaten von Dumpitak (1998), Appel (1999) und den Ergebnissen dieser Arbeit (s. 4.1).

nostik von Prionen zu nutzen und so die Spezifität zu erhöhen. Für die Inaktivierung von Prionen erscheint auf Basis des Prion-Scaffold der Einsatz glykolytischer Enzyme wie Amyloglucosidase als Ergänzung der Behandlung mit Proteinasen sinnvoll. Auch wäre zu etablieren, ob sich das Prion-Scaffold als Zielstruktur möglicher Therapeutika eignet, was insbesondere in Verbindung mit den im nächsten Abschnitt diskutierten Mechanismen als möglich erscheint.

5.1.3 Ist das Prion-Scaffold Produkt eines Abwehrmechanismus?

Weitere Deutungsmöglichkeiten für die Ergebnisse der Glykoanalytik (s. 4.1) ergeben sich aus Veröffentlichungen über die sog. Corpora amylacea und weitere Polyglucosan-Körperchen. Die auch "Hirnsand" genannten Corpora amylacea (CA) sind sphärische Partikel von 1,5-20 µm Durchmesser, die 1837 erstmalig von Purkinje beschrieben wurden. Das Vorkommen von CA ist mit der normalen menschlichen Alterung assoziiert, wobei sie mit zunehmendem Alter im gesamten ZNS, insbesondere aber im Hirn akkumulieren. Eine deutliche Erhöhung der Anzahl von CA geht außerdem mit verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten einher, wie der Alzheimerschen Krankheit (AD), der Amyotrophen Lateralen Sklerose (ALS) und der Multiplen Sklerose (MS). CA bestehen zu 90-95 % aus einem unlöslichen Polysaccharid, dem sog. Polyglucosan. Die Ergebnisse einer ganzen Reihe chemischer, biochemischer und histochemischer Analysen von Polyglucosan deuten darauf hin, dass es sich bei diesem Polysaccharid um eine alternative Organisationsform von Glykogen handelt. Neben den alterungsassoziierten CA gibt es Polyglucosan-Körperchen, die mit verschiedenen Krankheiten assoziiert sind, wie z.B. der Glykogenspeicherkrankheit vom Typ IV (Andersonsche Krankheit), dem Lafora-Syndrom oder der Adulten Polyglucosan-Körper-Krankheit (APBD). In allen Fällen finden sich massive Akkumulationen von Polyglucosan-Körperchen, beim Lafora-Syndrom und der APBD insbesondere im ZNS, oftmals begleitet von neuronalem Zelltod. Zu den Symptomen gehören beim Lafora-Syndrom eine progressive myoclonische Epilepsie, Ataxie und eine langsame Abnahme der mentalen Fähigkeiten. Die sehr seltene APBD ist eine Krankheit des späten mittleren Alters und geht mit dem Verlust motorischer, sensorischer und kognitiver Fähigkeiten und oftmals Demenz einher. Auch bei diesen krankheitsassoziierten Polyglucosan-Körperchen zeigten Analysen des Polyglucosans eine hohe Ähnlichkeit zu Glykogen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von CA und anderer Polyglucosan-Körperchen deuten sogar darauf hin, dass sich Glykogen-Granulae zu Polyglucosan-Körperchen entwickeln können. Bei den CA ergaben weitere Analysen, dass sie neben Polyglucosan kleine Mengen an Proteinen (4-5 %) und anderen Substanzen enthielten. Insbesondere Proteine, die als Antwort auf zellulären Stress exprimiert werden, Abbauprodukte von Myelin, Mitochondrien und neuronalem Zelltod, Produkte der Komplementsystemaktivierung sowie ubiquitinierte und AGE-modifizierte Proteine (vgl. 1.2.2) wurden in CA detektiert. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass CA als Behältnisse für zytotoxische und/oder nicht-degradierbare Produkte dienen, die in einer inerten Matrix aus Polyglucosan abgekapselt werden. CA wären somit Endprodukte eines Abkapselungsmechanismus des Gehirns (zur Übersicht s. Magistretti *et al.* 1983; Sugiyama *et al.* 1993; Chen & Burchell 1995; Singhrao *et al.* 1995; Cavanagh 1999). Im Zusammenhang mit diesem Mechanismus wurde die Theorie aufgestellt, dass im Falle neurodegenerativer Erkrankungen wie der AD die Fähigkeit des Gehirns, CA auszubilden überstiegen wird und als Resultat die hiermit verbundenen Proteinaggregate auftreten (Singhrao *et al.* 1995).

Es erscheint daher möglich, dass das Prion-Scaffold Resultat einer solchen "missglückten" Abkapselungsreaktion ist. Hierbei müsste die PrP-Aggregation schneller verlaufen als die Glykogen- bzw. Polyglucosan-Anlagerung. Da die molekularen Mechanismen der Umwandlung von Glykogen zu Polyglucosan sowie der Entstehung und Akkumulation von CA bislang unverstanden sind (Bobin *et al.* 1981; Magistretti *et al.* 1993), könnte auch hier das in 5.1.2 vorgestellte Modell der Bindung von Glykogen an Proteinaggregate als Erklärungsansatz dienen. Darüber hinaus bietet das Vorkommen von CA in gesunden gealterten Tieren eine mögliche Erklärung für die in Vergleichspräparationen gefundenen Zuckerkomponenten (s. Tab. 4.10, S. 65 und 4.13, S. 69). Diese Erklärung deckt sich mit den Ergebnissen von Weinmann (2000), die auf eine altersassoziierte Zunahme des Anteiles eines Prion-Scaffoldähnlichen Polysaccharides in gesunden Tieren hindeuteten. Ein Zusammenhang zwischen dem Prion-Scaffold und der Entstehung von Corpora amylacea ist also sehr wahrscheinlich.

5.2 Die *in-vitr*o-Konversion von rec PrP in Anwesenheit verschiedener Polysaccharide

Ein zentraler Schritt der Pathogenese von Prionkrankheiten ist die Umwandlung des nichtinfektiösen PrP^C in seine Scrapie-Isoform PrP^{Sc}. Da bislang in vitro noch keine Infektiosität dargestellt werden konnte, wird einerseits diskutiert, dass ein Faktor X die Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} energetisch begünstigen könnte, andererseits, dass eine nicht-PrP-Komponente für die Infektiosität notwendig sein könnte (s. 1.3.3 und 1.3.4). Daher sollte der Einfluss eines Polysaccharides wie dem Prion-Scaffold auf die PrP-Umwandlung untersucht werden. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit das von Post et al. (1998) entwickelte in-vitro-Konversionssystem (SDS-System) (s. 3.8.1) unter Verwendung rekombinanten PrPs und verschiedener Modellsaccharide erfolgreich zur Etablierung von PrP/Polysaccharid-Koaggregaten adaptiert (s. 4.3). Aufgrund der zuvor diskutierten Ähnlichkeiten wurde Glykogen aus Rinderleber als Modellsaccharid für das Prion-Scaffold verwendet. Die durchschnittliche Glykogenkonzentration im Hirn beträgt bei der Ratte 0,4-0,6 mg/g (Hevor 1994) bzw. 3-5 µmol Glucosyleinheiten pro g Hirngewebe (Choi & Grueter 2003). Innerhalb der natürlichen Superkomplexe von Glykogen, den β-Partikeln, beträgt die Glykogenkonzentration sogar ca. 20 mg/ml (Preiss 1981). Aufgrund der hohen Absorption von Glykogen bei den CD-spektroskopischen Untersuchungen konnten jedoch nur 10 mg/ml Glykogen als Nachahmung einer auf zellulärer

Ebene stattfindenden Wechselwirkung von PrP mit Glykogen- β -Partikeln eingesetzt werden. Als Adaptation einer zellulär leicht erhöhten Glykogenkonzentration wurde 1 mg/ml Glykogen eingesetzt. Als weitere Vergleichssubstanzen dienten Stärke (als Modell für weitere V-Helix-bildende Polysaccharide), β -Cyclodextrin (als Modell einzelner V-Helixwindungen aus sieben Glucosyleinheiten), Heparansulfat (als Modell für ionische Polysaccharide) und α -Methylglucosid (als Modell für monomere Glucose, da es im Gegensatz zu Glucose nicht optisch aktiv ist). Heparansulfat und Stärke konnten jedoch aufgrund ihrer hohen Absorption nicht für CD-spektroskopische Untersuchungen verwendet werden.

5.2.1 Die in-vitro-Konversion von PrP in Anwesenheit von Polysacchariden ist möglich

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.3 zeigen, dass die in-vitro-Konversion rekombinanten PrPs von einer PrP^C-ähnlichen zu einer PrP^{Sc}-ähnlichen Form - auch in Gegenwart eines Polysaccharides wie Glykogen im SDS-System möglich ist. Dabei waren mittels CD-Spektroskopie, differentieller Ultrazentrifugation und FCS keine grundlegenden Unterschiede zu den bereits von Post et al. (1998), Birkmann (2000) und Jansen et al. 2001 beschriebenen Phänomenen festzustellen: Bei höheren SDS-Konzentrationen (~0,2 % SDS) weist PrP eine Sekundärstruktur mit α-Helix- und unstrukturierten Anteilen auf. Mit abnehmender SDS-Konzentration geht diese in eine dimere Konformation mit erhöhtem α-Helix-Anteil über. In niedrigen SDS-Konzentrationen (~0,03 % SDS) liegt PrP in Form löslicher Oligomere mit dominierendem β-Strukturanteil vor, die schließlich bei SDS-Konzentrationen ≤0,01 % SDS weiter aggregieren und unlöslich werden. Im Detail waren jedoch Unterschiede aufgrund der Anwesenheit von Glykogen und den anderen Sacchariden festzustellen. So zeigen die Ergebnisse der CD-Spektroskopie (s. 4.3.1.1) eindeutig eine Beschleunigung der PrP-Aggregation bei 0,01 % SDS in Anwesenheit von Glykogen. Diese Beschleunigung war bei 10 mg/ml Glykogen (entspricht 55 µmol/ml Glucosyleinheiten) stärker ausgeprägt als bei 1 mg/ml (entspricht 5,5 µmol/ml Glucosyleinheiten). Ferner induzierte die höhere Glykogenkonzentration schon bei 0,05 % SDS den Übergang von PrP zur β-reichen Konformation sowie Aggregation und Unlöslichkeit. Dies war auch mit β-Cyclodextrin zu beobachten, wobei bereits mit 0,9 mg/ml (entspricht 5,5 µmol/ml Glucosyleinheiten), ein vergleichbarer Effekt erzielt wurde (s. 4.3.1.2). Dagegen zeigte α-Methylglucosid bei 0,05 % SDS selbst in Konzentrationen von 11 mg/ml (entspricht 55 µmol/ml Glucosyleinheiten) keinen Effekt.

Zusammenfassend mit den Ergebnissen zur Löslichkeit von PrP in Abhängigkeit von SDS-Konzentration und Saccharidzugabe (s. 4.3.1.3), lässt sich die Aussage treffen, dass Polysaccharide, die V-helicale Strukturen ausbilden können, im SDS-System die Aggregation von PrP fördern. Dieser Effekt scheint ferner vom Gehalt an V-Helices abzuhängen, da bei Stärke und β-Cyclodextrin der Effekt wesentlich intensiver ausgeprägt war als bei Glykogen.

Als Ursache dieser Effekte erscheinen drei verschiedene molekulare Phänomene möglich. So könnten sie zunächst auf eine direkte PrP/Polysaccharid-Wechselwirkung zurückzuführen sein, welche die PrP-Aggregation fördert. Im Zusammenhang mit dem Ergebnis, dass eine Glykogenkonzentration von 10 mg/ml die freie SDS-Konzentration um mehr als 50 % senkt (s. 4.3.2), erscheint jedoch eine andere Erklärung wahrscheinlicher. Hierbei wären die beobachteten Effekte dadurch zu erklären, dass die Bindung von SDS an Polysaccharide zu einer Erniedrigung der freien SDS-Konzentration führt und so die Verschiebung der Löslichkeit von PrP hin zu höheren SDS-Einwaagekonzentrationen verursacht. Allerdings war die beobachtete direkte Bindung an SDS weitaus höher als die Verschiebung der PrP-Übergangskurven sowie die Änderung der kritischen micellaren Konzentration von SDS in Anwesenheit von Glykogen. Demnach wäre die Wechselwirkung zwischen Glykogen und SDS schwächer als die zwischen SDS und PrP bzw. zwischen SDS-Molekülen bei der Bildung von Micellen. Dennoch kann eine SDS/Glykogen-Wechselwirkung als Ursache der beobachteten Effekte nicht ausgeschlossen werden. Eine dritte Erklärungsmöglichkeit bietet der sog. Volumenausschluss-Effekt. Dieser Effekt berücksichtigt, dass biologische Prozesse in vivo nicht in wässrigen, sondern in Lösungen heterogener Makromoleküle stattfinden. Dabei machen diese Makromoleküle etwa 20-30 % des Gesamtvolumens des Mediums aus und liegen in Konzentrationen von 50-400 g/l vor. Der gegenseitige Volumenausschluss verringert die strukturelle Entropie der Makromoleküle, wodurch die freie Energie und das chemische Potential jeder in der Lösung vorhandenen Makromolekülspezies erhöht wird. Dies führt zu Verschiebungen von Reaktionsgleichgewichten in der Richtung, dass solche Zustände favorisiert werden, die mit dem geringsten Volumenausschluss für die dominierende makromolekulare Spezies verbunden sind (zur Übersicht s. Ellis 2001; Minton 2000; 2001; Li et al. 2001; Kinjo & Takada 2002a, b). Insbesondere Faltungsreaktionen von Proteinen mit hoher Aggregationstendenz scheinen hierdurch beeinflussbar. So führten hohe Konzentrationen von BSA, Ficoll 70 und Dextran 70 dazu, dass die korrekte Rückfaltung von reduziertem und degradiertem Lysozym aufgrund einer beschleunigten Aggregation fast vollständig verhindert wurden (van den Berg et al. 1999). Auch die Bildung amyloider Fibrillen aus Apolipoprotein C-II wurde mit zunehmender Dextrankonzentration beschleunigt (Hatters et al. 2002). Bei einer weiteren Studie wurde beobachtet, dass die Beschleunigung der Fibrillogenese von α -Synuclein (vgl. Tab 1.1, S. 10) sowohl mit zunehmender Konzentration aber auch mit steigender Größe der zugegebenen Agenzien einherging (Uversky et al. 2001). Die Beschleunigung der PrP-Aggregation in Zusammenhang mit der Zugabe von Polysacchariden könnte also auch auf den Volumenausschluss-Effekt zurückzuführen sein. Insbesondere Glykogen und Stärke kommen hierfür als sehr große Moleküle in Frage.

Ob nur eine der diskutierten Möglichkeiten oder eine Kombination mehrerer zu den beobachteten Effekten führten, ist auf Grundlage der vorhandenen Daten nicht zu beurteilen. In jedem Fall zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass bei zukünftigen biophysikalischen Studien zur *in-vitro*-Konversion von PrP mittels SDS-System, im Fall der Zugabe weiterer Komponenten, sowohl deren mögliche Wechselwirkungen mit SDS, als auch deren möglicher Volumenausschluss-Effekt berücksichtigt werden müssen. Um solche Wechselwirkungen auszuschließen, könnten alternative Induktionen der *in-vitro*-Konversion von PrP z.B. durch Veränderung des pH-Wertes oder der Temperatur für derartige Studien von Vorteil sein. Allerdings ginge hierbei der Vorteil des SDS-Systems als Simulation einer Zellmembranumgebung verloren.

5.2.2 Entstehen PrP/Polysaccharid-Koaggregate durch keiminduzierte Aggregation?

Die bislang diskutierten Ergebnisse zeigten, dass die *in-vitro*-Konversion auch in Gegenwart von Polysacchariden zu aggregierenden, unlöslichen β-strukturierten PrP-Oligomeren bzw. Multimeren führte. Hauptsächliches Ziel dieser Versuche war jedoch die Bildung und der Nachweis von Koaggregaten zwischen hochmolekularen Polysacchariden und PrP. Es wurde vermutet, dass die proteolytische Verdauung von rec PrP/Polysaccharid-Koaggregaten aufgrund sterischer Behinderungen langsamer verlaufen müsste als bei rec PrP-Aggregaten. Mit Ausnahme eines nicht reproduzierbaren Versuches, in dem erhöhte PK-Resistenz in Zusammenhang mit 10 mg/ml Glykogen beobachtet wurde, zeigten die durchgeführten PK-Verdauungen (s. 4.3.3) keine signifikanten Veränderung in der PK-Resistenz, wenn die PrP-Aggregation in Gegenwart verschiedener Polysaccharide stattfand. Einzig auffällig war, dass ein 14 kDa großes Abbaufragment erst zu späteren Zeiten auftrat, wenn die PK-Verdauung in Gegenwart von Heparansulfat und Glykogen stattfand. In der Kontrolle wurde dieses Abbaufragment dagegen über die gesamte Zeit der Verdauung in gleichbleibend hoher Menge beobachtet. Die Experimente ließen daher keinen Schluss auf die Existenz von Koaggregaten zu.

Von der Arbeitsgruppe Caughey wurde dagegen beschrieben, dass die PK-Resistenz von PrP-Aggregaten mit zunehmenden Konzentrationen von Heparansulfat steigt. Als Plateau wurde eine fünffache Erhöhung der PK-Resistenz ab Konzentrationen von 5 µg/ml Heparansulfat angegeben (Wong *et al.* 2001). Diese Daten wurden jedoch mit einem *in-vitro*-Konversionssystem ermittelt, bei dem eine keiminduzierte Aggregation durch Zugabe eines Überschusses von infektiösem PrP^{Se} zu radioaktiv markiertem [³⁵S]PrP erfolgte. Die PK-Resistenz des angelagerten [³⁵S]PrP wurde nach PK-Verdauung und Gelelektrophorese mittels Filmexposition detektiert. Die Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse liegt in den unterschiedlichen *in-vitro*-Konversionssytemen begründet. Wong *et al.* (2001) beschreiben eine Erhöhung der PK-Resistenz von PrP, das sich an Prionaggregate anlagert, also einen Oberflächeneffekt. Mit dem SDS-System dagegen wird die Aggregation von PrP direkt induziert. Eine hiermit induzierte PK-Resistenz beruht also auf einem Volumeneffekt. Die Ergebnisse sind also nicht miteinander vergleichbar und nur scheinbar widersprüchlich.

Im Gegensatz zu den zuvor diskutierten Ergebnissen zeigte die lichtmikroskopische Untersuchung (s. 4.3.4) eindeutige spezifische Unterschiede zwischen der PrP-Aggregation mit und ohne Vorhandensein von Glykogen. Fand die Aggregation in Anwesenheit von Glykogen statt, wurde eine höhere Anzahl von PrP-Aggregaten beobachtet, die kleiner, lichtmikroskopisch dichter und feiner strukturiert waren als bei Aggregation ohne Glykogen. Im Zusammenhang mit der Verteilung punktförmiger Strukturen, die in der Glykogenkontrolle beobachtet wurde, ließe sich die erhöhte Anzahl von PrP-Aggregaten sowie die verringerte durchschnittliche Aggregatgröße in Anwesenheit von Glykogen damit erklären, dass die Glykogenpartikel als Keime für die PrP-Aggregation dienten. Die PrP-Aggregation in Anwesenheit von Glykogen wäre also eine keiminduzierte Aggregation, während die Aggregation ohne Glykogen eher einer spontanen de novo Aggregation entspricht. Diese Interpretation wird durch die Ergebnisse der CD- und FCS-Spektroskopie (s. 4.3.1.1) gestützt. In Anwesenheit von Glykogen zeigen die CD-Spektren eine beschleunigte PrP-Aggregation, und die FCS-Spektren ein sofortiges Auftreten von PrP-Aggregaten direkt nach Induktion der PrP-Aggregation in 0,01 % SDS. Da ohne Glykogen die spontane Aggregation von PrP weitaus langsamer verläuft (Post et al. 1998; Schäfer 1997), kann dies nur durch eine keiminduzierte Aggregation erklärt werden. Dass die PrP-Aggregate in Anwesenheit von Glykogen lichtmikroskopisch dichter und feiner strukturiert erschienen, könnte auf den unter 5.2.1 beschriebenen Volumenausschluss-Effekt zurückzuführen sein. Die Anwesenheit von Glykogen würde also zu einem höheren Volumenausschluss in den PrP-Aggregaten führen. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur der PrP-Aggregate (s. 4.3.5) zeigte, dass diese in beiden Fällen größtenteils amorph vorlagen. In den Proben, bei denen die Aggregation in Anwesenheit von Glykogen erfolgte, waren darüber hinaus stäbchenartige Strukturen zu erkennen. Verglichen mit Prionrods sind diese in jedem Fall weniger fein strukturiert und wesentlich länger. Die stäbchenartigen Strukturen bestanden zudem aus feineren Fäden, die durch amorphe Strukturen unterbrochen waren. Dennoch war auch hier die typische gewundene Struktur amyloider Fibrillen nicht zu erkennen. Wie diese Strukturen mit Glykogen in Zusammenhang stehen, und ob sie Vorläufer amyloider Fibrillen sein könnten, lässt sich aus den vorhandenen Daten nicht klären. Hierzu sind weitere Studien nötig.

Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen mittels fluoreszenzmarkiertem PrP, anti-Glykogen-Antikörper und fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper (s. 4.3.6) zeigten eindeutig, dass PrP/Glykogen-Koaggregate entstehen, wenn PrP in Anwesenheit von Glykogen aggregiert. Die Beobachtung, dass zumeist mehrere Glykogenpartikel innerhalb eines PrP/Glykogen-Koaggregates lokalisiert sind, deutet ferner auf eine spezifische Wechselwirkung zwischen Glykogen und PrP hin. Auf Basis der Verteilung polarer und unpolarer Oberflächenanteile bei PrP (vgl. Abb. 1.6, S. 18) erscheint eine hydrophobe Wechselwirkung zwischen dem flexiblen hydrophoben Bereich (AS 29-127) von rec SHaPrP(29-231) und der unpolaren Kavität einer Glykogen-V-Helix möglich. Auch eine polare Wechselwirkung zwi-



Abb. 5.4: Modell der keiminduziertern PrP-Aggregation an Glykogen:

Die endständigen α-1,4-Glucosylketten von Glykogen nehmen in Wechselwirkung mit aggregierendem PrP V-Helixkonformation an. Durch unpolare Wechselwirkungen zwischen der inneren hydrophoben V-Helix-Kavität und dem hydrophoben flexiblen Bereich des PrP, bzw. polaren Wechselwirkungen zwischen dem polaren äußeren der V-Helix und dem polaren PrP-Core bindet PrP an die äußeren Regionen von Glykogen, das auf diese Weise als Keim für die PrP-Aggregation dient.

schen dem polaren, stark geladenen PrP-Core (AS 128-231) und den äußeren hydrophilen Regionen V-helikaler Strukturbereiche von Glykogen oder eine Kombination von beiden Wechselwirkungen ist denkbar. Ein mögliches Modell der Wechselwirkung zwischen Glykogen und PrP als Basis einer keiminduzierten Aggregation ist in Abb. 5.4 gezeigt.

Da mittels CD-Spektroskopie nur Aussagen über die Sekundärstruktur von Proteinen in Lösung gemacht werden können, kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass PrP innerhalb der Koaggregate weiterhin eine β -dominierte Sekundärstruktur aufweist. Nur wenige Veröffentlichungen haben sich bislang damit beschäftigt, den Einfluss der Koaggregation mit Polysacchariden auf die Proteinstruktur zu untersuchen. Die wenigen Ergebnisse stammen aus dem Bereich der Mikroverkapselung durch komplexe Koazervation. Komplexe Koazervation bezeichnet in diesem Zusammenhang das Ausfällen zweier entgegengesetzt geladener Polymere in einer feinen Dispersion von Koaggregaten. So wies Ribulose-bisphosphat-carboxylase bei Koazervation mit Pektin einen verminderten Anteil α -helikaler Strukturanteile auf. Hiermit war auch eine Verminderung der Denaturierungstemperatur und –enthalpie verbunden (zur Übersicht s. Schmitt *et al.* 1998). Im Gegensatz zu Pektin ist Glykogen jedoch ein ungeladenes Polysaccharid. Aus dem Volumenausschluss-Effekt (s. 5.2.1) kann man dennoch drei Einflüsse für Proteinaggregation ableiten: a) Stabilisierung des nativen Proteins vor Beginn der Aggregation, b) Beschleunigung des Einsetzens von Aggregation und des Wachstums von Aggregaten im frühen Stadium und c) Verlangsamung des Gleichgewichtsprozesses der Aggregation im späteren Stadium (Kinjo & Takada 2002a; b). Da die PrP-Aggregation mit einer Umwandlung zu einer β -dominierten Sekundärstruktur einhergeht, ist es also wahrscheinlich, dass diese auch innerhalb der Koaggregate vorliegt.

Zusammenfassend führt Glykogen im SDS-System verglichen mit der PrP-Aggregation ohne Glykogen: 1.) zur Koaggregation von Glykogen und PrP,

2.) zum beschleunigten Einsetzten der PrP-Aggregation,

3.) zu einem schnelleren Aggregationsverlauf.

4.) zu einer höheren Zahl kleinerer Aggregate mit gleicher PK-Resistenz.

Die wahrscheinlichsten Ursachen hierfür sind: a) eine direkte Wechselwirkung von Glykogen und PrP, b) ein Glykogen-bedingter Volumenausschlußeffekt und c) eine Glykogen-bedingte keiminduzierte PrP-Aggregation.

5.3 Rekonstitutionsexperimente mit Polysacchariden und Prion-Scaffold

Zur de novo Darstellung von Infektiosität müssen sämtliche Ausgangsmaterialien frei von Infektiosität sein. Hierzu wurde im Rahmen dieser Arbeit die Präparation des Prion-Scaffold aus hochinfektiösem Prionrods dahingehend optimiert (s. 4.2), dass in den Präparaten PrP 27-30 um einen Faktor größer 6.8×10^8 abgereichert wurde (s. 4.4.4). In den noch laufenden Infektiositätsstudien konnte für die optimierte Präparation des Prion-Scaffold bislang keine Infektiosität, bzw. eine Abnahme der Infektiosität von 8,6 log ID₅₀/µg Ausgangsmaterial auf weniger als 0,6 ID₅₀/µg Ausgangsmaterial nachgewiesen werden. Experimente zur Rekonstitution von Infektiosität wurden mit rec SHaPrP(29-231) unter Zusatz von Glykogen und/oder Heparansulfat, mit CHO-PrP^C unter Zusatz des Prion-Scaffold und mit SHa-PrP^C bzw. sol PrP 27-30 elu unter Zusatz des Prion-Scaffold und einer Mischung von prionspezifischen Lipiden durchgeführt. In den noch laufenden Infektiositätsstudien wurde bislang noch kein Hinweis auf Infektiosität gefunden. Die theoretisch noch möglichen Infektiositäten liegen bei weniger als 11-15 ID₅₀/µg PrP (s. 4.4). Diese Werte sind allerdings Näherungen, da die zur Berechnung potentieller Infektiositäten genutzten Formeln aus Endpunkt-Titrationen des Scrapie-Erregers im jeweiligen Tiermodell (s. 3.4) stammen. Für eine exakte Bestimmung von Infektiositätstitern ist eine Endpunkttitration mit dem jeweiligen Erregermaterial nötig (Prusiner et al. 1982). Diese erscheint jedoch nur in Zusammenhang mit nachweisbarer Infektiosität sinnvoll. Zusammenfassend ist daher auszuschließen, dass hohe Mengen von Infektiosität de novo entstanden sind. Eine subklinische Infektion der Versuchstiere wäre jedoch möglich, und das

Auftreten eines solchen Phänomens ist bekannt. So wurde bei Mäusen, die mit hohen Dosen des Hamster-adaptierten Scrapie-Stammes 263 K infiziert wurden, beobachtet, dass diese über 2 Jahre keinerlei klinische Symptome einer Erkrankung aufwiesen. Histopathologische Untersuchungen zeigten jedoch, dass bei diesen Tieren nach 310 d eine allmähliche Akkumulation von PK-resistentem Maus-PrP auftrat. Passagierte man Hirnhomogenat von Tieren 782 d nach Inokulation in andere Mäuse, so entwickelten diese nach etwa 457 d klinische Anzeichen einer Scrapie-Erkrankung und histopathologisch wurden hohe Mengen an PK-resistentem PrP gefunden (Race et al. 2001). Auch Mäuse, die mit sehr niedrigen Dosen der Maus-adaptierten Scrapie-Stämme RML und ME7 infiziert wurden, wiesen eine subklinische Prioninfektion auf. Hierbei wurde jedoch über mehrere Monate ein Wechsel zwischen der Abwesenheit klinischer Symptome und dem Auftreten von beginnenden Symptomen einer Prionerkrankung beobachtet (Thackray et al. 2002). Es ist unbekannt, wieviel Infektiosität bei einer in vitro Rekonstitution tatsächlich entstehen könnte, und wie eine hiermit erzielte Infektion im Versuchstier verlaufen würde. Bis zum Abschluss aller Infektiositätsstudien im März 2004, der nachfolgenden molekularbiologischen, bzw. histopathologischen Untersuchung oder weiteren Passagierung kann also die Möglichkeit einer subklinischen Infektion, und somit die de-novo-Generation von Infektiosität nicht ausgeschlossen werden.

5.3.1 Polysaccharide als notwendige Sekundärkomponenten der Infektiosität von Prionen?

Einem möglichen Zusammenhang zwischen Polysacchariden und der Infektiosität von Prionen wurde in der Literatur wenig Aufmerksamkeit geschenkt. Einzig Shaked et al. (2001) beschrieben Versuche mit nicht-proteinösen Komponenten von Prionen bzw. Heparansulfat. Hierbei wurden nicht-proteinöse Komponenten aus Prionen gewonnen und zusammen mit PrP^{Sc}, welches zuvor mit Dimethylsulfoxid solubilisiert wurde, rekonstituiert. Während solubilisiertes PrP allein eine Infektiosität von log 4 ID₅₀ aufwies, betrug die Infektiosität nach Rekonstitution mit den nicht-proteinösen Komponenten log 6,6 ID₅₀. Nach Verdauung der nicht-proteinösen Komponenten mit Heparanase und Rekonstitution mit solubilisiertem PrP betrug die Infektiosität dagegen log 4,7 ID₅₀. Der Zusatz von 4 mg/ml Heparansulfat zum solubilisierten PrP resultierte in einer Infektiosität von log 6,4 ID₅₀. Die Präparation der nichtproteinösen Komponenten war vergleichbar mit der Präparation des Prion-Scaffold (s. 3.2.2), allerdings wurden weder zuvor Lipide extrahiert noch lösliche von unlöslichen Bestandteilen nach der PK-Verdauung getrennt. Da die Rekonstitutionsexperimente von Shaked et al. jedoch mit infektiösem PrP^{Sc} durchgeführt wurden, können die erzielten Infektiositätszuwächse (~100 ID₅₀) im Rahmen der normalen experimentellen Schwankungsbreite liegen und sind daher wenig aussagekräftig. Vorteilhafter ist es von nicht-infektiösen Materialien auszugehen, da de novo erzeugte Infektiosität auch in geringen Titern Aussagekraft hat. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit rekombinantem PrP und Heparansulfat (s. 4.3.3 und 4.4.1) wurde bis auf die leichte Akkumulation eines 14 kDa-Abbaufragmentes bei Proteaseverdauung kein eindeutiger Hinweis auf eine spezifische oder für die Infektiosität wichtige Funktion von Heparansulfat gefunden. Bei den Infektiositätsstudien war innerhalb von 500 d aufgrund klinischer Befunde bei keinem Versuchstier Infektiosität nachweisbar. Damit konnten in Anwesenheit von Heparansulfat Titer größer als 2 ID₅₀/µg rec SHaPrP(29-231) ausgeschlossen werden. Eine subklinische Infektion der Versuchstiere ist also auch hier noch möglich.

Da eine Infektiosität des Prion-Scaffold alleine aufgrund aller bisherigen Erkenntnisse eher unwahrscheinlich ist, stellt sich im Zusammenhang mit Infektiositätsstudien die Frage, wie ein Polysaccharid mit der Infektiosität von Prionen zusammenhängen könnte. Hier wären u.a. eine Stabilisation der pathogenen PrP-Struktur durch Einfluss auf die strukturelle Energetik des Prionproteins, eine Verstärkung der proteolytischen Resistenz der Proteinkomponente durch sterische Behinderung von Proteasen oder aber eine Vermittlung spezifischer Kontakte die für die Propagation der Prionerkrankung wichtig sind, möglich. Darüber hinaus könnte die Koaggregation mit Polysacchariden zu einer lokal erhöhten Verweildauer von PrP^{Sc} führen und somit die Umfaltung von PrP^C in die pathogene Isoform PrP^{Sc} begünstigen. Dies erscheint wahrscheinlich auf Basis von Experimenten, in denen man Prionen an rostfreien Stahldraht adsorbieren ließ, und diesen lokal fixiert für 30 min in das Hirn von gesunden Mäusen einbrachte. Die hierdurch vermittelte Infektiosität war weitaus höher und effizienter als die durch Injektion einer vergleichbaren Menge Prionen (Zobeley et al. 1999; Flechsig et al. 2001). Auch die Rate, mit der injizierte Prionen vom Ort der Injektion weggewaschen bzw. durch zelluläre Proteasen abgebaut werden, die sog. "clearance rate" (Safar et al. 2000), ist ein entscheidender Faktor bei Infektionsstudien. Bei Versuchen mit Prionrods wurde beobachtet, dass innerhalb von 24 h post inokulum mehr als 99 % des injizierten PrP 27-30 durch die "clearance rate" abgebaut wurden (Safar, mündl. Mitteilung). Eine Koaggregation mit Polysacchariden könnte also durch Schutz vor Proteasen sowie eine verlängerte lokale Verweildauer die "clearance rate" senken.

Zusammenfassend erscheint es also als durchaus wahrscheinlich, dass Polysaccharide eine wichtige Rolle spielen können. In zukünftigen Experimenten müssten daher die Bedingungen, unter denen Koaggregate die zuvor beschriebenen Eigenschaften erhalten, genauer evaluiert werden.

5.3.2 Ist die Darstellung von Prionen in vitro möglich?

Die Darstellung von Prionen *in vitro* wäre ein Beweis der Prion-Hypothese. Bislang konnte jedoch noch keine Infektiosität *in vitro* dargestellt werden (vgl. 1.3.4), und auch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Rekonstitutionsversuche erbrachten bislang noch keine positiven Resultate. Die möglichen Ursachen hierfür sind zahlreich. Zunächst könnte die Prion-Hypothese falsch sein. Da jedoch die überwiegende Zahl der Argumente für diese Theorie

sprechen, erscheint dies eher unwahrscheinlich. Ferner ist der genaue Ort der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} bzw. der Priongenese bislang noch unbekannt. Diskutiert werden hier die äußere Zellmembran, caveolae-ähnliche Membrandomänen, frühe und späte Endosomen, Lysosomen und das ER (zur Übersicht s. Prusiner 1996; Caughey 2001; Harris 2001). Aufgrund dieser Unbestimmtheit könnten die für die in-vitro-Konversion gewählten Bedingungen bezüglich pH-Wert, Ionenstärke und makromolekularer Zusammensetzung des Milieus falsch sein. Auch im Falle der richtigen Bedingungen wäre dennoch nicht sichergestellt, dass während der Experimente die richtige pathogene PrP-Struktur eingestellt würde, da die Kinetik dieser Strukturumwandlung sehr viel länger dauern könnte, als es die Versuchsdauer zuließe, oder der Prozess membranabhängig sein könnte. Ferner wäre bei zu geringer Ausbeute an infektiösem PrP der Nachweis unmöglich. Insbesondere durch die zuvor diskutierte "clearance rate" (s. 5.3.1) würden geringe Mengen von Infektiosität rasch inaktiviert und nicht mehr nachweisbaren sein. Sofern sekundäre Komponenten für die Infektiosität von Prionen notwendig sein sollten, könnten diese einerseits bislang noch unbekannt sein. Andererseits wäre es möglich, dass Koaggregate von PrP und bekannten Sekundärkomponenten eine bestimmte Struktur haben müssten, die jedoch nicht ohne weiteres in vitro nachzustellen ist.

Im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten (s. 4.4) wäre es möglich, dass dem Prion-Scaffold durch die Präparation wichtige strukturelle Eigenschaften verloren gingen. Wahrscheinlicher noch ist, dass das aggregierende PrP nicht so in das Prion-Scaffold eingebaut wurde, wie es in vivo zuvor der Fall war. Die fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen der Koaggregation von rec PrP und Glykogen (s. 4.3.6.2) zeigten, dass PrP vorwiegend Glykogen innerhalb der Koaggregate einschloss. Daher könnten Experimente, die auf eine alternierende, schichtweise ("Baumkuchen-ähnliche") Aggregation abzielen, größere Erfolgsaussichten haben. Innere PrP-Schichten würden so vor proteolytischem und äussere Glykogen-Schichten durch den Einschluss der Glucosylketten in die Aggregate vor glykolytischem Abbau geschützt werden (vgl. Abb. 5.2, S. 102 und Abb. 5.4, S. 110). Dies erschiene insbesondere als wahrscheinlich, wenn das Prion-Scaffold aus einem aktiven zellulären Abwehrprozess resultierte (s. 5.1.3). In diesem Zusammenhang wäre es auch möglich, dass Versuche unter Beteiligung der Enzyme und Substrate der Glykogensynthese erfolgreicher sein könnten. Eine letzte Möglichkeit, die in der Literatur bislang nur wenig Beachtung fand, ist, dass molekulare Modifikationen von PrP oder von beteiligten Sekundärkomponenten für die Infektiosität von Prionen notwendig sein könnten. In diesem Zusammenhang wurde ein möglicher Zusammenhang von Advanced Glykation End Products (AGEs) in Prionen untersucht, der im folgenden Abschnitt diskutiert wird. Zusammenfassend ist daher festzustellen, dass Versuche zur in-vitro-Genese von Prionen mit hohen experimentellen Unsicherheiten verbunden sind und daher weitergehende Erforschungen des strukturellen Aufbaus von Prionen, der molekularen Mechanismen sowie der zellulären Lokalisation der PrP-Umwandlung wünschenswert sind.

5.4 AGEs und Prionen

AGE-Modifikationen können Unlöslichkeit, Aggregation, Proteolyseresistenz und Zytotoxizität von Proteinen bedingen (s.1.2.2). Darüber hinaus sind sie potente Quellen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die ebenfalls zytotoxische Eigenschaften haben und Konformationsänderungen und Aggregation von Proteinen induzieren können (s. 1.2.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurden erfolgreich Methoden etabliert, um Proteine *in vitro* mit AGEs zu modifizieren. In Versuchen mit BSA wurden Positivkontrollen von BSA-AGEs synthetisiert (s. 4.5.1). Die Ergebnisse dieser Versuche deuten darüber hinaus an, dass auch in Anwesenheit eines Polysaccharides wie Glykogen die Entstehung von Protein-AGEs möglich ist. Ein solcher Effekt würde sich aufgrund der beobachteten Absorptionszunahmen jedoch über Monate hinziehen. Daher wäre *in vivo* aufgrund der höheren Verfügbarkeit anderer AGEinduzierender Substanzen eine Bedeutung von Glykogen beim AGEing eher unwahrscheinlich. Vielmehr könnte es, wie bei den CA vermutet (s. 5.1.3) als Matrix dienen, um langlebige Proteinaggregate vor AGE-Modifikation abzuschirmen.

5.4.1 Ein putativer Wirkungsmechanismus von Quinacrin

Quinacrin und andere Acridin- und Phenothiazinderivate zeigen in Zellkultur Inhibierung der PrP^{Sc}-Bildung (Korth et al. 2001). Diese Substanzen werden zur Zeit als potentielle Anti-Prion-Medikamente klinisch evaluiert (May et al. 2003), der Wirkungsmechanismus in diesem Zusammenhang ist jedoch unbekannt. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu Substanzen, die AGE-Modifikationen auflösen können (AGE-Breaker), wurden Versuche durchgeführt, in denen ein möglicher Einfluss von Quinacrin auf die Bildung von AGE-Modifikationen untersucht wurde. Die Ergebnisse (s. 4.5.2) zeigen eindeutig, dass eine Funktion von Quinacrin als "AGE-Breaker" ausgeschlossen werden kann. Die Ergebnisse deuten im Gegenteil vielmehr an, dass Quinacrin eine der AGE-Reaktion mit Glucose vergleichbare Veränderung von BSA vermittelt. Auf Basis der chemischen Struktur von Quinacrin ist jedoch ein den AGE-Reaktionen (s. Abb. 1.2, S. 5) vergleichbarer Prozess eher auszuschließen. Eindeutig ist jedoch, dass eine Reaktion zwischen Quinacrin und BSA stattgefunden hat. Ob eine solche Reaktion auch mit PrP^C möglich ist, und zu welchen Produkten diese führt, müssen zukünftige Studien zeigen. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen von Korth et al. (2001) wäre es jedenfalls denkbar, dass eine Quinacrin-vermittelte Modifikation von PrP^C dazu führt, dass es nicht mehr in PrP^{Sc} umgewandelt werden kann, oder dass modifiziertes PrP^C der proteolytischen Degradation zugeführt wird, und hierdurch die PrP^{Sc}-Replikation in den ScN2a-Zellen unterbrochen wird.

Die Ergebnisse der Dot-Blot-Analysen mit spezifischen anti-AGE-Antikörpern ergaben, dass alle untersuchten PrP-Spezies Anteile von AGE-modifiziertem PrP aufwiesen (s. 4.5.3). Da rekombinante Proteine in Bakterienzellen oftmals in Form zytoplasmatischer Einschlüsse akkumulieren (zur Übersicht s. Kopito 2000), steigt die Wahrscheinlichkeit von AGEing. Die bei rec SHaPrP(90-231) und rec SHaPrP(29-231) detektierten AGEs waren daher zu erwarten. Rekombinantes PrP^C aus überexprimierenden CHO-Zellkulturen wird aufgrund des GPI-Ankers auf der Zellmembran der CHO-Zellen exprimiert (Blochberger et al. 1997). Durch den direkten Kontakt mit dem Glucose-haltigen Medium erscheint auch hier AGEing möglich und somit die detektierten AGEs bei CHO-PrP^C plausibel. Anders sieht es bei den in SHa-PrP^c detektierten AGEs aus. Hier ist eine artifizielle Induktion von AGEing unwahrscheinlich, da die Glucosekonzentration im Gehirn post-mortem rapide abnimmt (Lowry et al. 1964, Chee et al. 1983). Auch erscheint es unrealistisch, dass durch die Präparationsmethode von SHa-PrP^C (Pan *et al.* 1992) spezifisch AGE-modifizierte PrP^C-Moleküle angereichert werden. Daher sollten die bei SHaPrP^C detektierten AGEs das natürliche AGEing von PrP^C widerspiegeln. Das Vorkommen von AGEs bei nicht-infektiösen PrP-Spezies hat besondere Bedeutung für Experimente, bei denen Neurotoxizität z.B. nach Aggregation untersucht wird. AGEing führt zu Zytotoxizität von Proteinen und kann oxidativen Stress bedingen sowie verstärken (s. 1.2.2). Auf Basis der durchgeführten AGE-Analysen erscheint es als wahrscheinlich, dass Neurotoxizität, die in Verbindung mit der in-vitro-Aggregation von PrP^C oder rec PrP beobachtet wurde (Post et al. 2000; Ma et al. 2002), nicht nur auf den Aggregationszustand von PrP, sondern auch auf die damit verbundene Akkumulation von AGEs zurückzuführen ist.

Die AGE-Analysen von PrP 27-30 weisen im Vergleich zu den anderen PrP-Spezies auf einen geringeren Anteil an AGEs hin. Eine Erklärung hierfür wäre, dass AGE-Epitope von PrP 27-30 innerhalb der Aggregate gegenüber der Detektion mittels anti-AGE-Antikörpern abgeschirmt wurden. Da die Proben vor der Analyse durch Kochen in Auftragspuffer denaturiert wurden, erscheint dies eher unwahrscheinlich. Es ist daher anzunehmen, dass die detektierten Unterschiede zwischen SHa-PrP^C und PrP 27-30 auf einer unterschiedlichen biologischen Vorgeschichte beruhen. Dies würde verschieden lange Exposition von PrP^C bzw. PrP^{Se} gegenüber AGE-induzierenden Substanzen implizieren, wofür nur die Abschirmung von PrP^{Se} gegenüber AGEing durch Einbau in Prion-Aggregate in Frage käme. Da PrP^C mehr AGEs aufweist, müsste die Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Se} also relativ bald nach der Translation erfolgen. Im Zusammenhang mit der Zellbiologie von PrP (s. 1.3.3) ist also zu vermuten, dass die Umwandlung kurz nach der Golgi-Prozessierung, dem Transport an die Zelloberfläche oder eventuell in einem frühen Endosomalen Stadium stattfindet. Die in der Literatur als Umwandlungsorte diskutierten späten Endosomen oder Lysosomen, sind auf Basis der AGE-Analysen eher unwahrscheinlich. Auch eine Umwandlung von PrP^C, das mehrfach den Zyklus zwischen Zellmembran und endosomalen Kompartimenten durchlaufen hat (zur Übersicht s. Prusiner 1996; Caughey 2001; Harris 2001), ist eher auszuschließen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse aus 4.5.3, dass AGEs auch in Prionen vorkommen und eine Beteiligung an der Prionpathogenese daher nicht ausgeschlossen werden kann. Da PrP 27-30 jedoch weniger AGEs aufwies als SHa-PrP^C, erscheint eine Funktion bei der Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} eher unwahrscheinlich. Eine Beteiligung an den neurodegenerativen Prozessen der Prionkrankheiten ist dagegen möglich. Wenn, wie oben diskutiert, die Umfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc} relativ früh nach der PrP-Translation erfolgte, würde im Fall einer Prioninfektion kein oder weniger neugebildetes PrP^c an die Zelloberfläche gelangen. Die Wahrscheinlichkeit längerer Halbwertzeiten und somit AGEing bereits exprimierten PrP^cs stiege an. Da AGE-modifizierte Proteine zytotoxisch sind, oxidativen Stress sowie Carbonylstress bedingen und verstärken können, würde mit zunehmendem AGEing von PrP^C auch die Wahrscheinlichkeit beginnender Neurodegeneration steigen. In der Literatur findet sich bislang nur eine Veröffentlichung in Verbindung mit AGEs und PrP. In CJD-Hirnschnitten wurden zytoplasmatische, granuläre PrP-Strukturen in Astrozyten beschrieben, die mit einer starken Immunoreaktion für AGEs und dem Rezeptor für AGEs (RAGE s. 1.2.2) einhergingen. Von den Autoren wurde, in Analogie zur Alzheimerschen Krankheit, ein Degradationsmechanismus von AGE-modifizierten Proteinen in Astrozyten diskutiert (Sasaki et al. 2002). Durch Wechselwirkung von AGE-modifiziertem PrP^C mit Astrozyten könnte also eine RAGE-vermittelte Aktivierung von Mikrogliazellen sowie eine weitere Erhöhung des oxidativen Stresses stattfinden (vgl. 1.2.1 und 1.2.2). Da bei Prionkrankheiten nach wie vor unbekannt ist, was der ursächliche Grund der beobachteten Neurodegeneration ist (zur Übersicht s. Brown 2002, Fraser 2002, Caughey & Lansbury 2003), könnte ein solches Modell als Arbeitshypothese für zukünftige Experimente dienen.

5.4.3 AGEing kann Unlöslichkeit von rekombinantem PrP induzieren

Untersuchungen der Auswirkung von AGE-Modifikation auf die Löslichkeit von rec PrP zeigten, dass intensives AGEing lösliches PrP trotz Anwesenheit von 0,2 % SDS in unlösliches überführt kann (s. 4.5.4). Der Nachweis von Unlöslichkeit erfolgte jedoch auf Basis des Anti-CML-Antiköpers 4G9, da das *in-vitro*-AGEing von PrP scheinbar zu einer Epitopmaskierung für den anti-PrP-Antikörper 3F4 führte. In zukünftigen Experimente sollte daher zum PrP-Nachweis ein Antikörper genutzt werden, der ein PrP-Epitop bindet, welches kein Lysin oder Arginin enthält. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass das CML-Signal bei den PrP-Proben, bei denen durch Ausdünnen auf 0.01 % SDS die Aggregation induziert wurde, ein schwächeres CML-Signal aufwies als die anderen Proben. Dies könnte einerseits darauf hindeuten, dass die PrP-Proben hier reproduzierbar degradiert wurden, andererseits, dass die intensive AGE-Modifizierung bei aggregiertem PrP zu einer weitergehenden Modifizierung der CML-Addukte hin zu anderen AGEs führte. Beides erscheint eher unwahrscheinlich, da dies auch bei den anderen Proben hätte auftreten müssen. Wahrscheinlicher ist die Möglichkeit, dass die rec PrP-Aggregate durch das *in-vitro*-AGEing quervernetzt (vgl. 1.2.2) bzw. in einen höheren Aggregationszustand überführt wurden, und so trotz Aufkochens in Auftragspuffer nicht genügend denaturiert wurden, um eine ausreichende Zugänglichkeit für den 4G9-Antikörper zu bewirken. Sofern AGEing zu einer verminderten Auflösbarkeit der Aggregate führte, wäre es auch möglich, dass diese an die Gefäßwand adsorbierten und nicht oder nicht in ausreichender Menge auf den Dotblot übertragen werden konnten. Diese Erklärungen würden auch bedeuten, dass die bei 0,2 % SDS beobachtete Induktion der Unlöslichkeit von PrP durch in-vitro-AGEing zu einer anderen Form von PrP-Aggregaten führte. Aus Zeitgründen waren im Rahmen dieser Arbeit leider keine weiteren Experimente in dieser Richtung möglich. Es erscheint jedoch lohnenswert, die hier beschriebenen Phänomene ausgiebiger zu studieren. Zwar ist, wie in 5.4.3 diskutiert, eine ursächliche Beteiligung von AGEs an der Umfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc} eher unwahrscheinlich. Durch AGEing induzierte bzw. stabilisierte PrP-Aggregate (welche auch eine alternative Erklärung für die geringeren AGE-Signale von PrP 27-30 wären) könnten jedoch als Keime für die PrP^{sc}-Aggregation dienen bzw. diese induzieren. Die Bedingungen einer AGE-vermittelten keiminduzierten Aggregation von PrP sollten daher in zukünftigen Experimenten evaluiert werden. Wie bei der Glykogen-vermittelten keiminduzierten Aggregation (s. 5.2.2) ist hier eine biologische Relevanz insbesondere für die nicht-infektiösen Prionkrankheiten möglich. Somit deuten auch diese Experimente auf eine Beteiligung von AGEs an der Pathogenese von Prionen hin. Bei der Alzheimerschen Krankheit ist die Beteiligung von AGEs an den pathogenen Prozessen mittlerweile vielfältig belegt (s. 1.2.2). Ob dies im Fall der Prionkrankheiten ähnlich ist, und wie diese Beteiligung genau aussieht, werden zukünftige Experimente zeigen müssen.

5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Insbesondere die humanen Prionkrankheiten sind vorwiegend altersassoziiert. Die mit ihnen einhergehenden histopathologischen Befunde spongiformer Veränderungen, Gliosis und Ablagerungen amyloider Plaques treten häufig in Verbindung mit anderen altersassoziierten neuropathologischen Veränderungen auf (Kovács & Budka 2002). Auch Proteinaggregation, welche bei den Prionerkrankungen ein zentrales Ereignis darstellt, wird als molekularer Mechanismus der Alterung diskutiert (s. 1.2.3). Im Zusammenspiel mit ihr ist oxidativer Stress (s. 1.2.1) ebenfalls ein wichtiger Faktor molekularer Alterung, dem in der Pathogenese von Prionen eine zentrale Rolle zugesprochen wird (zur Übersicht s. Brown 2001; Kim *et al.* 2001; Milhavet & Lehmann 2002). Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darüber hinaus auf eine Beteiligung von AGEs an Prionkrankheiten hin, und auch das Phänomen des Prion-Scaffold scheint in Verbindung mit dem alterungsassoziierten Prozess der Bildung von Corpora amylacea stehen. Es existieren also auch auf molekularer Ebene enge Verbindungen

5. Diskussion

zwischen Prionkrankheiten und altersassoziierten Veränderungen. Die Forschung befindet sich mit ihrem Verständnis für das Zusammenspiel dieser Prozesse bei neurodegenerativen Krankheiten noch am Anfang, und es erscheint oftmals schwierig, ursächliche von sekundären Ereignissen zu unterscheiden. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse und aufgestellten Modelle bieten daher vertiefende Einblicke in das mögliche Zusammenspiel molekularer Prozesse, deren fortschreitende Aufklärung letzlich auch eine mögliche Darstellung von Prionen *in vitro*, wie in 5.3 diskutiert, wahrscheinlicher machen wird.

Neben den Ergebnissen dieser Arbeit deutet eine ganze Kette von Indizien darauf hin, dass im Zusammenhang mit Glykogen und seinem Metabolismus weitere Mechanismen existieren, die eng mit den Bereichen Alterung, Neurodegeneration und Proteinaggregation zusammenhängen. So wird oftmals über eine Anreicherung von Glykogen-Granulae in Astrozyten und oder Neuronen bei verschiedenen neurodegenerativen Ereignissen berichtet (zur Übersicht s. Magistretti et al. 1993). Diese wurde auch bei der AD (Mann et al. 1987) und der CJD (Manolidis & Balojannis 1983) beschrieben. Insbesondere die Astrogliose, also das Anschwellen von Astrozyten, welche ein wichtiger diagnostischer Befund für Prionkrankheiten ist, scheint durch eine Erhöhung des Glykogengehaltes in den Astrozyten verursacht zu werden (Dombro et al. 2000). Darüber hinaus nimmt die Glykogensynthasekinase 3 (GSK-3), ein wichtiges Enzym des Glykogenmetabolismus, Schlüsselpositionen in verschiedenen Signalkaskaden ein, und scheint so Neurodegeneration und sogar die maximal erreichbare Lebensspanne eines Organismus zu beeinflussen. Sowohl bei den neurodegenerativen Prozessen der AD als auch in Verbindung mit der Neurotoxizität des PrP-Peptides 106-126 wurde eine Beteiligung von GSK-3-Signalkaskaden beschrieben (zur Übersicht s. Cohen & Frame 2001; Kaytor & Orr 2002; Mattson et al. 2002a; Pérez et al. 2003). Selbst die Nahrungszufuhr eines Organismus, die eng mit dem Glucose- und Glykogenmetabolismus zusammenhängt, hat Einflüsse auf gesunde Hirnalterung und die Lebensdauer eines Organismus. So fördert kalorische Restriktion neuroprotektive und -restorative Mechanismen (zur Übersicht s. Mattson 2000; Mattson et al. 2002b). Bei der Huntingtonschen Krankheit wurde im Tiermodell sogar eine durch Kalorienreduktion verursachte Verlangsamung der Ausbreitung und verlängerte Lebensdauer beobachtet (Duan et al. 2003). Auch die Akkumulation von AGEs (s. 1.2.2) welche eng mit dem Glucosemetabolismus zusammenhängt kann durch Kalorienreduktion vermindert werden kann (Teillet et al. 2000).

Insbesondere die in dieser Arbeit aufgezeigten Möglichkeiten der AGE- oder Glykogenvermittelten keiminduzierten PrP-Aggregation deuten darauf hin, dass bei amyloiden Erkrankungen nicht-proteinöse Faktoren wichtige Rollen spielen können. Ob diese Phänomene allgemeiner Natur sind, welche weiteren Prozesse zu möglichen Keimen für die Proteinaggregation führen können, und wie diese in Zusammenhang mit der natürlichen Alterung stehen, wird in Zukunft zu etablieren sein.

6. Zusammenfassung

Prionen sind Erreger fataler neurodegenerativer Erkrankungen bei Säugern. Sie bestehen hauptsächlich aus einem wirtseigenen Protein, dem sog. Prionprotein (PrP). Dieses weist im Gegensatz zur zellulären Variante (PrP^C) eine veränderte Konformation (PrP^{sc}) auf und liegt in Form unlöslicher, proteolyseresistenter, neurotoxischer und infektiöser Aggregate vor. Um die pathogenen Eigenschaften von Prionen detaillierter verstehen zu können, ist es wichtig den Einfluss sekundärer Komponenten und direkter Umgebungsfaktoren auf die Bildung und Pathogenese von Prionen zu verstehen, insbesondere da in *in-vitro*-Experimenten bislang keine Infektiosität de novo erzeugt werden konnte. Eine solche Sekundärkomponente ist das Prion-Scaffold. Dieses inerte Polysaccharid-Gerüst macht 5-15 % von Prionrods aus und besteht hauptsächlich aus 1,4-verknüpfter Glucose mit wenigen 1,4,6-Verzweigungen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels Komponenten- und Verknüpfungsanalysen gezeigt, dass das Prion-Scaffold kein Artefakt der Prionrod-Präparation ist, sondern eine generelle Komponente von Prionen. Nach Entwicklung einer Analysemethode für den µg- bis ng-Bereich wurde die Stereochemie der glykosidischen Bindungen des Prion-Scaffold als αglykosidisch aufgeklärt. Durch Optimierung des Präparationsprotokolls wurde das Prion-Scaffold frei von Restinfektiosität präpariert, was eine Untersuchung des potentiellen Einflusses auf die Infektiosität von Prionen ermöglichte. Hierzu wurde ein in-vitro-Konversionssystem adaptiert, in welchem PrP bei mittleren Natriumdodecylsulfat- (SDS-)konzentrationen löslich vorliegt und bei niedrigen SDS-Konzentrationen aggregiert. Nach erfolgreicher Adaptation und Untersuchung des Einflusses von Polysacchariden auf die in-vitro-Konversion von PrP wurde nachweisbar die Bildung von PrP/Polysaccharid-Koaggregaten induziert. Hierbei zeigte sich ferner, dass Glykogen als Modell für das Prion-Scaffold eine keiminduzierte PrP-Aggregation vermittelte. Rekonstitutionsexperimente mit dem Prion-Scaffold und PrP erbrachten im Tiermodell bislang keinen Hinweis auf de novo erzeugte Infektiosität. In den noch bis März 2004 laufenden Studien wurden vorläufig Infektiositäten von mehr als 11-15 Id₅₀/µg PrP ausgeschlossen.

Ferner wurde das Vorkommen von Advanced Glycation Endproducts (AGEs) bei Prionen sowie deren potentieller Einfluss untersucht. AGEs sind alterungsassoziierte Modifikationen von Biomolekülen, die aus nicht-enzymatischen z.T. radikalischen Reaktionen zwischen reduzierenden Zuckern und z.B. freien Aminogruppen von Proteinen entstehen. AGEing von Proteinen führt oft zu Unlöslichkeit, proteolytischer Resistenz und Zytotoxizität. Im Rahmen der durchgeführten Analysen wurden AGEs bei allen untersuchten PrP-Präparaten gefunden. Dabei wies das infektionsassoziierte PrP 27-30 weniger AGEs auf, als PrP^C aus gesunden Hamstern. Dies lässt vermuten, dass die Umwandlung von PrP^C in PrPsc relativ früh nach der Translation erfolgt. Weitere Experimente, in denen PrP in vitro mit AGEs modifiziert wurde, zeigten AGE-vermittelte Unlöslichkeit von PrP bzw. eine Stabilisierung von PrP-Aggregaten. Dies impliziert die Möglichkeit, dass AGE-modifizierte PrP-Aggregate als Keime für die PrP-Aggregation dienen können. Im Rahmen der Diskussion wurde ein Modell zur Entstehung von Glykogen/Protein-Koaggregaten wie dem Prion-Scaffold, aber auch anderer bekannter Koaggregate wie z.B. der Corpora amylacea, vorgestellt. Ferner wurde die mögliche Beteiligung von AGEs an den neurodegenerativen Prozessen bei Prionkrankheiten erörtert, und ein mögliches Zusammenspiel verschiedener molekularer Alterungsmechanismen bei neurodegenerativen Krankheiten diskutiert.

7. Abstract

Prions are infective agents of fatal neurodegenerative diseases in mammals. They are composed primarily of a host-protein, the so-called prion protein (PrP). In comparison to its cellular isoform (PrP^c) it shows changed conformation (PrP^{sc}) and builds up insoluble as well as PK-resistant, neurotoxic and infective aggregates. To understand the pathological properties of prions in more detail, knowledge about the influence of secondary and micro-environmental components onto prion-formation and -pathogenesis is essential. This is especially important since *in-vitro* reconstitution of infectivity could not be shown by now. As secondary component an inert polysaccharide scaffold (prionscaffold) was found in prion rods (PrP 27-30) after intense PK-digestion amounting to 5-15% of PrP 27-30. It consisted of predominantly 1,4-linked glucose with few 1,4,6-branches.

Within this thesis it could be shown by component- and linkage-analysis that the prionscaffold is a general component of prions and no artefact of prionrod preparation procedure. After developing a method for μ g-ng-scale stereochemistry analysis of glycosidic linkage, the prionscaffold's linkage was shown to be α -glycosidic. By optimising the preparation protocol the prionscaffold was prepared free of remaining infectivity, thus enabling reconstitution experiments. Therefore an *in vitro* transition system, in which PrP is soluble at medium Sodiumdodecylsulfate (SDS) concentrations and aggregates at low SDS concentrations, was utilized. After determination of polysaccharidic influences onto *in-vitro*-conversion of PrP coaggregation of polysaccharides and PrP could be induced provable. Furthermore it was shown that glycogen which was used as a model substance for the prionscaffold induced seeded PrP-aggregation. Reconstitution experiments with prionscaffold and PrP gave no clinical sign of *de novo* infectivity in challenged animals by now. Since bioassays will be terminated in March 2004, infectivity titers of >10-15 ID₅₀/µg PrP could be excluded preliminary.

Furthermore the questions were addressed if advanced glycation endproducts (AGEs) are to be found in prions and what their potential influence might be. AGEs are modifications of bio molecules which are associated with ageing. They result from non-enzymatic partially radical reactions of reducing sugars for example with amino groups of proteins. AGEs can be responsible for insolubility, proteolytic resistance and cytotoxicity of proteins. All analysed PrP-preparations showed AGE-modifications. In comparison to non-infectious and cellular PrP-species PrP 27-30 had a lesser degree of AGE-content, showing that the conformational switch from PrP^C to PrP^{Sc} must take place early after PrP-translation. *In vitro* AGEing of PrP lead to insolubility of PrP resp. stabilization of PrP-aggregates, suggesting that AGE-modified PrP-aggregates could be seeds for PrP-aggregation.

A model for the formation of glycogen-protein coaggregates is introduced which could explain the origin of the prionscaffold as well as the formation of other well known co aggregates like corpora amylacea. Furthermore contributions of AGEs to the neurodegenerative processes in prion diseases as well as the interplay of different molecular mechanisms of ageing in neurodegenerative diseases are discussed.

8. Literaturverzeichnis

Adams, D. H. & Field, E. J. (1968). The infective process in scrapie. Lancet 2: 714-716.

- Adams, D. O., Johnson, W. J., Fiorito, E. & Nathan, C.F. (1981). Hydrogen peroxide and cytolytic factor can interact synergistically in effecting cytolysis of neoplastic targets. J. Immunol. 127: 1973-1977
- Agguzzi, A. & Weissman, C. (1997). Prion research: the next frontiers. Nature 389: 795-798.
- Albersheim, P., Nevins, D. J., English, P. D. & Karr, A. (1967). A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 5: 340-345.
- Alonso, M. D., Lomako, J., Lomako, W. M. & Whelan, W. J. (1995). A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* **9**: 1126-1137.
- Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A. & Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214: 764-766.
- Ames, B. N. (1989). Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat. Res.* **214**: 41-46.
- Anderton, B. H. (1997). Changes in the ageing brain in health and disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **352**: 1781-1792.
- Angyal, S. J. & James, K. (1970). Oxidation of carbohydrates with chromium trioxide in acetic acid. *Australian J. Chem.* 23: 1209-1306.
- Appel, T. R. (1999). Prionen mehr als nur Protein? Chemische Analyse von Lipiden und Kohlenhydraten in Prionstäbchen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. Aachen, Shaker, ISBN 3-8265-6030-2.
- Arai, K. Maguchi, S., Fujii, S., Ishibashi, H. Oikawa, K. & Taniguchi, N. (1987). Glykation and inactivation of human Cu, Zn-superoxide dismutase: Identification of the in vitro glycated sites. J. Biol. Chem. 262: 16969-16972.
- Baars, B. & Schaller, H. (1994). Fehlersuche in der Gaschromatographie Diagnose aus dem Chromatogramm. VCH, Weinheim, ISBN 3-527-28697-7.
- Baba, O. (1993). Production of monoclonal antibody that recognizes glycogen and its application for immunohistochemistry. *Kakubyo Gakkai Zasshi* **60**: 264-87.
- Baldwin, M. A. (2001). Mass spectrometric analysis of prion proteins. In: Caughey, B. (Ed.): *Prion Proteins. Advances in Protein Chemistry Vol 57.* Academic Press, San Diego, London (2001), ISBN 0-12-034257-X, p: 29-54.
- Bär, K. J., Franke, S., Wenda, B., Müller, S., Kientsch-Engel, R., Stein, G. & Sauer, H. (2003). Pentosidine and N^ε-(caboxymethyl)-lysine in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Neurobiol. Aging* 24: 333-338.

- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B. & Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46: 417-428.
- Baynes, J. W. (2001). The role of AGEs in aging: causation or correlation. *Exp. Gerontol.* **36**: 1527-1537.
- Belay, E. D. (1999). Transmissible spongiform encephalopathies in humans. Annu. Rec. Microbiol. 53: 283-314.
- Bellinger-Kawahara, C., Diener, T. O., McKinley, M. P., Groth, D. F., Smith, D. R. & Prusiner, S. B. (1987). Purified scrapie prions resist inactivation by procedures that hydrolyze, modify, or shear nucleic acids. *Virology* 160: 271-274.
- Berlett, B. S. & Stadtman, E. R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. J. Biol. Chem. 272: 20313-20316.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**: 235-242.
- Biermann, C. J. & McGinnis, G. D. –Editors (1989). *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*. CRC-Press, Boca Raton, ISBN 0-8493-6851-0.
- Birkmann, E. (2000). *Einfluß von Sequenzvariationen auf die Struktur und das Aggregationsverhalten rekombinanter Prion Proteine*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Björndal, H., Hellerqvist, C. G., Lindberg, B. & Svensson, S. (1970b). Gas-liquid chromatography and maß spectrometry in methylation analysis of polysaccharids. *Angew. Chem. Int Ed. Engl.* **9**: 610-619.
- Björndal, H., Lindberg, B. & Svensson, S. (1967). Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates. *Carbohydr. Res.* **5**: 433-440.
- Björndal, H., Lindberg, B., Pilotti, A. & Svensson, S. (1970a). Mass spectrometry of partially methylated alditol acetates. - II. Deuterium labelling experiments. *Carbohydr. Res.* 15: 339-349.
- Blakeney, A. B. & Stone, B. A. (1985). Methylation of carbohydrates with lithium methylsulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.* 140: 319-324.
- Blakeney, A. B., Harris, P. J., Henry, R. J. & Stone, B. A. (1983). A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.* **113**: 291-299.
- Blochberger, T. C., Cooper, C., Peretz, D., Tatzelt, J., Griffith, O. H., Baldwin, M. A. & Prusiner, S. B. (1997). Prion protein expression in Chinese hamster ovary cells using a glutamine synthetase selection and amplification system. *Prot. Eng.* **10**: 1465–1473.
- Bobin, S. A., Wisniewski, H. M., Kieras, F. J. & Iqbal, K. (1981). Morphological and chemical characterization of a starch granule-like polyglucosan deposit isolated from human brains. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **55**: 47-52.
- Bolton, D. C., McKinley, M. P. & Prusiner, S. B. (1982). Identification of a protein that purifies with the Scrapie prion. *Science* **218**: 1309-1311.

- Borchelt, D. R., Rogers, M., Stahl, N., Telling, G. & Prusiner, S. B. (1993). Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology* **3**: 319-329.
- Borchelt, D. R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N. & Prusiner, S. B. (1990).Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell. Biol.* **110**: 743-752.
- Bosque, P. J., Ryou, C., Telling, G., Peretz, D., Legname, G., DeArmone, S. J. & Prusiner, S. B. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 3812-3817.
- Brown, D. R. (2001). Microglia and prion disease. Microscopy Res. Tech. 54: 71-80.
- Brown, D. R. (2002). Mayhem of the multiple mechanisms: modelling neurodegeneration in prion disease. *J. Neurochem.* **82**: 209-215.
- Brown, D. R., Qin, K., Herm, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., & Kretzschmar, H. (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**: 684-687.
- Brown, D. R., Wong, B. S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S. J. & Jones, I. M. (1999). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. J.* **344**: 11-15.
- Brown, P. & Bradley, R. (1998). 1755 and all that: a historical primer of transmissible spongiform encephalopathy, *BMJ* **317**: 1688-1692.
- Brown, P. (1992). The phenotypic expression of different mutations in transmissible human spongiform encephalopathy. *Rev. Neurol. (Paris)* **148**: 317-327.
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. & Bostock CJ. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. Nature 389: 498-501.
- Buccioantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M. & Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* **416**: 507-511.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. & Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356: 577-582.
- Bullivant, H. M., Geddes, R. & Wills, P. R. (1983). The fine structure of glycogen. *Biochem. Int.* **6**: 497-506.
- Buszikiewicz, H. (1992). Massenspektrometrie 3. erw. Aufl.. VCH, Weinheim, ISBN 3-527-2680-7.
- Butler, D. A., Scott, M. R., Bockman, J. M., Borchelt, D. R., Taraboulos, A., Hsiao, K. K., Kingsbury, D. T. & Prusiner, S. B. (1988). Scrapie-infected murine neuroblastoma cells produce protease-resistant prion proteins. *J. Virol.* 62: 1558-1564.
- Butterfield, D. A. & Kanski, J. (2001). Brain protein oxidation in age-realted neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *Mech. Ageing Dev.* **122**: 945-962.

- Cancilla, M. T., Gaucher, S. P., Desaire, H. & Leary, J. A.(2000). Combined partial acid hydrolysis and electrospray ionization-mass spectrometry for the structural determination of oligosaccharides. *Anal. Chem.* 72: 2901-2907.
- Carpita, N. C. & Shea E. M. (1989). Linkage structure of carbohydrates by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of partially methylated alditol acetates. In: *Analysis of carbohydrates by GLC and MS*. Biermann, C. J. & McGinnis, G. D. (Eds.), CRC-Press, Boca Raton, ISBN 0-8493-6851-0, Chap. 9: 157-216.
- Castellani, R., Smith, M. A., Richey, P. L. & Perry, G. (1996). Glycoxidation and oxidative stress in Parkinson disease and diffuse Lewy body disease. *Brain. Res.* **737**: 195-200.
- Cattaneo, E., Rigamonti, D., Goffredo, D., Zuccato, C., Squitieri, F. & Slipione, S. (2001). Loss of normal huntingtin function: new developments in Huntington's disease research. *Trends Neurosci.* 24: 182-188.
- Caughey, B. & Lansbury, P. T. Jr. (2003). Protofibrils, Pores, Fibrils, and Neurodegeneration: Separating the Responsible Protein Aggregates from the Innocent Bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.* (in press).
- Caughey, B. (2001b). Prion protein interconversions. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **356**: 197-202.
- Caughey, B. (Ed.): *Prion Proteins. Advances in Protein Chemistry Vol 57.* Academic Press, San Diego, London (2001a), ISBN 0-12-034257-X
- Caughey, B., Kocisco, D. A., Raymond, G. J. & Lansbury, P. T. Jr. (1995). Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of proteinase-sensitive prion protein to the protease resistant state. *Chem. Biol.* **2**: 807-817.
- Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J. & Chesebro, B. (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. J. Virol. 63: 175-181.
- Caughey, B., Raymond, G. J. & Bessen, R. A. (1998). Strain-dependent differences in betasheet conformations of abnormal prion protein. *J. Biol. Chem.* **273**: 32230-32235.
- Caughey, B., Raymond, G. J., Kocisco, D. A. & Lansbury, P. T. Jr. (1997). Scrapie infectivity correlates with converting activity, protease resistance, and aggregation of scrapie-associated prionprotein in guanidine denaturation studies. *J. Virol.* **71**: 4107-4110.
- Cavanagh, J. B. (1999). Corpora-amylacea and the family of polyglucosan diseases. *Brain Res. Rev.* **29**: 265-295.
- Cerami, A. (1985). Hypotheses: glucose as a mediator of aging. J. Am Geriatr. Soc. 33: 626-634.
- Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced by oculation with Scrapie brain material. Lancet 1: 1378-1379.
- Chapman, J., Cervenakova, L., Petersen, R. B., Lee, H. S., Estupinan, J., Richardson, S., Vnencak-Jones, C. L., Gajdusek, D. C., Korczyn, A. D., Brown, P. & Goldfarb, L. G. (1998). APOE in non-Alzheimer amyloidoses: transmissible spongiform encephalopathies. *Neurology* **51**: 548-553.
- Chee, N. P., Geddes, R. & Wills, P. R. (1983), Metabolic heterogeneity in rabbit brain

glycogen. Biochim. Biophys. Acta 756: 9-12.

- Chen, M. & Fernandez, H. L. (2001). Where do Alzheimer's plaques and tangles come from? Aging-induced protein degradation inefficiency. *Front. Biosci.* **6**: e1-11.
- Chen, Y.-T., & Burchell, A. (1995). Glycogen storage diseases. In: *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 7th Ed.. Criver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S. & Valle, D. (Eds.), McGraw-Hill, New-York, ISBN 0-07-909826-6, Chap. 24: 935-965.
- Choi, I.-Y. & Grueter, R. (2003). In vivo ¹³C NMR assessment of brain glycogen concentration and turnover in the awake rat. *Neurochem. Int.* **43**: 317-322.
- Clarke, A. R., Jackson, G. S. & Collinge, J. (2001). The molecular biology of prion propagation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **356**: 185-195.
- Cohen, G., Rudnicki, M., Walter, F., Niwa, T. & Hörl, W. H. (2001). Glucose-modified proteins modulate essential functions and apoptosis of polymorphonuclear leukocytes. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**: 1264-1271.
- Cohen, P. & Frame, S. (2001). The renaissance of GSK3. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2: 769-776.
- Colaco C. A. & Harrington, C. R. (1994). Glycation: a pathological modification in neuropathies?: a hypothesis. *NeuroReport* **5**: 859-861.
- Collinge, J. & Rossor, M. (1996). A new variant of prion disease. Lancet 247: 916-917.
- Costello, C. E. (1997). Time, life... and mass spectrometry. New techniques to address biological questions. *Biophys. Chem.* **68**:173-88.
- Cuillé, J. & Chelle, P.-L. (1936). La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *Comptes Rendus Acad. Sci.* 203: 1552-1554.
- De Vendittis, E., Palumbo, G., Parlato, G. & Bocchini, V. (1981). A fluorimetric method for the estimation of the critical micelle concentration of surfactants. *Anal. Biochem.* **115**: 278-286.
- Dickinson, A. G. & Outram, G. W. (1988). Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found. Symp.* **135**: 63-83.
- Diener, T. O. (1972). Is the scrapie agent a viroid? Nat. New Biol. 235: 218-219.
- Diener, T. O., McKinley, M. P. & Prusiner, S.B. (1982). Viroids and prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 5220-5224.
- Dill K. A. & Chan H. S. (1997). From Levinthal to pathways to funnels. *Nature Struc. Biol.* **4**: 10-19.
- Diringer, H. (2001). Transmissible spongiform encephalopathies: the viral concept and an application. In: *Prions. A Challenge for Science, Medicine and Public Health.* Rabenau, H. F., Cinatl, J. & Doerr, H.W. (Eds.) Contrib. Microb., Karger, Basel, Vol 7: 1-6.
- Diringer, H., Beekes, M., Ozel, M., Simon, D., Queck, I., Cardone, F., Pocchiari, M. & Ironside, J. W. (1998). Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size. *Intervirol.* 40: 238-246.

Dobson, C. M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. TIBS, 24: 329-332.

- Dobson, C. M. (2001). The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **356**: 133-145.
- Dobson, C. M. (2002). Summary of the Horizon-Symposium on 'Protein folding and disease'. Nature Publishing group, online available at: http://www.nature.com/drugdisc/horizon/proteinfolding/summary.html
- Dombro, R. S. Bender, A. S. & Norenberg, M. D. (2000). Association between cell swelling and glycogen content in cultured astrocytes. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18: 161-169.
- Donne, D. G., Vlies, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Wright, P. E. & Dyson, H. J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): The N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13452-13457.
- Dormont, D. (2002). Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Lett.* **529**: 17-21.
- Duan, W., Guo, Z., Jiang, H., Ware, M., Li, X.-J. & Mattson, M. P. (2003). Dietary restriction normalizes glucose metabolism and BDNF levels, slows disease progression, and increases survival in huntingtin mutant mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 100: 2911-2916.
- Dumpitak, C. (1998). Analyse von nicht-proteinartigen Komponenten von Prionen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Dyer, D. G., Dunn, J. A., Thorpe, S. R., Bailie, K. E., Lyons, T. J., McCance, D. R. & Baynes, J. W. (1993). Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *J. Clin. Incest.* **91**: 2463-2469.
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D. & Lang, H. (1974). Proteinase K from Tritirachium album Limber. *Eur. J. Biochem.* **47**: 91-7.
- Eble, A. S., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. (1983). Nonenzymatic Glucosylation and Glucosedependent Cross-linking of Protein. J. Biol. Chem. 258: 9406-9412.
- Eigen, M. & Rigler, R. (1994). Sorting single molecules: Application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5740-5747.
- Elfrink, K. (2001). Aufreinigung und Charakterisierung von Prion-Protein aus Zellkultur und Gewebe tierischen Ursprungs. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Ellgaard, L., Molinari, M. & Helenius, A. (1999). Setting the standards: quality control in the secretory pathway. *Science* **286**: 1882-1893.
- Ellis, R. J. (2001). Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem. Sci.* 26: 597-604.
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B. & Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linkes to asparagines of the Scrapie prion protein. *Biochemistry* 28: 8380-8388.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large molecules. *Science* **246**: 64-71.

Fergusson, N. M., Ghani, A. C., Donnely, C. A., Hagenaars, T. J. & Anderson, R. M. (2002).

Estimating the human health risk from possible BSE infection of the British sheep flock. *Nature* **410**: 165-166.

- Field, E. J. (1967). The significance of astroglial hypertrophy in Scrapie, Kuru, Multiple Sclerosis and old age together with a note on the possible nature of the Scrapie agent. *Dtsch. Z. Nervenheilkunde* **192**: 265-274.
- Finkel, T. (1998). Oxygen radicals and signaling. Curr. Opin. Cell Biol. 10: 248-253.
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* **408**: 239-247.
- Flechsig, E., Hegyi, I., Enari, M., Schwarz, P., Collinge, J. & Weissmann, C. (2001). Transmission of scrapie by steel-surface-bound prions. *Mol. Med.* **7**: 679-684.
- Flores, M. L., Stortz, C. A. & Cerezo, A. S. (2000). Studies on the skeletal cell wall of the cystocarpic stage of the red seaweed *Iridaea undulosa* B.- Part II. Fractionation of the cell wall and methylation analysis of the inner core-fibrillar polysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* 27: 21-27.
- Fournier, J.-G. (2001). Nonneuronal cellular Prion protein. Int. Rev. Cytol. 208: 121-160.
- Fox, A., Morgan, S. L. & Gilbart, J. (1989). Preparation of alditol acetates and their analysis by gas chromatography (GC) and mass spectrometry (MS). In: *Analysis of carbohydrates* by GLC and MS. Biermann, C. J. & McGinnis, G. D. (Eds.), CRC-Press, Boca Raton, ISBN 0-8493-6851-0, Chap. 5: 87-118.
- Fraser, J. R. (2002). What is the basis of transmissible spongiform encephalopathy induced neurodegeneration and can it be repaired? *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 28: 1-11.
- Friedreich, N. & Kékulé, A. (1859). Zur Amyloidfrage. Virchows. Arch. pathol. Anat. 16: 50.
- Fu, M. X., Requena, J. R., Jenkins, A. J., Lyons, T. J., Baynes, J. W. & Thorpe S. R. (1996) The advanced glycation end-product *N*[€]-(Carboxymethyl) lysine, is a product of both lipid peroxidation and glyoxidation reactions. *J. Biol. Chem.* **271**: 9982-9986
- Gabizon, R., Meiner, Z., Halimi, M. & Ben-Sasson, S. A. (1993). Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. *J. Cell. Physiol.* **157**: 319-325.
- Gafni, A. (1997). Structural modifications of proteins during aging. J. Am. Geriatr. Soc. 45: 871-880.
- Gajdusek, D. C. (1977). Unconventional viruses and the origin and disappearence of kuru. *Science* **197**: 934-960.
- Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. & Alpers, M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature*, **209**: 794-796.
- Garcia-Rocha, M., Roca, A., De La Iglesia N., Baba, O., Fernandez-Novell, J. M., Ferrer, J. C. & Guinovart, J. J. (2001). Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem. J.* **357**: 17-24.
- Gasic-Milenkovic, J., Loske, C., Deuther-Conrad, W. & Münch, G. (2001). Protein "Ageing" cytotoxicity of a glycated protein increases with its degree of AGE-modification. *Z. Gerontol. Geriat.* **34**: 457-460.
- Gauczynski, S., Peyrin, J. M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J. P., Dormont, D., Lasmezas, C.I. & Weiss S. (2001). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J.* 20: 5863-5875.
- Gibbons, R. A., & Hunter, G. D. (1967). Nature of the scrapie agent. Nature 215: 1041-1043.
- Gonzalez-Iglesias, R., Pajares, M. A., Ocal, C., Espinosa, J. C., Oesch, B. & Gasset, M. (2002). Prion protein interaction with glycosaminoglycan occurs with the formation of oligomeric complexes stabilized by Cu(II) bridges. J. Mol. Biol. 319: 527-540.
- Goto, S., Takahashi, R., Kumiyama, A., Radák, Z., Hayashi, T., Takenouchi, M. & Abe, R. (2001). Implications of protein degradation in aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **928**: 54-64.
- Gottwald, W. (1995). GC für Anwender. VCH, Weinheim, ISBN 3-527-28681-0.
- Goyns, M. H. (2002). Genes, telomeres and mammalian ageing. *Mech. Ageing Dev.* **123**: 791-799
- Greenfield, N. & Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**: 4108-4116.
- Griffith, J. S. (1967). Self-replication and scrapie. Nature 215: 1043-1044.
- Hardy, J. & Gwinn-Hardy, K. (1998). Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science* 282: 1075-1079.
- Harman, D. (1956). Aging theory based on free radical and radiation chemistry. J. Gerontol.2: 298-300.
- Harman, D. (1994). Aging: Prospects for further increases in the functional life span. *Age* **17**: 119-146.
- Harman, D. (2001). Aging: Overview, Annals New York Academy Of Sciences Ann. N. Y. Acad. Sci. 928: 1-21.
- Harris, D. A. (1999). Cellular biology of Prion diseases. Clin. Microbiol. Rev. 12: 429-444.
- Harris, D. A. (2001). Biosynthesis and cellular processing of the Prion protein. *Adv. Prot. Chem.* **57**: 203-228.
- Harris, D. A., Huber, M. T., van Dijken, P., Shyng, S.-L., Chait, B.T. & Wang, R. (1993). Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry* 32: 1009-1016.
- Harris, P. J., Henry, R. J., Blakeney, A. B. & Stone, B. A. (1984). An improved procedure for the methylation analysis of oligosaccharides and polysacchrides. *Carbohydr. Res.* 127: 59-73.
- Hatters, D. M., Minton, A. P. & Howlett, G. J. (2002). Macromolecular crowding accelerates amyloid formation by human apolipoprotein C-II. J. Biol. Chem. 277: 7824-7830.
- Hellerqvist, C. G. & Sweetman, B. J. (1990). Mass spectrometry of carbohydrates. *Methods Biochem. Anal.* **34**: 92-143.
- Herms, J. W. & Kretzschmar, H. (2001). Die Funktion des zellulären Prion-Proteins PrP^c als kupferbindendes Protein an der Synapse. **In:** *Prionen und Prionkrankheiten*. Hörnlimann,

B., Riesner, D. & Kretzschmar, H. (Hrsg.), De Gruyter, Berlin, ISBN 3-11-016361-6, Kap. 7: 74-80.

- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1985). Simplified method for silverstaining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silverstaining. *Electrophoresis* **6**: 103-112.
- Hevor, T. K. (1994). Some aspects of carbohydrate metabolism in the brain. *Biochimie* **76**: 111-120.
- Hill, A. F., Antoniou, M. & Collinge, J. (1999). Protease-resistant prion protein produced *in vitro* lacks infectivity. *J. Gen. Virol.* **80**: 11-14.
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J. & Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**: 448-450.
- Hilz, H., Wiegers, U. & Adamietz, P. (1975). Stimulation of proteinase K action by denaturing agents: application to the isolation of nucleic acids and the degradation of 'masked' proteins. **Eur. J. Biochem. 56**:103-8.
- Hjelmeland, L. M. & Chrambach, A. (1984). Solubilization of functional membrane proteins. *Methods Enzymol.* **104**: 305-318.
- Hoffman, J., Lindberg, B. & Scensson, S. (1972). Determination of the anomeric configuration of sugar residues in acetylated oligo- and polysaccharides by oxidation with chromium trioxide in acetic acid. *Acta Chem. Scand.* **26**: 661-666.
- Hörnlimann, B. (2001). Historische Einführung: Prionen und Prionkrankheiten. In: Prionen und Prionkrankheiten. Hörnlimann, B., Riesner, D. & Kretzschmar, H. (Hrsg.), De Gruyter, Berlin, ISBN 3-11-016361-6, Kap. 1: 4-20.
- Hörnlimann, B., Riesner, D. & Kretzschmar, H. (Hrsg.): *Prion und Prionkrankheiten*, Berlin, De Gruyter (2001), ISBN 3-11-016361-6
- Hough, L., Jones, J. V. & Wusteman, P. (1972). On the automated analysis of neutral monosaccharides in glycoproteins and polysaccharids. *Carbohydr. Res.* **21**: 9-17.
- Hounsell, E. F., Davies, M. J. & Smith, K. D. (1996). Determination of monosaccharide linkage and substitution patterns by GC-MS methylation analysis. In: *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press, Totowa, USA. ISBN 0-89603-339-2.
- Hundt, C., Peyrin, J. M., Haik, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley, M. L., Deslys, J. P., Dormont, D., Lasmezas, C. I. & Weiss, S. (2001). Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO J.* 20: 5876-5886.
- Immel, S. & Lichtenthaler, F. W. (2000). The hydrophobic topographies of amylose and its blue iodine complex. *Starch/Stärke* 52: 1-8.
- Ishii, T., Haga, S., Yagishita, S. & Tateishi, J. (1984). The presence of complements in amyloid plaques of Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *Appl. Pathol.* **2**: 370-379.
- James, T. L., Liu, H., Ulyanov, N. B., Farr-Jones, S., Zhang, H., Donne, D. G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. (1997). Solution of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10086-10091.

- Jansen, K. (1998). Biophysikalische Analyse von Aggregationsintermediaten des Prion-Proteins. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Jansen K., Schäfer, O., Birkmann, E., Post, K., Serban, A., Prusiner, S. B. & Riesner, D. (2001). Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. *Biol. Chem.* **382**: 683-691.
- Jansen, K. (2002). Dimere und Oligomere des Prion-Proteins als Modell für den Umwandlungsmechanismus von der zellulären Isoform des Prion-Proteins in die pathogene Form. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Jay, A. (1996). The methylation reaction in carbohydrate analysis. J. Carbohydr. Chem. 15: 897-923.
- Johnson, F. B., Sinclair, D. A. and Guarente L. (1999). Molecular Biology of Aging, *Cell* **96**: 291-302.
- Kaimann, Tina (2002). Strukturänderungen von kovalent verknüpften Oligomeren des Prion-Proteins. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Kaneko, K. Peretz, D., Pan, K.-M., Blochberger, T. C., Wille, H., Gabizon, R., Griffith, O. H., Cohen, F. E., Baldwin, M. A. & Prusiner, S. B. (1995). Prion Protein (PrP) synthetic peptide induce cellular PrP to aquire properties of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11160-11164.
- Kaneko, K., Wille, H., Mehlhorn, I., Zhang, H., Ball, H., Cohen, F. E., Baldwin, M. A. & Prusiner, S. B. (1997). Molecular properties of complexes formed between the prion protein and synthetic peptides. J. Mol. Biol. 270: 574-586.
- Karasek, F. W. & Clement, R. E. (1988). *Basic gas chromatography mass spectrometry principles and techniques*. Elsevier, Amsterdam, ISBN-0-444-42761-9.
- Kascak, R. J., Rubenstein, R., Merz, P. A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R. I., Wisniewski, H. M. & Diringer, H. (1987). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to Scrapie-associated fibril protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 10069-10074.
- Kaytor, M. D. & Orr, H. T. (2002). The GSK3 beta signaling cascade and neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Neurobiol.* **12**: 275-278.
- Kellings, K. (1995). Analysis of residual nucleic acids in Scrapie prions with differing degrees of aggregation. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Aachen, Shaker, ISBN 3-8065-0589-1
- Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S. B. & Riesner, D. (1992). Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. J. Gen. Virol. 73: 1025-1029.
- Kikuchi, S., Shinpo, K., Takeuchi, M., Yamagishi, S., Makita, Z., Sasaki, N. & Tashiro, K. (2003). Glycation a sweet tempter for neuronal death. *Brain Res. Rev.* **41**: 306-323.
- Kim, J., Choi, S., Kim, N., Jin, J., Choi, E., Carp, R. I. & Kim Y. (2001). Oxidative stress and neurodegeneration in prion disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci. USA* **928**: 182-186.
- Kimura, T., Takamatsu, J., Miyata, T., Miyakawa, T. & Horiuchi, S. (1998). Localization of identified advanced glycation end-product structures N^{ε} -(carboxymethyl)lysine and pentosidine, in age-related inclusions in human brains. *Pathol. Int.* **48**: 575-579.

- Kimura, T., Takmatsu, J., Ikeda, K., Kondo, A., Miyakawa, T. & Horiuchi, S. (1996). Accumulation of advanced glycation end products of the maillard reaction with age in human hippocampal neurons, *Neurosci. Lett.* **208**: 53-56.
- Kinjo, A. R. & Takada, S. (2002a). Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation studied by density functional theory: Statics. *Phys. Rev.* 66(031911): 1-9.
- Kinjo, A. R. & Takada, S. (2002b). Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation studied by density functional theory: Dynamics. *Phys. Rev.* 66(051902): 1-10.
- Klein, M. A., Kaeser, P. S., Schwarz, P., Weyd, H., Xenarios, I., Zinkernagel, R. M., Carroll, M. C., Verbeek, J. S., Botto, M., Walport, M. J., Molina, H., Kalinke, U., Acha-Orbea, H. & Aguzzi, A. (2001). Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nature Med.* 7: 488-492.
- Klein, T. R., Kirsch, D., Kaufmann, R. & Riesner, D. (1998). Prion rods contain small amounts of two host spingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectromety. *Biol. Chem.* **379**: 655-666.
- Knight, R. & Collins, S. (2001). Human Prion dieseases: cause, clinical and diagnostic aspects. In: Prions. A Challenge for Science, Medicine and Public Health. Rabenau, H. F., Cinatl, J. & Doerr, H.W. (Eds.) Contrib. Microb., Karger, Basel, Vol 7: 68-92.
- Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T. & Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease resistant prion protein. *Nature* 370: 471-474.
- Kopito, R. R. (2000). Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. Trends in Cell Biology 10: 524-530.
- Korth, C., May, B. C., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (2001). Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9836-9841.
- Kovacs, G. G., Budka H. (2002). Aging, the brain and human prion disease. *Exp. Gerontol.* **37**: 603-605.
- Kubik, S., Höller, O., Steiner, A., Tolksdorf, M., van der Leek, Y. & Wulff, G. (1996). Molecular inclusion within polymeric carbohydrate matrices. In: *Carbohydrates as organic raw materials III.* van Bekkum, H., Röper, H. & Vorangen, F. (Eds.), CRF, The Hague ISBN 3-527-30081-3 (Spec. Ed.), Chap. 10: 169-187. Alternativ: Wiley-VCH, Weinheim, ISBN 3-527-30079-1 (Stand. Ed.).
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lasmezas, C. I., Deslys, J.-P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J. & Hauw, J. J. (1996). BSE transmission to macaques. *Nature* **381**: 743-744.
- Ledesma, M. D., Bonay, P., Colaco, C. & Avila, J. (1994). Analysis of microtubuleassociated protein tau glycation in paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* 269: 21614-21619.

- Ledesma, M. D., Perez, M., Colaco, C. & Avila, J. (1998). Tau glycation is involved in aggregation of the protein but not in the formation of filaments. *Cell Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* **44**: 1111-1116.
- Ledl, F. & Schleicher, E. (1990). Die Maillard-Raktion in Lebensmitteln und im menschlichen Körper neue Ergebnisse zu Chemie, Biochemie und Medizin. *Angew. Chem.* **102**: 597-626.
- Leffers, K.-W. (1999). Denaturierung, Renaturierung und Infektiosität von solubilisierten Prion-Proteinen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Lehmann, S., Milhavet, O. & Mangé, A. (1999). Trafficking of the cellular isoform of the prion protein. *Biomed & Pharmacother* **53**: 39-46.
- Lehmann, W. D. (1996). *Massenspektrometrie in der Biochemie*. Spektrum, Heidelberg, ISBN: 3-860-25094-9.
- Leibnitz, E. & Struppe, H. G. (1984). *Handbuch der Gaschromatographie 3. Aufl.*. Geest & Portig, Leibnitz.
- Leopoldt, J.G.: Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Landwirthschaft. Fünf Theile. – Mit Kupfer und Baurissen. Berlin, Christian Friedrich Günthern (1759): 348.
- Li, J. J., Surini, M. Catsica., S., Kawashima, E. & Bouras, C. (1995). Age-Dependent Accumulation of Advanced Glycosylation End Products in Human Neurons. *Neurobiol. Aging* **16**: 69-76.
- Li, J., Zhang, S. & Wang, C. (2001). Effects of macromolecular crowding on the refolding of glucose- 6-phosphate dehydrogenase and protein disulfide isomerase. J. Biol. Chem. 276: 34396-34401.
- Lindberg, B. & Lönngren, J. (1978). Methylation analysis of complex carbohydrates: General procedure and application for sequence analysis. *Methods Enzymol.* **50**: 3-32.
- Lindberg, B. (1972). Methylation analysis of polysaccharides. *Methods Emzymol.* 28: 178-195.
- Liu, H., Farr-Jones, S., Ulyanov, N. B., Llinas, M., Marqusee, S., Groth, D., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & James, T. L. (1999). Solution of Syrian Hamster Prion protein rPrP(90-231). *Biochemistry* 38: 5362-5377.
- Loske, C., Neumann, A., Cunningham, A. M., Nichol, K., Schinzel, R., Riederer, P. & Münch, G. (1998). Cytotoxicity of adcanced glycation endproducts is mediated by oxidative stress. J. Neural Transm. 105: 1005-1015.
- Lowry, O., Passoneau, J., Hasselberger, F., Schultz, D. (1964). Effect of ischemia on known substrates and co-factors of the glycolytic pathway of the brain. *J. Biol. Chem.* **239**: 18-30.
- Ma, J., Wollmann, R. & Lindquist, S. (2002). Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. *Science* 298: 1781-1785.
- Mabbott, N. A., Bruce, M. E., Botto, M., Walport, M. J. & Pepys, M. B. (2001). Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nature Med.* 7: 485-487.

- Madec, J. Y., Vanire, A., Dorier, A., Bernillon, J., Belli, P. & Baron, T. (1997). Biochemical properties of protease resistant prion proteinPrPsc in natural sheep scrapie. *Arch. Virol.* 142: 1603-1612.
- Magistretti, P. J., Sorg, O. & Martin, J.-L. (1993). Regulation of glycogen metabolism in astrocytes: Physiological, pharmacological, and pathological aspects. In: Astrocytes – pharmacology and function. Murphy, S. (Ed.), Academic Press, San Diego, ISBN 0-12-511370-6, Chap. 11: 243-265.
- Mahfoud, R., Garmy, N., Maresca, M., Yahi, N., Puigserver, A. & Fantini J. (2002). Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins. *J. Biol. Chem.* **277**: 11292-11296.
- Maillard, L. C. (1912). Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoides par voie méthodique. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **154**: 66-68.
- Mann, D. M., Sumpter, P. Q., Davies, C. A. & Yates, P. O. (1987). Glycogen accumulations in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **73**: 181-184.
- Manolidis, L. S. & Balojannis, S. J. (1983). Ultrastructural alterations of the vestibular nuclei in Jacob-Creutzfeld disease. *Acta Otolaryngol.* **95**: 508-521.
- Manson, J. C., Clarke, A. R., Hooper, M. L., Aitchison, L., McConnell, I. & Hope, J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* 8: 121-127.
- Manuelidis, L. (1997). Decontamination of Creutzfeldt-Jakob disease and other transmissible agents. J. Neurovirol. 3: 62-5.
- Martins, V. R., Linden, R., Prado, M. A., Walz, R., Sakamoto, A. C., Izquierdo, I. & Brentani, R. R. (2002). Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett.* **512**: 25-28.
- Mattson, M. P. (2000). Neuroprotective signalling and the aging brain: take away my food and let me run. *Brain Res.* **886**: 47-53.
- Mattson, M. P., Duan W. & Maswood, N. (2002a). How does the brain control lifespan? *Ageing Res. Rev.* 1: 155-165.
- Mattson, M. P., Duan, W., Chan, S. L., Cheng, A., Haughey, N., Gary, D. S., Guo, Z., Lee, J. & Furukawa, K. (2002b). Neuroprotective and neurorestorative signal transduction mechanisms in brain aging: modification by genes, diet and behavior. *Neurobiol. Aging* 23: 695-705.
- May, B. C., Fafarman, A. T., Hong, S. B., Rogers, M., Deady, L. W., Prusiner, S. B & Cohen, F. E. (2003). Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bisacridines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 3416-21.
- McBride, P. A., Wilson, M. I., Eikelenboom, P., Tunstall, A. & Bruce, M. E. (1998). Heparan sulfate proteoglycan is associated with amyloid plaques and neuroanatomically targeted PrP pathology throughout the incubation period of scrapie-infected mice. *Exp. Neurol.* **149**: 447-454.
- McGeer, P. L. & McGeer, E. G. (1995). The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer an other neurodegenerative diseases. *Brain Res. Rev.* **21**: 195-218.

- McKinley, M. P., Braunfeld, M.B., Bellinger, C. G. & Prusiner, S. B. (1986). Molecular characteristics of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains. J. Infect. Dis. 154: 110-120.
- McKinley, M. P., Meyer, R. K., Kenaga, L., Rahbar, F., Cotter, R., Serban, A. & Prusiner, S. B. (1991). Scrapie prior rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. J. Virol. 65: 1340-1351.
- Mehlhorn, I., Groth, D., Stockel, J., Moffat, B., Reilly, D., Yansura, D., Willet, W. S., Baldwin, M., Fletterick, R., Cohen, F. E., Vandlen, R., Henner, D. & Prusiner, S. B. (1996). High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry* 35: 5528-5537.
- Mellinghoff, A. C., Reininger, A. J., Wuerth, J. P., Founds, H. W., Landgraf, R. & Hepp, K. D. (1997). Formation of plasma advanced glycosylation end products (AGEs) has no influence on plasma viscosity. *Diabet. Med.* 14:832-836.
- Meng, C. K., Mann, M. & Fenn J. B. (1988). Of protons or proteins a beam's beam. *Zeitschrift Fur Physik D* 10: 361-368.
- Merlini, G., Bellotti, V., Andreola, A., Palladini, G., Obici, L., Casarini, S. & Perfetti, V. (2001). Protein Aggregation. *Clin. Chem. Lab. Med.* **39**: 1065-1075.
- Meyer, N., Rosenbaum, V., Schmidt, B., Gilles, K., Mirenda, C., Groth, D., Prusiner, S. B. & Riesner, D. (1991). Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. J. Gen. Virol. 72: 37-49.
- Milhavet, O. & Lehmann, S. (2002). Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform ecephalopathies. *Brain Res. Rev.* **38**: 328-339.
- Minton, A. P. (2000). Implications of macromolecular crowding for protein assembly. *Curr. Op. Struct. Biol.* **10**: 34-39.
- Minton, A. P. (2001). The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. J. Biol. Chem. 276: 10577-10580.
- Mischnick, P. (1995a). Analytische Charakterisierung von Polysacchariden und Polysaccharidderivaten mittels chemische, enzymatischer und massenspektrometrischer Methoden. Habilitationsschrift, Universität Hamburg.
- Mischnick, P. (1995b). Structural analysis of polysaccharides and polysaccharide derivatives. *Macromol. Symp.* **99**: 3-13.
- Miura, T., Hori-i, A., Mototani, H. & Takeuchi, H. (1999). Raman spectroscopic study on the copper (II) binding of prion octapeptide and its pH dependence. *Biochemistry* 38: 11560-11569.
- Mohazzeb, S. (1988). Amylose, Amylopektin, Glykogen, β-Cyclodextrine Molekulargewichte, Iodbeladung, Computergestützte Strukturaufzeichnungen. Dissertation, Universität Hamburg.
- Monnier V. M. (1989). Toward a Maillard reaction theory of aging. *Prog. Clin. Biol. Res.* **304**: 1-22.
- Monnier, V. M. & Cerami, A. (1981). Nonenzymatic browning in vivo: possible process for

aging of long-lived proteins. Science 211: 491-493.

- Monnier, V. M. (1990). Nonenzymatic Glycosylation, the Maillard Reaction and the Aging Process. J. Gerontol. 45: B105-111
- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J. L., Lehmann, S., Launay, J. M. & Kellermann, O. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science* 289: 1925-1928.
- Mullarkey, C. J., Edelstein, D. & Brownlee, M. (1990). Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**: 932-939.
- Münch, G., Deuther-Conrad, W. & Gasic-Milenkovic, J. (2002a). Glycoxidative stress creates a vicious cycle of neurodegeneration in Alzheimer's disease--a target for neuroprotective treatment strategies? *J. Neural. Transm.* **Suppl. (62)**: 303-307.
- Münch, G., Shepherd, C. E., McCann, H., Brooks, W. S., Kwok, J. B., Arendt, T., Hallupp, M., Schofield, P. R., Martins, R. N. & Halliday, G. M. (2002b). Intraneuronal advanced glycation endproducts in presenilin-1 Alzheimer's disease. *NeuroReport* 13: 601-604.
- Murray, H. W., Juangbhanich, C. W., Nathan, C. F. & Cohn, Z. A. (1979). Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. II. The role of oxygen intermediates. *J. Exp. Med.* **150**: 950-964.
- Nakamura, S., Ono, F., Hamano, M., Odagiri, K., Kubo, M., Komatsuzaki, K., Terao, K., Shinagawa, M., Takahashi, K. & Yoshikawa, Y. (2000). Immunohistochemical detection of apolipoprotein E within prion-associated lesions in squirrel monkey brains. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **100**: 365-370.
- Narang, H. (2002). A critical review of the nature of the spongiform encephalopathy agent: protein theory versus virus theory. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **227**: 4-19.
- Nemoto, S., Takeda, K., Yu, Z. Y., Ferrans, V. J. & Finkel, T. (2000). A role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol. Cell. Biol.* 20: 7311-7318.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagashi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H.-P., Giardino, I. & Brownlee, M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 797-790.
- Niwa, T. & Tsukushi, S. (2001). 3-deoxyglucosone and AGEs in uremic complications: inactivation of glutathione peroxidase by 3-deoxyglucosone. *Kidney. Int.* **Suppl. 78**: S37-41.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E., Prusiner, S. B. & Weissmann, C. (1985). A Cellular Gene Encodes Scrapie PrP 27-30 Protein. *Cell* 40: 735-746.
- Olshansky, S. J., Carnes, B. A. & Cassel, C. (1990). In Search of Methuselah: Estimating the Upper Limits to Human Longevity. *Science* **250**: 643-640.
- Onodera, T., Ikeda, T., Muramatsu, Y. & Shinagawa, M. (1993). Isolation of Scrapie agent from placenta of sheep with natural Scrapie in Japan. *Microbiol. Immunol.* **37**: 311-316.

- Orgel, L. E. (1963). The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **49**: 517-521.
- Orgel, L. E. (1970). The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing: a correction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 67: 1476.
- Palmer, M. S. & Collinge, J. (1993). Mutations and polymophisms in the Prion protein gene. *Hum. Mutat.* **2**: 168-173.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. and et al. (1993). Conversion of alphahelices into betasheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 10962–10966.
- Pan, K. M., Stahl, N. & Prusiner, S. B. (1992). Purification and properties of the cellular Prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Sci.* 1: 1343-1352.
- Pan, T., Wong, B. S., Liu, T., Li, R., Petersen, R. B. & Sy, M. S. (2002). Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. *Biochem. J.* 368: 81-90.
- Parente, J. P., Cardon, P., Leroy, Y., Montreuil, J., Fournet, B. & Ricart, G. (1985). A convenient method for methylation of glycoprotein glycans in small amounts by using lithium methylsulfinyl carbanion. *Carbohydr. Res.* 141: 41-47.
- Pattison, I. H. & Jones, K. M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. Vet. Rec. 80: 2-9.
- Pattison, I. H. & Millson, G. C. (1961). Experimental transmission of Scrapie to goats an sheep by the oral route. *J. Comp. Pathol.* **71**: 171-176.
- Pattison, I. H., Hoare, M. N., Jebbet, J. N. & Watson, W. A. (1972). Spread of Scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from Scrapie-affected sheep. *Vet. Rec.* **90**: 465-468.
- Pérez, M., Rojo, A. I., Wandosell, F., Diaz-Nido, J. & Avila, J. (2003). Prion peptide induces neuronal cell death through a pathway involving glycogen synthase kinase 3. *Biochem. J.* 372: 129-136.
- Pérez, S. & Kouwijzer, M. (1999). Shapes and interactions of polysaccharide chains. In: *Carbohydrates – Structures, syntheses and dynamics*. Finch, P. (Ed.), Kluwer, Dordrecht, ISBN 0-7514-0235-4, Chap. 7: 258-293.
- Pfannemüller, B. (1985). Stärke. In: Polysaccharide Eigenschaften und Nutzung Eine Einführung. Burchard, W. (Hrsg.), Springer, Berlin, ISBN 3-540-13931-1, 25-42.
- Phillips, N., Bridgeman, J. & Ferguson-Smith, M. (2000). The nature and cause of BSE. In: *The BSE Inquiry, Vol. 2 Science*, Chap. 3: 69-126. Stationary Office, London. http://www.bseinquiry.gov.uk/
- Post, K. (1998). Induktion und Charakterisierung verschiedener Aggregationszustände von natürlichem und rekombinantem Prion-Protein. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Post, K., Brown, D. R., Groschup, M., Kretzschmar, H. A. & Riesner, D. (2000). Neurotoxicity but not infectivity of prion protein can be induced reversibly in vitro. *Arch. Virol.* Suppl. 16: 265-273.

- Post, K., Pitschke, M., Schäfer, O., Wille, H., Appel, T. R., Kirsch, D., Mehlhorn, I. Serban, H., Prusiner, S. B. & Riesner, D. (1998). Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. *Biol. Chem.* **379**: 1307-1317.
- Preiss, J. & Walsh, D. A. (1981). The comparative biochemistry of glycogen and starch. In: *Biology of carbohydrates, Vol. 1.* Ginsburg, V. & Robbins, P. (Eds.), Wiley, New York, ISBN 0-471-03905-5, Chap. 5: 199-314.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144.
- Prusiner, S. B. (1991). Molecular biology of prion diseases. Science 252: 1515-1522.
- Prusiner, S. B. (1996). Prions. In: Fields of Virology, 3rd Edition. Fields, B. N., Knipe, Howley, P.M., Chanock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B. & Straus, S. E. Philadelphia, Lippincott-Raven, ISBN 0-78-170284-4, Chap. 92: 2901-2950.
- Prusiner, S. B. (1997). Prion diseases and the BSE crisis. Science 278: 245-251.
- Prusiner, S. B. (Ed.): *Prion Biology and Disease. Monograph 38*, New York, Cold Spring Harbor (1999), ISBN 0-87969-547-1
- Prusiner, S. B., Cochran, S. P., Groth, D. F., Downey, D. E., Bowman, K. A., & Martinez, H. M. (1982). Measurement of the Scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann. Neurol.* 11: 353-358.
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Cochran, S. P., Masiarz, F. R., McKinley, M. P. & Martinez, H. M. (1980). Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry* 19: 4883-4891.
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., McKinley, M.P., Cochran, S. P., Bowman, K. A. & Kasper, K. C. (1981a). Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 4606-4610.
- Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F. & Glenner, G. G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35: 349-358.
- Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Groth, D. F., Bowman, K. A., Mock, N. I., Cochran, S. P. & Masiarz, F. R. (1981b). Scrapie agent contains a hydrophobic protein *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6675-6679.
- Prusiner, S. B., Peters, P., Kaneko, K., Tarabulous, A., Lingappa, V., Cohen, F. E. & DeArmond, S. J. (1999a). Cell Biology of Prions. In: *Prion Biology and Disease. Monograph 38*, Prusiner, S. B. (Ed.). New York, Cold Spring Harbor, ISBN 0-87969-547-1, Chap. 9: 349-391.
- Prusiner, S. B., Tremblay, P., Safar, J., Torchia, M. & DeArmond, S. J. (1999b). Bioassays of prions. In: *Prion Biology and Disease. Monograph 38*, Prusiner, S. B. (Ed.). New York, Cold Spring Harbor, ISBN 0-87969-547-1, Chap. 3: 113-145.
- Qian, M., Liu, M. & Eaton, J. W. (1998). Transition metals bind to glycated proteins forming redox active "glycochelates": implications for the pathogenesis of certain diabetic complications. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 250: 385-389
- Race, R., Raines, A., Raymond, C. J., Caughey, B. & Chesebro, B. (2001). Long-term

subclinical carrier state precedes scrapie replication and adaption in a resistant species: Analogies to bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease in humans. *J. Virol.* **75**: 10106-10112.

- Rauvala, H., Finne, J., Krusius, T., Karkkainen, J. & Jarnefelt, J. (1981). Methylation techniques in the structural analysis of glycoproteins and glycolipids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 38: 389-415.
- Reaume, A. G., Elliott, J. L., Hoffman, E. K., Kowall, N. W., Ferrante, R. J., Siwek, D. F., Wilcox, H. M., Flood, D. G., Beal, M. F., Brown, R. H. Jr., Scott, R. W. & Snider, W. D. (1996). Motor neurons in Cu/Zn superoxid dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nature Genet.* 13: 43-47.
- Reddy, G. P., Chang, C. C. & Bush, C. A. (1993). Determination by heteronuclear NMR spectroscopy of the complete structure of the cell wall polysaccharide of Streptococcus sanguis strain K103. *Anal. Chem.* 65: 913-921.
- Reynolds, J. A. & Tanford, C. (1970). Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. – Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66: 1002-1007
- Richter, C., Park, J. W. and Ames, B. N. (1988). Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6465-6468.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. & Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* **382**: 180-182.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., Wüthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* **413**: 282-288.
- Riesner, D. (2001a). Die verschiedenen Erreger-Hypothesen. In: Prionen und Prionkrankheiten. Hörnlimann, B., Riesner, D. & Kretzschmar, H. (Hrsg.), De Gruyter, Berlin, ISBN 3-11-016361-6, Kap. 4: 53-60.
- Riesner, D. (2001b). The Prion theory: Background and basic information. In: Prions. A Challenge for Science, Medicine and Public Health. Rabenau, H. F., Cinatl, J. & Doerr, H.W. (Eds.) Contrib. Microb., Karger, Basel, Vol 7: 7-20.
- Riesner, D. (2001c). Die Scrapie-Isoform des Prion-Proteins PrP^{Sc} im Vergleich zur zellulären Isoform PrP^C. In: *Prionen und Prionkrankheiten*. Hörnlimann, B., Riesner, D. & Kretzschmar, H. (Hrsg.), De Gruyter, Berlin, ISBN 3-11-016361-6, Kap. 8: 81-91.
- Riesner, D., Kellings, K. Post, K., Wille, H., Serban, H. Groth, D., Baldwin, M. B. & Prusiner, S. B. (1996). Disruption of prion rods generate 10-nm sperical particles having high α-helical content and lacking scrapie infectivity. J. Virol. **70**: 1714-1722.
- Roach, P.J. (2000). Biosynthesis of glycogen. In: Carbohydrates in chemistry and biology, Part II – Biology of saccharides. Ernst, B., Hart, G. W. & Sinaÿ, P (Eds.), Wiley-VCH, Weinheim, ISBN 3-527-29511-9, Vol. 3, Chap. 20: 349-361.
- Robins, S. P. & Bailey, A. J. (1972). Age-related changes in collagen: the identification of reducible lysine-carbohydrate condensation products. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 48: 76-84.

- Rudd, P. M., Endo, T., Colominas, C., Groth, D., Wheeler, S. F., Harvey, D. J., Wormald, M. R., Serban, H., Prusiner, S. B., Kobata, A. & Dwek, R. A. (1999). Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13044-13049.
- Rudd, P. M., Merry, A. H., Wormald, M. R. & Dwek, R. A. (2002). Glycosylation and prion protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**: 578-586.
- Rudd, P. M., Wormald, M. R., Wing, D. R., Prusiner, S. B. & Dwek, R. A. (2001). Prion Glycoprotein: Structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry* **40**: 3759-3766.
- Ryazanov, A. G. & Nefsky, B. S. (2002). Protein turnover plays a key role in aging. *Mech. Ageing Dev.* **123**: 207-213.
- Sadqi, M., Hernandez, F, Pan, U., Perez, M., Schaeberle, M. D., Avila, J. & Munoz, V. (2002). α-Helix structure in Alzheimer's disease aggregates of tau protein. *Biochemistry* **41**: 7150-7155.
- Saeger, W. & Röcken, C. (1998). Amyloid: Mikroskopischer Nachweis, Klassifikation und klinischer Bezug. *Der Pathologe* **5**: 345-354.
- Safar, J. G., Cohen, F. & Prusiner, S. B. (2001). Die Konformation des Prion-Proteins codiert für quantitative Charakteristika von Prionstämmen. In: *Prionen und Prionkrankheiten*. Hörnlimann, B., Riesner, D. & Kretzschmar, H. (Hrsg.), De Gruyter, Berlin, ISBN 3-11-016361-6, Kap. 12: 132-138.
- Safar, J., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (2000). Quantitative traits of prion strains are enciphered in the conformation of the prion protein. *Arch. Virol.* Suppl. (16): 227-235.
- Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J., Jr. (1993). Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J. Biol. Chem.* **268**: 20276–20284.
- Safar, J., Wang, W., Pdgett, M. P., Piccardo, P., Zopf, D., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J. Jr. (1990). Molecular mass, biochemical composition, and physicochemical behavior of the infectious form of the scrapie precursor protein monomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6373-6377.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1998). Eight prionstrains habe PrPSc molecules with different conformations. *Nature Med.* 4: 1157-1165.
- Sakai, M., Austin, J., Witmer, F. & Trueb, L. (1969). Studies of corpora amylacea I. Isolation and preliminary characterization by chemical and histochemical techniques. *Arch. Neurol.* **21**: 526-544.
- Sambrook, J. Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sasaki, N., Takeuchi, M., Chowei, H., Kikuchi, S., Hayashi, Y., Nakano, N., Ikeda, H., Yamagishi, S., Kitamoto, T., Saito, T., & Makita, Z. (2002). Advanced Glycation end products (AGE) and their receptor (RAGE) in the brain of patients with Creutzfeldt-Jakob disease with prion plaques. *Neurosci. Let.* 326: 117-120.
- Saxena, A. K., Saxena, P., Wu, X., Obrenovich, M., Weiss, M. F. & Monnier, V. M. (1999).

Protein Aging by carboxymethylation of Lysines generates sites for divalent metal and redox active Copper binding: Relevance to diseases of glycoxidative stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**: 332-338.

- Schäfer, O. (1997). Biophysikalische Analyse verschiedener Aggregatzustände von rekombinantem Prion-Protein. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Schäfer, O. (2002). Nachweis von Prionen als Prionprotein-Aggregate im Hirngewebe TSEerkrankter Tiere mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Schätzl, H. M. (2001). Die Phylogenetik des PrP. In: Prionen und Prionkrankheiten. Hörnlimann, B., Riesner, D. & Kretzschmar, H. (Hrsg.), De Gruyter, Berlin, ISBN 3-11-016361-6, Kap. 4: 53-60.
- Schell, J. (2001). Einfluss von Faltungshilfen auf die in-vitro-Konversion von natürlichem und rekombinantem Prion-Protein aus prokaryotischen und eukaryotischen Zellkulturen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. (2000). The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands. *Biochim. Biophys. Acta* **1498**: 99-111.
- Schmitt, C., Sanchez, C., Desobry-Banon, S. & Hardy, J. (1998). Structure and technofunctional properties of protein-polysaccharide complexes: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 38: 689-753.
- Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M. A., Ball, H. L., Bradon, N., Bosque, P. J., Crossin, K. L., Edelman, G. M., DeArmond, S. J., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (2001). Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J. Mol. Biol.* **314**: 1209-1225.
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J. Norbury, C. C., Yewdell, J. W. & Bennink, J.R. (2000). Rapid degeneration of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404: 770-774.
- Schumacher, U., Kretzschmar, H. A. & Tateishi, J. (1991). Carbohydrate histochemistry of amyloid plaques in Gerstmann-Straussler syndrome. *Eur. J. Basic. Appl. Histochem.* 35: 331-340.
- Scott, M. R., Groth, D., Tatzelt, J., Torchia, M., Tremblay, P., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1997). Propagation of Prion strains through specific conformers of the Prion protein. *J. Virol.* 71: 9032-9044.
- Scott, M. R., Will, R., Ironside, J. Nguyen, H. O., Tremblay, P., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1999a). Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 15137-15142.
- Scott, M., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1999b). Transgenic investigations of the species barrier and Prion strains. In: *Prion Biology and Disease. Monograph 38*, Prusiner, S. B. (Ed.). New York, Cold Spring Harbor, ISBN 0-87969-547-1, Chap. 8: 307-347.
- Serban, D., Taraboulos, A., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1990). Rapid detection of Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prion proteins. *Neurology* **40**: 110-7.

- Shaked, G. M., Fridlander, G., Meiner, Z., Taraboulus, A. & Gabizon, R. (1999). Proteaseresistant and detergent insoluble prion protein is not necessarily associated with prion infectivity. J. Biol. Chem. 274: 17981-17986.
- Shaked, G. M., Meiner, Z., Avraham, I., Taraboulos, A. & Gabizon, R. (2001). Reconstitution of Prion infectivity from solubilized protease-resistant PrP and nonprotein components of Prion rods. J. Biol. Chem. 276: 14324-14328.
- Shuvaev, V. V., Laffont, I., Serot, J. M., Fujii, J., Taniguchi, N. & Siest, G. (2001). Increased protein glycation in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 22: 397-402.
- Shyng, S. L., Huber, M. T. & Harris, D. A. (1993). A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. J. Biol. Chem. 268: 15922-15928.
- Shyng, S.-L., Lehmann, S., Moulder, K. L. & Harris, D. A. (1995). Sulfated glycans stimulate endocytosis of the cellular isoform of the Prion protein PrP^C in cultured cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 30221-30229.
- Sigurdsson, B. (1954) Rida, A Chronic Encephalitis of Sheep, Brit. Vet. J. 110: 341-354
- Sigurdsson, E. M., Wisniewski, T. & Frangione, B. (2002). Infectivity of amyloid diseases. *Trends Mol. Med.* **8**: 411-413.
- Singh, R., Barden, A., Mori, T. & Beilin, L. (2001). Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44: 129-146.
- Singhrao, S. K., Morgan, B. P., Neal, J. W. & Newman, G. R. (1995). A functional role for copora Amylacea based on evidence from complement studies. *Neurodegeneration* 4: 335-345.
- Skoog, D. A. & Leary, J. J. (1996). Instrumentelle Analytik Grundlagen, Geräte, Anwendungen. Springer, Heidelberg, ISBN 3-540-60450-2.
- Smith, E. E., Taylor, P. M. & Whelan, W. J. (1968). Enzymic processes in glycogen metabolism. In: *Carbohydrate metabolism and its disorders*. Dickens, F., Randle, P. J. & Whelan, W. J. (Eds.), Academic press, San Diego, London, Library of Congress Catalog Card-#: 68-17670, Chap. 4: 89-138.
- Smith, M. A., Richey, P. L., Taneda, S., Kutty, R. K., Syre, L. M., Monnier, V. M. & Perry, G. (1994). Advanced Maillard reaction end products, free radicals and protein oxidation in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **738**: 447-454.
- Snow, A. D., Kisilevsky, R., Willmer, J., Prusiner, S. B. & DeArmond, S. J. (1989). Sulfated glycosaminoglycans in amyloid plaques of prion diseases. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 77: 337-342.
- Soto, C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nature Rev. Neurosci.* **4**: 49-60.
- Squier, T. C. (2001). Oxidative stress and protein aggregation during biological aging. *Exp. Gerontol.* **36**: 1539-1550.
- Stadtman, E. R. (2001). Protein Oxidation in Aging and Age-Related Diseases. Ann. N. Y. Acad. Sci. 928: 22-38.

- Stahl, N., Baldwin, M. A., Hecker, R., Pan, K.-M., Burlingame, A. L. & Prusiner, S. B. (1992). Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular Prion protein contain sialic acid. *Biochem.* 31: 5043-5053.
- Stahl, N., Baldwin, M. A., Teplow, D. B., Hood, L., Gibson, B. W., Burlingame, A. L. & Prusiner, S. B. (1993). Structural analysis of the scrapie prion protein using mass spectromety and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32: 1991-2002.
- Sugiyama, H., Hainfellner, J. A., Lassmann, H., Indravasu, S. & Budka, H. (1993). Uncommon types of polyglucosan bodies in the human brain: distribution and relation to disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 86: 484-490.
- Tagliavini, F., Prelli, F., Porro, M., Salmona, M., Bugiani, O. & Frangione, B. (1992). A soluble form of prion protein in human cerebrospinal fluid: implications for prion-related encephalopathies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 1398-1404.
- Takahadshi, M., Fujii, J., Teshima, T., Suzuki, K. Shiba, T. & Taniguchi N. (1994). Glycation and inactivation of rat aldehyde reductase, a major 3-deoxyglucosone reducing enzyme.
 In: *Maillard-reactions in chemistry, food and health*. Labuza, T. P., Reineccius, G. A., Monnier, V. M., O'-Brien, Baynes, J. W. (Eds.), The Royal Society of Chemistry, pp. 427.
- Tanzer, M. L., Fairweather, R. & Gallopm P. M. (1972). Collagen cross-links. Isolation of reduced N^e-hexosylhydroxylysine from borohydride-reduced calf skin insoluble collagen. *Arch. Biochem. Biophys.* 151: 137-141.
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avraham(i), D., Laszlo, L. & Prusiner, S. B. (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. J. Cell Biol. 129: 121-132.
- Taylor, J. P., Hardy, J. & Fischbeck, K. H. (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296: 1991-1995.
- Teillet, L., Verbeke, P., Gouraud, S., Bakala, H., Borot-Laloi, C., Heudes, D., Bruneval, P. & Corman, B. (2000). Food restriction prevents advanced glycation end product accumulation and retards kidney aging in lean rats. J. Am. Soc. Nephrol. 11: 1488-1497.
- Telling, G. C., Scott, M., Hsiao, K. K., Foster, D. Yang, S.-L., Torchia, M., Sidle, K. C., Collinge, J., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1994). Transmission of Creutzfeld-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion-protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9936-9940.
- Thackray, A. M., Klein, M. A., Aguzzi, A. & Bujdoso, R. (2002). Chronic subclinical prion disease induced by low-dose inoculum. *J. Virol.* **76**: 2510-2517.
- 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.
- Thornalley, P. J., Yurek-George, A. & Argirov, O. K. (2000). Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the α-oxoadehydes glyoxal, methylglyoxal and 3-Deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem. Pharmacol.* **60**: 55-65.
- Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M.-Y (2001). Brain degeneration linked to "fatal attractions" of proteins in Alzheimer's disease and related disorders. *J. Alzheimer's Dis.* **3**: 117-119.

- Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M.-Y. (1999). Transgenic models of Tauopathies and Synucleinopathies. *Brain Pathol.* **9**: 733-739.
- Turk, E., Teplow, D. B., Hood, L. E. & Prusiner, S. B. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur. J. Biochem.* **176**: 21-30.
- Turner, G. C. & Varshavsky, A. (2000). Detecting and measuring cotranslational protein degradation in vivo. *Science* 289: 2117-2120.
- Ulrich, P. & Cerami, A. (2001). Protein Glycation, Diabetes, and Aging. *Recent Prog. Horm. Res.* **56**: 1-21
- Uversky, V. N., Cooper, E. M., Bower, K. S., Li, J. & Fink, A. L. (2001). Accelerated asynuclein fibrillation in crowded milieu. *FEBS Let.* **515**: 99-103.
- van den Berg, B., Ellis, R. J. & Dobson, C. M. (1999). Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.* **18**: 6927-6933.
- Vasan, S., Zhang, X., Zhang, X., Kapurniotu, A., Bernhagen, J., Teichberg, S., Basgen, J., Wagle, D., Shih, D., Terlecky, I., Bucala, R., Cerami, A., Egan, J. & Ulrich, P. (1996). An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. *Nature* 382: 275-278.
- Virchow, R. (1854). Über eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaktion der Cellulose. Virchows Arch. pathol. Anat. 6: 135-138.
- Vitek, M. P., Bhattacharya, K. Glendening, J. M., Stopa, E., Vlassara, H., Bucala, R. Manogue, K. & Cerami, A. (1994). Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer diesease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 4766-4770.
- Völcker, M., Schnetz, A. & Grub, R. (1996). Mikroskopgestützte Fluoreszenz-Photonen-Korrelation. Technisches Messen 63(4): 128-135.
- von Zglinicki, T. (2000). The role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **908**: 99-110.
- Waeghe, T. J., Darvill, A. G., McNeil, M. & Albersheim, P. (1983). Determination, by methylation analysis of the glycosyl-linkage compositions of microgram quantities of complex carbohydrates. *Carbohydr. Res.* 123: 281-304.
- Waggoner, D. J., Drisaldi, B., Bartnikas, T. B., Casareno, R. L., Prohaska, J. R., Gitlin, J. D. & Harris, D. A. (2000). Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression levels. *J. Biol. Chem.* 275: 7455-7458.
- Warner, R. G., Hundt, C., Weiss, S. & Turnbull, J. E. (2002). Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* **277**: 18421-18430.
- Weinmann, N. (2001). Präparation und Charakterisierung des in Prionen gefundenen Polysaccharidgerüstes. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
- Weiss, J. & Winkenbach, M., (2002). Der Brockhaus Naturwissenschaft und Technik, Band: 1 A bis Gd. ISBN 3-7653-1061-1, Gesamtwerk ISBN 3-7653-1060-3

- Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M. & Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121: 419-420.
- Westwood, M. E. & Thornalley, J. (1995). Molecular characteristics of methylglyoxalmodified bovine and human serum Albumins. Comparison with Glucose-derived Advanced Glycation Endproduct-modified serum albumins. *J. Prot. Chem.* **14**: 359-372.
- Whilesmith, J. W. & Wells, G. A. (1991): Bovine spongiform encephalopathy. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 172: 21-38.
- White, C. A. & Kennedy, J. F. (1979). Manual and automated spectrophotometric techniques for the detection and assay of carbohydrates and related meolecules. In: *Techniques in life sciences, Biochemistry – Vol. B3, Techniques in carbohydrates metabolism*, Elsevier, North-Holland, B312: 1-64.
- Wickner, S., Maurizi, M. R. & Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286**: 1888-1893.
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A. Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. & Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeld-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347: 921-925.
- Wille, H. Michelitsch, M. D., Guénebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A. & Prusiner, S. B. (2002). Structural studies of the Scrapie Prion protein by electron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 3563-3568.
- Wille, H., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. (2000). Scrapie infectivity is independent of amyloid staining properties of the N-terminally truncated prion protein. J. Struc. Biol. 130: 323-338.
- Wilson, D. R., Anderson, R. D. & Smith, W. (1950). Studies in scrapie. J. Comp. Pathol. 60: 267-282.
- Winkelhofer, K. F. & Tatzelt, J. (2000). Cationic lipopolyamines induce degradation of PrP^{sc} in Scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Biol. Chem.* 381: 463-469.
- Wiseman, H. & Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progession to cancer. *Biochem. J.* **313**: 17-29.
- Wisniewski, T. & Frangione, B. (1996). Molecular biology of brain aging and neurodegenerative disorders. *Acta Neurobiol. Exp.* **56**: 267-279.
- Wisniewski, T., Aucouturier, P., Soto, C. & Frangione, B. (1998). The prionoses and other conformational disorders. *Amyloid* **5**: 212-224.
- Wolfrom, M. L., & Thompson, A. (1957). Degradation of glycogen to isomaltotriose and nigerose. J. Am. Chem. Soc. 79: 4212-4215.
- Wong, B. S., Pan, T., Liu, T., Li, R., Gambetti, P. & Sy, M. S. (2000). Differential contribution of superoxid dismutase activity by prion protein in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273: 136-139.
- Wong, C., Xiong, L.W., Horiuchi, M., Raymond, L., Wehrly, K. Chesebro, B. & Caughey, B. (2001). Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP^{sc}-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *EMBO J.* **20**: 377-386.

- Wyss-Coray, T. & Muckle, L. (2002). Inflammation in neurodegenerative disease a doubleedged sword. *Neuron* **35**: 419-432.
- Yalpani, M. (1988). Polysaccharides Syntheses, modifications and structure/property relations. Studies in organic chemistry, Vol. 36, Elsevier, Amsterdam, ISBN 0-444-43022-9.
- York, W. S., Darvill, A. G., McNeil, M., Stevenson, T. T. & Albersheim, P. (1985). Isolations and characterization of plant cell walls and cell wall components. *Methods Enzymol.* 118: 3-40.
- Zanata, S. M., Lopes, M. H., Mercadante, A. F., Hajj, G. N., Chiarini, L. B., Nomizo, R., Freitas, A. R., Cabral, A. L., Lee, K. S., Juliano, M. A., de Oliveira, E., Jachieri, S. G., Burlingame, A., Huang, L., Linden, R., Brentani, R.R. & Martins, V. R. (2002). Stressinducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. *EMBO J.* 21: 3307-3316.
- Zerovnik, E. (2002). Amyloid-fibril formation Proposed mechanisms and relevance to conformational disease. *Eur. J. Biochem.* **269**: 3362-3371.
- Zobeley, E., Flechsig, E., Cozzio, A., Enari, M. & Weissmann, C. (1999). Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface. *Mol. Med.* **5**: 240-243.

9. Chemikalienverzeichnis

9.1 Verwendete Gase

Ammoniak 3.8 Argon 5.0 Helium 5.0 Methan 5.5 Stickstoff 5.0

9.2 Verwendete Chemikalien

Acetanhydrid Acrylamid Alexa Fluor[®] 488 Alexa Fluor[®] 633 Amberlite MB3 (Ionenaustauscher) Ammoniummolybdat ANS (1-Anilinonaphthalen-8-sulfonsäure) APS (Ammoniumperoxodisulfat) Bromphenolblau BuLi (Buthyllithium) Cäsiumchlorid CDP-Star® Chemilumineszenzkit β-Cyclodextrin Dichlormethan¹⁾ Dinatriumhydrogenphosphat 2,2-DMP (2,2-Dimethoxypropan)¹⁾ DMSO (Dimethylsulfoxid) ECL Chemilumineszenzkit ECL Plus Chemilumineszenzkit **EDTA** Eisessig Essigsäure EtOH (Ethanol)¹⁾ Formaldehyd Galactose Glucose Glycerin Glycin Glyoxal Guanidiniumhydrochlorid Guanidiniumthiocyanat H₂SO₄ (Schwefelsäure 95 – 97 %) HCl (Salzsäure 37%)

Messer-Griesheim, Krefeld, D Messer-Griesheim, Krefeld, D Messer-Griesheim, Krefeld, D Messer-Griesheim, Krefeld, D Messer-Griesheim, Krefeld, D

Fluka, Buchs, CH Boehringer Ingelheim, Heidelberg, D Molecular Probes, Eugene, USA Molecular Probes, Eugene, USA ICN, Aurora, USA Agar Scientific, Stansted, UK Sigma-Aldrich, Steinheim, D Merck, Darmstadt, D Janssen, Beerse, B Sigma-Aldrich, Steinheim, D Acros, New Jersey, USA Applied Biosystems, Foster City, USA Fluka, Buchs, CH Merck, Darmstadt, D Fluka, Buchs, CH Merck, Darmstadt, D Fluka, Buchs, CH Amersham-Pharmacia, Freiburg, D Amersham-Pharmacia, Freiburg, D Merck, Darmstadt, D Baker, Deventer, NL Merck, Darmstadt, D Merck, Darmstadt, D Riedel-de Haën, Seelze, D Fluka, Buchs, CH Fluka, Buchs, CH ICN, Aurora, USA Roth, Karlsruhe, D Sigma-Aldrich, Steinheim, D Fluka, Buchs, D Merck, Darmstadt, D Fluka, Buchs, CH Bernd Kraft, Duisburg, D

Kaliumchlorid Kaliumdihydrogenphosphat Kaliumhexacyanoferrat Mannose MeOH (Methanol)¹⁾ 2-Mercaptoethanol Methylenblau Methylglyoxal 1-Methylimidazol Methyliodid α-Methyl-D-Glucopyranosid Micro BCATM Protein Assay Reagent Kit Milchpulver Frema-Reform myo-Inositol N,N'-Methylenbisacrylamid Natriumacetat Natriumbordeuterid Natriumborhydrid Natriumcarbonat Natriumchlorid Natriumdihydrogenphosphat Natriumhydroxid Natriumthiosulfat (Na₂S₂O₃) n-Butanol NH₄OH (Ammoniumhydroxid) PMSF (4-Amidinophenylmethansulfonylfluorid) Rotiblock 10x Blockierungsreagenz SDS (Natriumdodecylsulfat) Silbernitrat Stärke TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyletylendiamin) TFA (Trifluoressigsäure) Tris Tween 20 Wasser Ultrapur

Baker, Deventer, NL Merck, Darmstadt, D Merck, Darmstadt, D Fluka, Buchs, CH Merck, Darmstadt, D Roth, Karlsruhe, D Merck, Darmstadt, D Sigma-Aldrich, Steinheim, D Sigma, St. Louis, USA Merck, Darmstadt, D Sigma-Aldrich, Steinheim, D Pierce, Rockford, USA DE-VAU-GE, Lüneburg, D Merck, Darmstadt, D Boehringer Ingelheim, Heidelberg, D Acros, New Jersey, USA Fluka, Buchs, CH Baker, Deventer, NL Riedel-de Haën, Seelze, D Merck, Darmstadt, D Fluka, Buchs, CH Merck, Darmstadt, D Baker, Deventer, NL Fluka, Buchs, CH Sigma-Aldrich, Steinheim, D Boehringer Ingelheim, Heidelberg, D Roth, Karlsruhe, D Boehringer Ingelheim, Heidelberg, D Merck, Darmstadt, D Merck, Darmstadt, D Merck, Darmstadt, D Merck, Darmstadt, D Sigma, St. Louis, USA Boehringer Ingelheim, Heidelberg, D Merck, Darmstadt, D

Die mit ¹⁾ gekennzeichneten Chemikalien wurden vor Benutzung über Vigreux-Kolonnen zweifach destilliert.