

**Zellextraktfreie Amplifikation
der pathologischen Konformation
des Prionproteins**

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Nicole Weinmann

aus Aurich (Ostfriesland)

Düsseldorf

2006

Aus dem Institut für Physikalische Biologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. D. Riesner

Koreferent: Prof. Dr. G. Groth

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2006

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abkürzungsverzeichnis	IV
1	Einleitung	1
1.1	Proteinfehlfaltungskrankheiten	1
1.2	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien	1
1.2.1	Scrapie	2
1.2.2	Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	3
1.2.3	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)	3
1.3	Natur des TSE-Erregers	3
1.4	Das zelluläre Prionprotein	4
1.5	Biochemische und physikalische Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}	6
1.6	Hypothesen zur Prion-Replikation	7
1.7	<i>In vitro</i>-Konversion	9
1.8	Diagnose von Prionkrankheiten	10
1.9	Amplifikation fehlgefaltener Proteine	11
1.10	Fragestellung	14
2	Material und Methoden	17
2.1	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	17
2.2	Verwendete Antikörper	18
2.3	Verwendete Farbstoffe	18
2.4	Verwendete Prionproteine	18
2.4.1	Rekombinante Prionproteine	18
2.4.2	CHO-PrP ^C	19
2.4.3	Infektiöse Prionproteine	19
2.5	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen	21
2.5.1	Fluoreszenzmarkierung von rekombinanten Prionproteinen	21
2.5.2	Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern	21

2.6	Proteinkonzentrationsbestimmung (Micro BCA-Test)	21
2.7	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
2.8	Semi-Dry-Blot	24
2.9	Dot Blot	24
2.10	Immunologischer Proteinnachweis	24
2.11	Proteolyse mittels Proteinase K	25
2.12	Löslichkeitsbestimmung durch differentielle Zentrifugation	25
2.13	Circular Dichroismus- (CD-) Spektroskopie	25
2.14	Elektronenmikroskopie	27
2.14.1	Präparatherstellung für das TEM	27
2.14.2	Negativ-Kontrastierung des Präparates	27
2.15	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	28
2.15.1	Prinzip der FCS-Messungen	28
2.15.2	Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (FIDA)	29
2.15.3	FIDA-Scanning	30
2.15.4	Zweifarbenanalysen	31
2.15.5	Durchführung der FCS-Messungen	31
2.15.6	Auswertung der FCS-Daten	31
2.16	ThioflavinT-Test	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Induktion der Aggregation von PrP durch spezifische Keime	36
3.1.1	Keiminduzierte Aggregation mit synthetischen Keimen als Modellsystem	36
3.1.2	Keiminduzierte Aggregation mit natürlichen Keimen	40
3.1.2.1	Ergebnisse mit PrP (27-30) als Keim	41
3.1.2.2	Ergebnisse mit PrP ^{Sc} als Keim	43
3.2	Bildung von Fibrillen statt unspezifischer Aggregate	50
3.2.1	Veränderung der Löslichkeit von rek PrP (90-231) durch NaCl-Zugabe	51
3.2.2	Einfluss spezifischer Keime auf die Kinetik der Fibrillogenese von rek PrP	52
3.2.3	Analyse des Aggregatzustandes und der Sekundärstruktur keiminduzierter Fibrillen	57
3.2.4	Untersuchung der Ultrastruktur der in Anwesenheit von PrP ^{Sc} gebildeten rek PrP-Aggregate	58
3.2.5	Induktion der Fibrillenbildung bei CHO-PrP ^C	61
3.2.6	Einfluss der Monomerkonzentration auf die keiminduzierte Fibrillenbildung	62

3.2.7	Einfluss der Keimkonzentration auf die keiminduzierte Fibrillenbildung	64
3.2.8	Einfluss von Ultraschallbehandlung auf die keiminduzierte Fibrillenbildung	65
4	Diskussion	69
4.1	Etablierung eines <i>in vitro</i>-Systems zur keiminduzierten Aggregation	70
4.1.1	Verschiedene Prionproteine als Nukleationskeim	70
4.1.2	Optimierung der Lösungsmittelbedingungen	72
4.2	Induktion von Fibrillenbildung	74
4.3	Verschiedene Parameter beeinflussen die keiminduzierte Fibrillenbildung	79
4.3.1	Einfluss der Monomerkonzentration	79
4.3.2	Einfluss der Keimkonzentration	81
4.3.3	Einfluss von Ultraschall	83
4.3.4	Verwendung von CHO-PrP ^C als Anlagerungssubstrat	85
4.4	Sensitivität im Vergleich zu anderen Methoden zum Nachweis von PrP^{Sc}	86
4.5	Ausblick	88
5	Zusammenfassung	91
6	Literaturverzeichnis	93

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
CD	Circular Dichroismus
CHO	chinesische Hamster Ovarien
CHO-PrP ^C	in CHO-Zellen exprimierte zelluläre Form des Prionproteins
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
EM	Elektronenmikroskopie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FIDA	Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse eindimensional (1D) & zweidimensional (2D)
GPI-Anker	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker
HÄ	Hirnäquivalent
HH	Hirnhomogenat
NaAc	Natriumacetatpuffer
NaPi	Natriumphosphatpuffer
NaPTA	Phosphorwolframat
PBS	Phosphatpuffer
PK	Proteinase K
PMCA	protein misfolding cyclic amplification
PrP	Prionprotein
PrP ^C	zelluläre Form des Prionproteins
PrP ^{Sc}	krankheitsassoziierte Form des Prionproteins (Sc = Scrapie)
PrP (27-30)	Proteinase K-resistentes Fragment der krankheitsassoziierten Form des Prionproteins
PrP ^{0/0} -Mäuse	PrP- <i>knock-out</i> -Mäuse
rek PrP (x-y)	in <i>E. coli</i> exprimierte Form des Prion-Proteins der Sequenz von Aminosäure x bis Aminosäure y
res PrP	Proteinase K-resistentes Fragment der krankheitsassoziierten Form des Prion-Proteins
RFU	relative fluorescence units

SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
senPrP	Proteinase K-sensitive Form der krankheitsassoziierten Form des Prion-Proteins
SHa	syrischer Goldhamster
TBST	Tris Buffered Sodium Tween
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
ThT	Thioflavin T
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
vCJD	Neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

1 Einleitung

1.1 Proteinefehlfaltungskrankheiten

Zu den Proteinefehlfaltungskrankheiten gehört auch eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, die durch Proteinefehlfaltung und der Ablagerung der fehlgefalteten Proteine im Gehirn verursacht werden. Das Auftreten dieser Proteinablagerungen im Gehirn, die in vielen Fällen auch als Amyloide bezeichnet werden, geht mit einem irreversiblen Verlust an Neuronen einher und führt zu schwerwiegenden Funktionsstörungen. Zu dieser Gruppe der neurodegenerativen Krankheiten zählen u.a. die Alzheimer Krankheit, Parkinson, Chorea Huntington und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD). Der Begriff Amyloid wurde in diesem Zusammenhang von Virchow geprägt, da er die Ablagerungen auf Grund ihrer Färbbarkeit mit Iod und Schwefelsäure für kohlenhydrathaltige Substanzen hielt (Virchow, 1854). Später wurde jedoch der proteinöse Charakter dieser Ablagerungen bewiesen (Friedreich & Kékulé, 1859). Heute wird der Begriff Amyloid zur Beschreibung von Proteinaggregaten verwendet, die elektronenmikroskopisch eine fibrilläre unverzweigte Ultrastruktur aufweisen (Cohen, 1967). Diese fibrillären Strukturen binden spezifisch Farbstoffe wie Kongorot und ThioflavinT (ThT). Die Kongorotbindung führt zu einer charakteristischen grün-roten Doppelbrechung im polarisierten Licht (Puchtler *et al.*, 1962). Ferner lassen sich amyloide Aggregate dadurch charakterisieren, dass die beteiligten Proteine unabhängig von ihrer nativen Konformation, in den Aggregaten eine β -faltblattreiche Struktur besitzen (Glenner, 1980).

1.2 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) nehmen innerhalb der Gruppe der neurodegenerativen Krankheiten eine Sonderstellung ein, da sie in drei Ätiologien auftreten. Sie können sowohl spontan als auch genetisch oder infektiös bedingt sein. Unabhängig von ihrer ursprünglichen Ätiologie sind sie dann aber in jedem Fall übertragbar. Die TSE werden heute auch nach ihren Erregern, den so genannten Prionen (s. Kap. 1.3), als Prionkrankheiten bezeichnet. Sie kommen sowohl beim Menschen als auch beim Tier vor (s. Tab. 1.1). Die bekanntesten TSE sind die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind, Scrapie beim Schaf, sowie die

Tab. 1.1: Die wichtigsten Formen der TSE

Krankheit	Manifestation	Wirt
Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)	sporadisch, genetisch, infektiös	Mensch
Neue Variante der CJD (vCJD)	infektiös	Mensch
Gerstmann-Sträussler- Scheinker-Syndrom (GSS)	genetisch, sporadisch	Mensch
Kuru	infektiös	Mensch
Fatale Familiäre Insomnie (FFS)	genetisch	Mensch
Scrapie (Traberkrankheit)	sporadisch, infektiös	Schaf, Ziege
Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	infektiös	Rind
Chronic Wasting Disease (CWD)	infektiös	Hirscharten, Rentier
Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE)	infektiös	Katze
Transmissible Mink Enzephalopathie (TME)	infektiös	Nerz

verschiedenen Formen der CJD beim Menschen (s. Kap. 1.2.3). Charakteristisch für alle TSE ist eine lange Inkubationszeit von mehreren Jahren. Nach dieser Phase führt die fortschreitende Degeneration der Neuronen zu Symptomen wie Demenz, Verlust der Koordinationsfähigkeit und schließlich zum Tod. Histopathologisch werden Prionkrankheiten durch spongiforme Veränderungen der grauen Hirnsubstanz, sowie einem vermehrten Wachstum an Astrozyten und Gliazellen charakterisiert. Neben diesen Veränderungen treten zudem extrazelluläre Proteinablagerungen auf, von denen etwa 90% amorphe Aggregate und 10% amyloide Strukturen darstellen (Jeffrey *et al.*, 1997).

1.2.1 Scrapie

Scrapie oder die Traberkrankheit bei Schafen ist seit 1732 in der Literatur bekannt und stellt damit die am frühesten beschriebene TSE dar. Bereits 1898 wurden erstmals pathologische Veränderungen im Hirn erkrankter Schafe beschrieben (Cassirer, 1898). 1936 gelang der experimentelle Beweis, dass Scrapie eine Infektionskrankheit und damit übertragbar ist (Cuille & Chelle, 1936). Durch die speziesübergreifende Übertragung von Scrapie auf die Maus (Chandler, 1961) und den Syrischen Goldhamster (Marsh & Kimberlin, 1975) und den damit verkürzten Inkubationszeiten auf einige Monate, wurde Scrapie in Maus und Hamster zum Modellsystem zur Erforschung von Prionkrankheiten.

1.2.2 Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)

Die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) ist von besonderer ökonomischer Bedeutung. Mit ihrem vermehrten Auftreten Mitte der 80er Jahre in Großbritannien erwachte das öffentliche Interesse an den Prionkrankheiten. Als Infektionsquelle von BSE gilt die Verfütterung von nicht ausreichend dekontaminierten Schlachtabfällen in Form von Tiermehl an Rinder (Wilesmith & Wells, 1991). Es wird angenommen, dass dadurch die Artenbarriere zwischen Schaf und Rind überwunden werden konnte. Mit dem Verbot der Verfütterung von Tiermehl an Wiederkäuer im Jahre 1988 ging die Anzahl der BSE-Fälle in Großbritannien bis heute kontinuierlich zurück. Im Zusammenhang mit BSE wird das Auftreten einer neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) gesehen, an der 1995 der erste Mensch verstarb (s. Kap. 1.2.3). Man geht davon aus, dass diese Variante durch den Verzehr von infizierten Rinderprodukten auf den Menschen übertragen wurde. Mit Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass 1 g Hirngewebe von an BSE erkrankten Kühen, oral an Kälber verabreicht, ausreicht, um ein Tier zu infizieren (Anderson *et al.*, 1996).

1.2.3 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)

CJD ist die beim Menschen am häufigsten auftretende Prionkrankheit. Zu 85-90 % der Fälle ist sie sporadischen Ursprungs (sCJD). Nur bei 10 % der Fälle ist sie genetisch bedingt und wird als familiäre CJD (fCJD) bezeichnet. Die seltenen iatrogenen Fälle (iCJD) sind auf Infektionen z.B. durch die Verwendung von kontaminiertem Operationsbesteck oder die Behandlung von Patienten mit kontaminierten humanen Wachstumshormonpräparaten zurückzuführen. Hauptsächlich tritt die sCJD bei Erwachsenen mit einem durchschnittlichen Alter von 65 Jahren auf (Roos *et al.*, 1973). Von der bereits erwähnten neuen Variante CJD (vCJD) sind mit einem Durchschnittsalter von 28 Jahren deutlich jüngere Menschen betroffen (Will *et al.*, 1996). Des Weiteren treten hier, gegenüber der sCJD, die Symptome früher auf und der klinische Verlauf ist verlangsamt (Ironsides, 1998). Das Auftreten der vCJD insbesondere in Großbritannien war ein erster Hinweis dafür, dass der Verzehr von mit BSE kontaminierten Nahrungsmitteln die Ursache für die vCJD sein könnte. Vergleichende Untersuchungen ergaben, dass sich die Erreger von BSE und vCJD mehr ähneln als die von vCJD und sCJD (Collinge *et al.*, 1996). Zudem weisen Makaken, die mit BSE infiziert wurden, ähnliche Läsionsmuster im Hirn auf, wie Patienten, die an vCJD erkrankt waren (Lasmézas *et al.*, 1996).

1.3 Natur des TSE-Erregers

S. B. Prusiner formulierte 1982 die These, dass der Erreger der TSE ein Protein sein müsse und prägte den Begriff **Prion** als Abkürzung für „**Proteinaceous infectious**

particle“ (Prusiner *et al.*, 1982). Die Annahme, dass ein Protein allein als infektiöses, replizierendes Agens dienen soll, sprach gegen das zentrale Dogma der Molekularbiologie, dass der Fluss genetischer Information immer von der Nukleinsäure zum Protein verläuft (Crick, 1970). Nach jahrelangen kontroversen Diskussionen gilt die Prionhypothese heute als erwiesen und allgemein anerkannt. Als Hauptbestandteil des Erregers konnte das **Prionprotein (PrP)** isoliert werden (Prusiner *et al.*, 1982a), welches durch ein wirtseigenes Gen codiert wird und in Säugern hochkonserviert ist (Oesch *et al.*, 1985). Es ist genau das Protein, das die Hauptkomponente von TSE-spezifischen Amyloiden bildet. Das Prionprotein tritt folglich in zwei Isoformen auf: der zellulären Form PrP^C (C für cellular) im nicht-infizierten Organismus und in der pathologischen Form PrP^{Sc} (Sc für Scrapie) als Hauptbestandteil des Erregers. Bei gleicher Aminosäuresequenz unterscheiden sich diese beiden Isoformen in ihrer Struktur sowie in ihren biochemischen und physikalischen Eigenschaften (s. Kap. 1.5). Ferner konnte gezeigt werden, dass Prionpräparationen keine Nukleinsäure mit codierender Funktion bzw. mit mehr als 25 Nukleotiden enthalten (Kellings *et al.*, 1992; Safar *et al.*, 2005). Weitere Indizien für die Richtigkeit der Prionhypothese lieferten Experimente mit transgenen Mäusen. So sind PrP-knock-out-Mäuse (PrP^{0/0}) nicht mit Scrapie infizierbar und können die Krankheit auch nicht weitergeben (Bueller *et al.*, 1993). Dies bedeutet, dass sich der Erreger ohne endogenes PrP^C nicht replizieren kann. Erst 2004, also während der vorliegenden Arbeit, gelang es erstmalig, nicht infektiöses PrP *in vitro* in eine infektiöse Form zu überführen (Legname *et al.*, 2004; vgl. Kap.4.2). Diese Ergebnisse sind als der letztendliche Beweis der „protein-only“-Hypothese (*zur Übersicht* s. Dumpitak & Riesner, 2005).

1.4 Das zelluläre Prionprotein

PrP^C ist über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) auf der Oberfläche von Zellen lokalisiert. Es findet sich sowohl auf neuronalen Zellen, als auch in Herz- und Skelettmuskelzellen und in geringen Mengen in den Zellen der meisten anderen Organe mit Ausnahme von Leber und Pankreas (Weissmann, 1994). In den größten Mengen jedoch kommt PrP^C im Gehirn vor (Kretzschmar *et al.*, 1986).

Das primäre Translationsprodukt des PrP-Gens (Prpn) enthält zwei Signalsequenzen (s. Abb. 1.1). Die 22 Aminosäuren (AS) lange N-terminale Sequenz dient als Signal für den Transport in das Endoplasmatische Retikulum (ER) und wird beim Eintritt in das ER abgespalten. Hier werden zunächst zwei N-Glykosylierungen verknüpft und eine Disulfidbrücke ausgebildet. Nach Abspaltung der C-terminalen Signalsequenz wird ein GPI-Anker C-terminal verknüpft. Die weiteren posttranslationalen

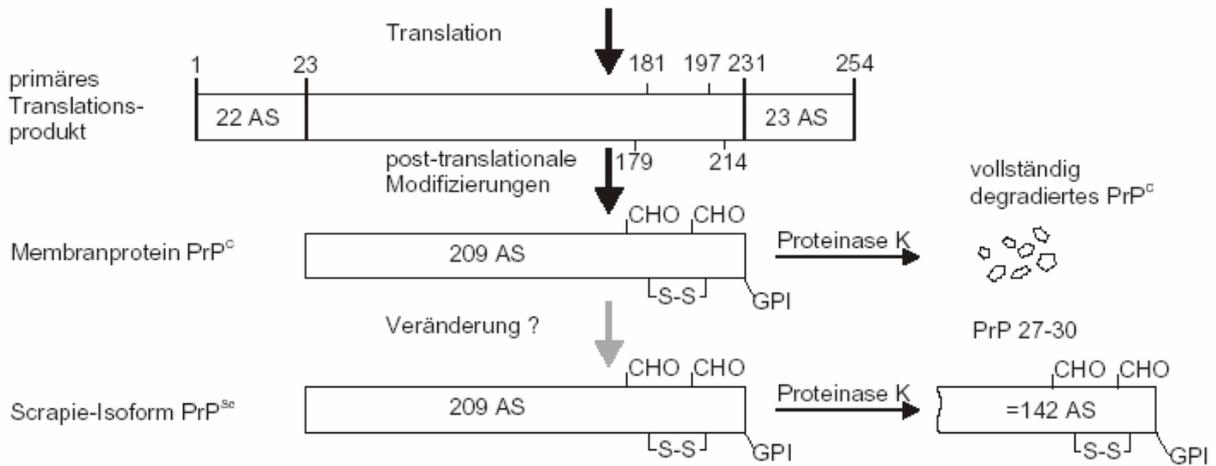


Abb. 1.1: Biosynthese des Prionproteins am Beispiel des Hamster Prionproteins. Das primäre Translationsprodukt enthält eine N-terminale Signalsequenz für den Transport in das ER und wird beim Eintritt in das ER abgespalten. Zudem besitzt es eine C-terminale Signalsequenz zum Anhängen eines GPI-Ankers und zwei N-Glykosylierungsstellen. Das entstehende PrP^C hat ein Molekulargewicht von 30 bis 33 kDa. PrP^C wird durch Proteinase K vollständig degradiert. Durch die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} erhält das Protein eine Teilresistenz gegen Proteinase K. Die ersten 67 AS werden abgebaut und zurück bleibt ein 27 bis 30 kDa großes Protein, PrP (27-30) (verändert nach Weissmann 1994).

Modifikationen erfolgen im Golgi-Apparat. Diese umfassen Modifikationen der N-Glykosylierungen und des GPI-Ankers (Harris, 1999). Die vollständig modifizierte Form von PrP^C besitzt ein Molekulargewicht von etwa 33-35 kDa. PrP^C wird an die Zelloberfläche transportiert und wird dort in der Membran verankert. Es wird dabei in speziellen Membranbereichen angereichert, die als *rafts* bezeichnet werden (Vey *et al.*, 1996). Dies sind Mikrodomänen aus Cholesterol, Sphingolipiden und Cerebrosiden innerhalb der Plasmamembran.

Die genaue Funktion des PrP^C ist bis heute noch weitgehend unklar (*zur Übersicht s. Hörnlimann et al.*, 2001). Neben einer Rolle bei der Regulation des Kupferhaushaltes (Miura *et al.*, 1999) wird auch der Abbau von oxidativem Stress diskutiert (Brown *et al.*, 1999; Waggoner *et al.*, 2000). Obwohl die hohe Konservierung der PrP-Sequenz auf eine essentielle Funktion schließen lässt, zeigten PrP-knock-out (PrP^{0/0}-) Mäuse eine normale Entwicklung (Bueller *et al.*, 1992). Da diese PrP^{0/0}-Mäuse keine klinischen Symptome einer Prionkrankheit aufweisen, ist davon auszugehen, dass der Krankheitsverlauf nicht auf einen Funktionsverlust von PrP^C sondern vielmehr auf die Akkumulation von PrP^{Sc} zurückzuführen ist.

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

Zwischen PrP^C und PrP^{Sc} konnte in der chemischen Zusammensetzung kein Unterschied gefunden werden (Stahl *et al.*, 1993). Die beiden Isoformen sind hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenzen identisch und tragen die gleichen posttranslationalen Modifikationen: die N-Glykosylierungen und den GPI-Anker (s. Kap. 1.4). Sie können aber dennoch deutlich voneinander unterschieden werden, da sie sich hinsichtlich ihrer Struktur sowie ihren physikalischen und biochemischen Eigenschaften unterscheiden (s. Tab. 1.2). So wird PrP^C durch Verdauung mit Proteinase K (PK) komplett abgebaut (s. Abb. 1.1; McKinley *et al.*, 1983). PrP^{Sc} hingegen weist eine hohe Resistenz gegenüber Proteinase auf. Während der Proteolyse durch PK wird ein etwa 67 AS umfassendes N-terminales Segment verdaut. Der verbleibende Rest bildet sehr regelmäßige amyloide Stäbchen (Prion rods) und wird auf Grund seines Molekulargewichts von 27-30 kDa auch PrP (27-30) genannt. Die verkürzte Form PrP (27-30) ist nach wie vor infektiös. Die PK-Resistenz von PrP^{Sc} wird sowohl bei den meisten Reinigungsprotokollen für PrP (27-30), wie auch bei den meisten diagnostischen Tests genutzt (s. Kap. 1.8). Die beiden PrP-Isoformen unterscheiden sich auch bezüglich ihrer Sekundärstruktur, wie vergleichende Untersuchungen mittels Circular dichroismus und Infrarot-Spektroskopie zeigten. So hat PrP^C einen α -helikalen Anteil von 42 % und nur einen sehr geringen Anteil an β -Faltblatt (ca. 3 %). PrP^{Sc} hingegen weist einen etwas verringerten α -helikalen Anteil von 30 % und einen deutlich erhöhten β -Faltblatt Anteil von 43 % auf (Pan *et al.*, 1993; Safar *et al.*, 1993). Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Isoformen besteht bezüglich ihres Löslichkeitsverhaltens. So ist PrP^C in milden Detergenzien löslich. PrP^{Sc} hingegen bildet große, unlösliche Aggregate, die entweder amorph oder als amyloide Fibrillen vorliegen (Merz *et al.*, 1981; Prusiner, 1983). Die eben beschriebene PK-Resistenz von PrP^{Sc} ist vermutlich auf den gegenseitigen Schutz der Proteine innerhalb dieser Aggregatstruktur oder aber auf die Anwesenheit

Tab. 1.2: Vergleich der Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}

Eigenschaft	Zelluläre Isoform (PrP ^C)	Scrapie Isoform (PrP ^{Sc})
Infektiosität	nicht infektiös	infektiös
Protease K-Sensitivität	vollständig abbaubar	C-terminal resistent
Sekundärstruktur	α -helikal dominierte Struktur	β -Faltblatt-dominierte Struktur
Löslichkeit	löslich (in milden Detergenzien)	unlöslich
Aggregationszustand	monomer	hochmolekulare Aggregate

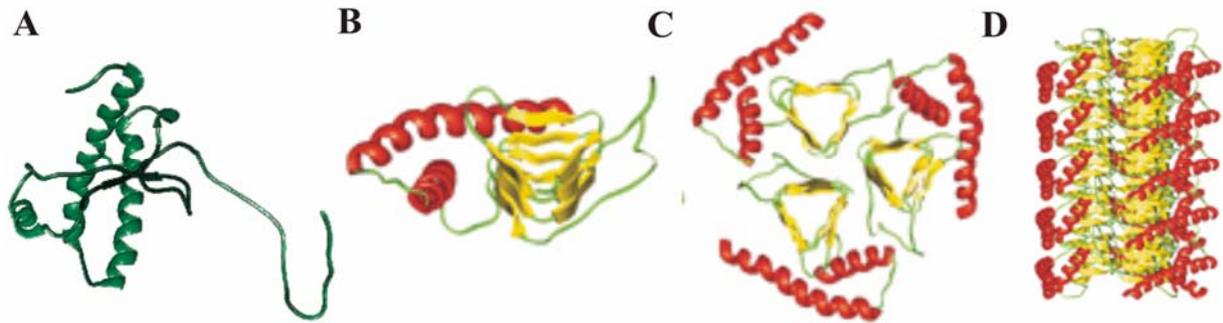


Abb. 1.2: Vergleich der strukturierten Core-Bereiche von PrP^C und PrP^{Sc}

A NMR-Struktur von rekombinantem SHa PrP (90-231) (Liu *et al.*, 1999). **B** Modell der Struktur von PrP (27-30), welches auf elektronenmikroskopischen Daten von 2D-Kristallen beruht. **C** Es wird angenommen, dass PrP^{Sc} Trimere ausbildet, die wiederum in der Lage sind, **D** Fibrillen zu bilden (Govaerts *et al.*, 2004).

von Sekundärkomponenten wie Lipiden oder Polysacchariden (Dumpitak *et al.*, 2005) zurückzuführen. Wird PrP^{Sc} in Lösung gebracht, kommt es zu einer strukturellen Veränderung des PrP und einem Verlust der Infektiosität (Riesner *et al.*, 1996). Dies lässt darauf schließen, dass die infektiöse Eigenschaft von PrP^{Sc} mit der Sekundärstruktur und dem Löslichkeitszustand korreliert. In Abbildung 1.2 A ist die dreidimensionale NMR-Struktur von rekombinantem PrP (rek PrP) der Sequenz des Syrischen Goldhamsters dargestellt. Rek PrP fehlen sowohl die posttranslationalen Modifikationen als auch die N-terminalen AS 23-89 (rek PrP (90-231)). Dennoch wird die dargestellte Struktur allgemein als Struktur von PrP^C angenommen (Hornemann *et al.*, 2004). Ein Strukturmodell für PrP (27-30), das anhand elektronenmikroskopischer Daten von 2D-Kristallen erstellt wurde (Wille *et al.*, 2002), ist in Abbildung 1.2 B gezeigt. Nach diesem Modell bildet PrP (27-30) β -Helices aus und ist in Trimeren angeordnet (Abb. 1.2 C), welche sich zu fibrillären Strukturen zusammen lagern (Abb. 1.2 D).

1.6 Hypothesen zur Prion-Replikation

Trotz der allgemeinen Akzeptanz der Prionhypothese, selbst nach dem letztendlichen Beweis durch die Prusiner-Gruppe (Legname *et al.*, 2004) ist der Mechanismus der Replikation des Prionproteins weiterhin nicht geklärt. Modelle zur Beantwortung der Frage, wie sich ein nur aus Protein bestehender Krankheitserreger in Abwesenheit von codierender Nukleinsäure replizieren kann, sollten in der Lage sein, alle Eigenschaften des Erregers zu klären. Dies beinhaltet vor allem das Auftreten sporadischer, familiärer und infektiöser Formen der Krankheit. Drei wichtige Modelle werden im Zusammenhang mit der „protein-only“-Hypothese diskutiert: Das „Heterodimer-Modell“ (Cohen *et al.*, 1994), das „Kooperative Prusiner-Modell“ (Eigen, 1996) sowie das Modell der „keiminduzierten Aggregation“ (Jarret & Lansbury, 1993;

Come *et al.*, 1993). Alle drei Modelle bauen auf der Grundlage auf, dass PrP^{Sc} in der Lage ist, die Umwandlung von PrP^{C} in weiteres PrP^{Sc} zu katalysieren (Prusiner *et al.*, 1990).

Das von Cohen und Prusiner postulierte **Heterodimermodell** (Abb. 1.3 A) geht von einem Gleichgewicht zwischen PrP^{C} und einer leicht destabilisierten Form PrP^* aus, das auf Seiten des PrP^{C} liegt (Cohen *et al.*, 1994). Nur PrP^* kann mit PrP^{Sc} interagieren, wodurch ein heterodimerer Zwischenzustand entsteht. Daran schließt sich die Umwandlung von PrP^* in PrP^{Sc} an. Aus dem Heterodimer wird so ein PrP^{Sc} -Homodimer, welches nach Dissoziation weitere Umwandlungen einleiten kann oder durch Aggregation der Reaktion entzogen wird. Bei diesem Modell handelt es sich um eine lineare Autokatalyse, die zu einer exponentiell ansteigenden Bildung von PrP^{Sc} führt. Das Gleichgewicht zwischen PrP^{C} und PrP^{Sc} muss auf der Seite von PrP^{Sc} liegen, da sonst keine treibende Kraft für den katalytischen Umsatz vorhanden wäre.

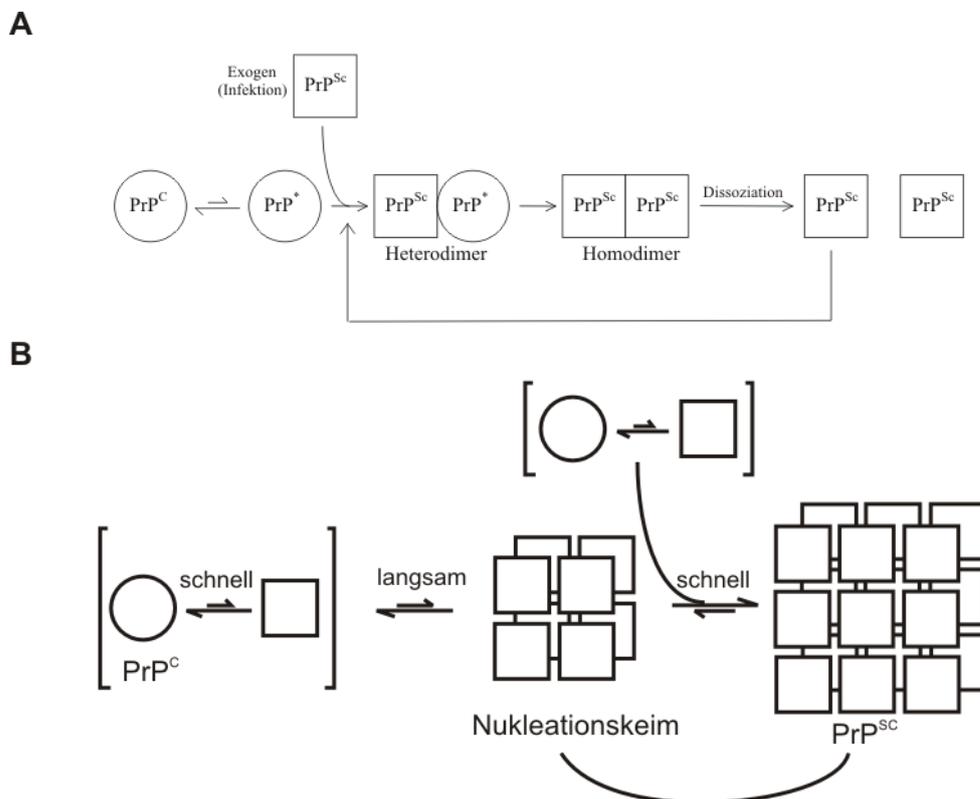


Abb. 1.3: Replikationsmodelle

A Heterodimer-Modell: PrP^{Sc} bindet an eine destabilisierte Form von PrP^{C} (PrP^*), wodurch ein Heterodimer gebildet wird. Durch die Wechselwirkung wird die Umwandlung von PrP^* zu PrP^{Sc} induziert und es entsteht ein Homodimer. Nach Dissoziation stehen zwei PrP^{Sc} -Monomere zur Katalyse weiterer Umwandlungen bereit (verändert nach Cohen *et al.*, 1994).

B Modell der keiminduzierten Aggregation: Nach diesem Modell muss erst ein Nukleationskeim gebildet werden, damit die Umwandlung in PrP^{Sc} thermodynamisch günstig wird und sehr schnell ablaufen kann (Jarret & Lansbury, 1993; Come *et al.*, 1993).

Eigen hat nun berechnet, dass die spontane Umwandlung extrem langsam verlaufen muss, da ansonsten der katalytische Effekt für ein PrP^{Sc}-Molekül unrealistisch hoch wäre und der PrP^{Sc}-Gehalt sogar ohne Infektion ansteigen würde (Eigen, 1996). Er formulierte daraufhin das **kooperative Prusiner-Modell**. Hier müssen mehrere Moleküle PrP^{Sc} kooperativ zusammenwirken, um ein Molekül PrP^C umzuwandeln. Damit ist der katalytische Effekt eines einzelnen PrP^{Sc}-Moleküls geringer als im Heterodimer-Modell. Das Gleichgewicht zwischen PrP^C und PrP^{Sc} liegt wieder auf der Seite von PrP^{Sc}, aber die nicht-katalytische Bildung von PrP^{Sc} ist so langsam, dass PrP^{Sc} immer schneller abgebaut als spontan gebildet wird. Lansbury hat sein Modell der Prion-Replikation (Abb. 1.3 B) von der **keiminduzierten Aggregation** abgeleitet, die schon für eine Vielzahl von Aggregationsprozessen beschrieben worden ist. Im Gegensatz zu den beiden ersten Modellen liegt hier das Gleichgewicht auf der Seite von PrP^C (Come *et al.*, 1993; Jarret & Lansbury, 1993). Nach diesem Modell muss zunächst ein Nukleationskeim gebildet werden oder exogen z.B. durch eine Infektion zugegeben werden, damit die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} thermodynamisch begünstigt wird und schnell ablaufen kann. Es kommt zu einem schnellen Wachstum der Aggregate. Für eine Ausbreitung der Infektion ist ein anschließender Zerfall der entstandenen sehr großen Aggregate nötig, wodurch neue Keime entstehen, die der Polymerisation wieder zur Verfügung stehen.

1.7 *In vitro*-Konversion

Da jahrelang von verschiedenen Arbeitsgruppen darauf hingearbeitet wurde, den endgültigen Beweis der Prionhypothese zu erbringen, d.h. nicht infektiöses PrP *in vitro* in eine infektiöse Form zu überführen, steht mittlerweile eine ganze Reihe von Konversionssystemen für unterschiedliche Prionproteine (z.B. rek PrP, PrP^C, PrP-Peptidfragmente, PrP^{Sc} nach Deaktivierung) zur Verfügung (Baskakov, 2004; Horiuchi & Caughey, 1999; Kocisko *et al.*, 1994). Alle dieser Systeme führen zu der Generierung verschiedener PrP^{Sc}-spezifischer Eigenschaften, wie der Zunahme der β -Faltblattstruktur, Unlöslichkeit oder PK-Resistenz, nicht aber zur Erzeugung von *de novo* Infektiosität.

Ein Konversionssystem, das ebenfalls zur Generierung verschiedener PrP^{Sc}-spezifischer Eigenschaften führt, soll an dieser Stelle ausführlicher beschrieben werden, da es in unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde und als Grundlage dieser Arbeit diente. Dieses System stellt die Lösungsmittel bedingte Umwandlung von rek PrP (90-231) in Abwesenheit von Keimen nach, indem eine Zunahme der β -Struktur einhergehend mit Unlöslichkeit und Aggregation erzeugt wird (Post *et al.*, 1998). Die Konversion wird durch sehr geringe Mengen des anionischen Detergenz

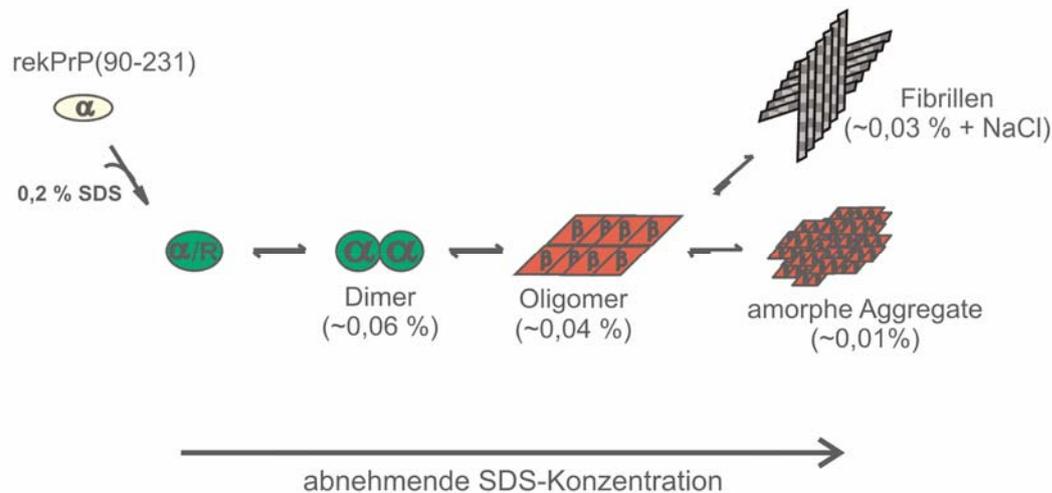


Abb. 1.4: *In vitro*-Konversion.

Durch Verdünnung von SDS kann ein Übergang von einem überwiegend α -helikalen Monomer zu β -faltblattreichen Aggregaten, bzw. fibrillären Strukturen induziert werden. Dabei treten als Intermediate ein α -helikales Dimer und ein β -strukturiertes Oligomer auf (Darstellung verändert nach Jansen 2002).

SDS induziert (s. Abb. 1.4). Durch systematische Veränderungen in der SDS-Konzentration konnten verschiedene Intermediate der Konversion stabil eingestellt und identifiziert werden (Jansen *et al.* 2001). Bei 0,2 % SDS liegt rek PrP (90-231) mit überwiegend α -helikaler Sekundärstruktur in einer PrP^C-ähnlichen Form vor. Durch Verringerung der SDS-Konzentration führt das System im Stundenbereich, über die Zwischenstufen der löslichen, überwiegend α -helikalen Dimere sowie der löslichen Oligomere mit β -Faltblattstruktur, zur Ausbildung von unlöslichen, β -faltblattreichen, amorphen Aggregaten.

1.8 Diagnose von Prionkrankheiten

Die Notwendigkeit einer frühzeitigen Diagnose von menschlichen Prionkrankheiten, wie der CJD, war ohne die Möglichkeit einer spezifischen Therapie lange Zeit fraglich. Doch spätestens seit dem bekannt werden der ersten Fälle der Übertragung von vCJD durch Bluttransfusionen (Llewelyn *et al.*, 2004), ist die dringende Notwendigkeit einer frühzeitigen Diagnose beim Menschen unumstritten, um so einer möglichen Übertragung des Erregers von Mensch zu Mensch vorzubeugen. Auch die Diagnose von BSE ist mit Blick auf die Nahrungs- und Produktsicherheit unerlässlich. Neben der Nahrungsmittelindustrie bestehen hier Übertragungspotentiale in pharmazeutischen Produkten. Letztere enthalten häufig Substanzen, die aus oder mit Hilfe von Rinder-, Schaf- oder Ziegenbestandteilen hergestellt werden. Eine verlässliche Diagnostik sowohl für Mensch als auch für Rind ist folglich dringend notwendig.

Zurzeit gibt es keinen Test, um Prionkrankheiten sicher und selektiv am lebenden Tier oder gar beim Menschen zu diagnostizieren. Beim Menschen werden Prionkrankheiten normalerweise anhand der klinischen Symptome diagnostiziert und *post mortem* mittels histopathologischer Untersuchungen des Hirngewebes bestätigt.

Die einzig sichere Methode, um Infektiosität direkt nachzuweisen, ist der Bioassay im Hamster- oder Mausmodell. Der Nachteil des Bioassays für diagnostische Zwecke liegt in der langen Inkubationszeit der Prionkrankheiten begründet. Obwohl Tiermodelle, wie transgene Mäuse, die auch PrP anderer Spezies überexprimieren, entwickelt worden sind, ist die Zeitspanne von Monaten von der Infektion bis hin zum eindeutigen Ergebnis immer noch sehr lang.

Eine Strategie zur Diagnose von Prionkrankheiten ist der Nachweis von Surrogatmarkern. Da bislang aber keine selektive TSE-Diagnostik mittels Surrogatmarkern etabliert werden konnte, müssen zurzeit noch umfangreiche Differenzialdiagnosen parallel durchgeführt werden.

Der einzige bisher bekannte spezifische Marker für alle Prionkrankheiten ist PrP^{Sc}. Aus diesem Grund hat sich die molekulare Diagnostik auf den Nachweis von PrP^{Sc} oder genauer der PK-resistenten, verkürzten Form von PrP^{Sc}, PrP (27-30) konzentriert. Die meisten routinemäßig eingesetzten BSE-Schnelltests nutzen demnach die partielle proteolytische Resistenz von PrP^{Sc} in Kombination mit immunologischen Nachweismethoden aus. Zu den von der europäischen Kommission zugelassenen Schnelltests zur BSE-Diagnostik gehören folgende: Prionics-Check-Western (Schaller *et al.*, 1999), Enfer-Test (Moynagh & Schimmel, 1999), Prionics-Check-LIA (Biffiger *et al.*, 2002), PLATELIA-Test (Grassi *et al.*, 2000) und der konformationsabhängige Immunotest (CDI) (Safar *et al.*, 2002). Alle diese Tests werden *post mortem* an Hirnstamm- oder Rückenmarksgewebe durchgeführt. Der direkte Nachweis von PrP (27-30) in Körperflüssigkeiten ist mit diesen Standardnachweisverfahren noch nicht möglich.

1.9 Amplifikation fehlgefaltener Proteine

M. Eigen stellte 2001 ein Modell zur Vermehrung von Prionen in Folge einer Infektion vor (Eigen, 2001). Nach diesem Modell vermehren sich die vorhandenen infektiösen PrP^{Sc}-Einheiten in zwei aufeinander folgenden Schritten (Abb. 1.5). Wenn die linearen PrP^{Sc}-Ketten eine bestimmte kritische Größe aufweisen, binden PrP^C-Moleküle an die Enden dieser Ketten. Durch diese Wechselwirkung werden die gebundenen PrP^C-Moleküle in die pathogene Form umgewandelt. Dadurch kommt es im ersten Schritt zu einem Kettenwachstum. Im zweiten Schritt werden die Aggregate gespalten. Der

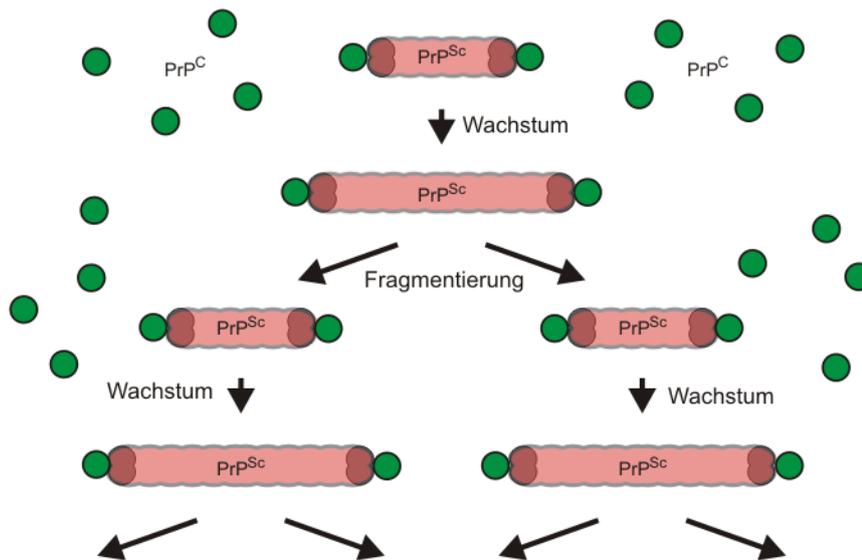


Abb. 1.5: Vermehrungsmodell infektiöser Prionen

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

Kettenbruch in Kombination mit nachfolgender erneuter Anlagerung von PrP^C führt zu einer exponentiellen Vermehrung der infektiösen PrP^{Sc}-Einheiten. Die Sensitivität bestehender Testsysteme könnte drastisch erhöht werden, wenn es gelänge, mit Hilfe eines *in vitro*-Systems zur Vermehrung der infektiösen Moleküle, basierend auf diesem Modell, zu Beginn vorhandene geringste Mengen PrP^{Sc} nachzuweisen.

Im gleichen Jahr, also zu Beginn dieser Arbeit, veröffentlichten Soto und Mitarbeiter bereits experimentelle Daten zur sensitiven Detektion von PrP (27-30) mittels „protein misfolding cyclic amplification“ (PMCA) (Sarborio *et al.*, 2001). PMCA beruht auf demselben Prinzip wie das von Eigen beschriebene Modell und impliziert weiterhin den Replikationsmechanismus der keiminduzierten Aggregation (vgl. Kap. 1.6). In diesem System werden die PrP^{Sc}-Keime durch Hirnhomogenat infizierter Tiere dargestellt (Abb. 1.6). Mit der Zugabe von Hirnhomogenat gesunder Tiere wird dann PrP^C zugeführt. In Anwesenheit von Detergenzien kommt es zu einer Konversion von PrP^C und damit zu dem von Eigen postulierten Aggregatwachstum. Die Spaltung der Aggregate wird im Anschluss daran mittels Ultraschallbehandlung der Proben herbeigeführt. Durch die Einführung von Inkubations-/Ultraschallzyklen kommt es immer abwechselnd zur Aggregatsspaltung gefolgt von erneuter Anlagerung von PrP^C und Aggregatwachstum, und damit zu der von Eigen beschriebenen exponentiellen Amplifikation von PrP^{Sc}. Der Nachweis der Konversion von PrP^C erfolgt anhand der partiellen proteolytischen Resistenz von PrP^{Sc} in Kombination mit immunologischem Nachweis. Es konnte gezeigt werden, dass ohne die Ultraschallbehandlung zwar auch

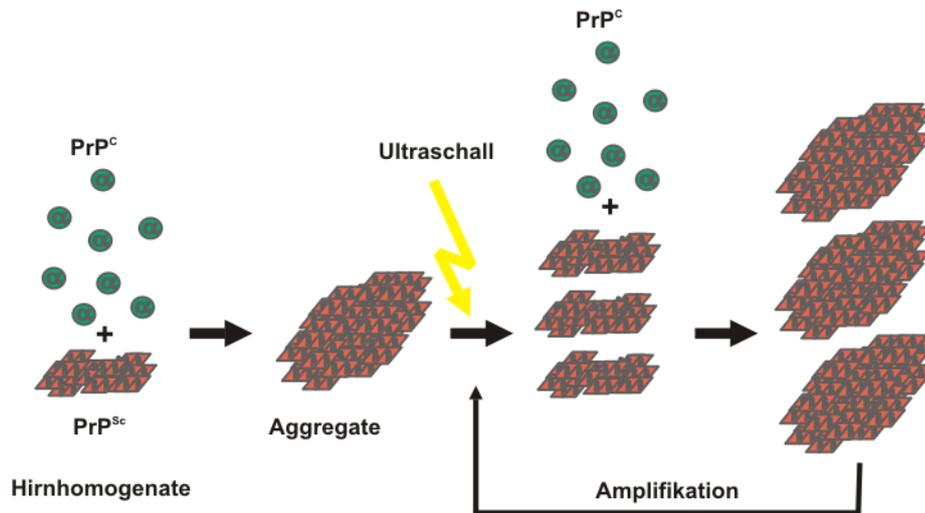


Abb. 1.6: Zyklische Amplifikation fehlgefalteter Proteine (PMCA)

Durch die Zugabe von Hirnhomogenat infizierter Tiere als PrP^{Sc}-Quelle zu Hirnhomogenat gesunder Tiere als PrP^C-Quelle, kommt es zu einer Konversion von PrP^C in die PK-resistente Form und Aggregatwachstum. Mittels Ultraschall werden die gebildeten Aggregate zerbrochen, was eine Zunahme der zur Verfügung stehenden Keime bewirkt. Erneute Anlagerung gefolgt von Ultraschallbehandlung führt zu einer Amplifikation der ursprünglichen Keime (verändert nach Sarborio *et al.*, 2001).

eine Amplifikation von PrP^{Sc} stattfindet, diese jedoch bald zum Erliegen kommt, da hier deutlich geringere Mengen an neugebildetem PrP (27-30) detektiert wurden (Lucassen *et al.*, 2003).

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde mittels PMCA der erste potentielle Lebendtest entwickelt (Castilla *et al.*, 2005). Durch die Zugabe von aufgearbeitetem Blut infizierter Tiere zu Hirnhomogenat gesunder Tiere als PrP^C-Quelle, kommt es auch hier zur Bildung einer nachweisbaren PrP (27-30)-Menge. Damit wurde erstmals PrP^{Sc} bzw. PrP (27-30) im Blut infizierter Tiere direkt nachgewiesen. Dass Prionkrankheiten prinzipiell durch Blut übertragbar sind, konnte im Tiermodell bereits an Bluttransfusionsexperimenten mit Schafen bewiesen werden (Houston *et al.*, 2000; Hunter *et al.*, 2002). Auch im Nagetiermodell für vCJD konnte Infektiosität im Blut nachgewiesen werden (Brown *et al.*, 1999b).

1.10 Fragestellung

Der Hauptbestandteil von Prionen ist das Prionprotein in seiner infektiösen Form (PrP^{Sc}). Prionen stellen somit eine völlig neue Erregerart dar, da hier nicht genetisches Material, sondern allein ein Protein durch Veränderung der Konformation als Pathogen vervielfältigt wird. Für den Mechanismus dieser Replikation wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen, der genaue Ablauf der Replikation ist jedoch noch unklar. PrP^{Sc} ist bisher die einzige Komponente, die erkennbar mit Prionerkrankungen verbunden ist. Somit ist es ideal für die Diagnose dieser Erkrankungen geeignet. PrP^{Sc} liegt, im Gegensatz zur zellulären Isoform des Prionproteins, PrP^{C} , in β -faltblattreicher, aggregierter, unlöslicher Form vor und weist zudem eine partielle Proteinase K- (PK-) Resistenz auf. Die heute zur Verfügung stehenden Verfahren zur TSE-Diagnostik nutzen diese partielle proteolytische Resistenz von PrP^{Sc} in Kombination mit immunologischen Nachweismethoden aus. Auf diese Weise werden die Prionen erst mit dem Einsetzen der klinischen Symptome oder im günstigsten Fall einige Monate vorher und auch dann nur *post mortem* nachgewiesen. Eine sichere Diagnose zu einem früheren Zeitpunkt, d.h. bei BSE in der präklinischen Phase oder sogar am lebenden Rind bzw. CJD-Tests bei Patienten zu Lebzeiten sind derzeit nicht möglich.

Als Grundlage dieser Arbeit diente das von Eigen entwickelte Modell zur Amplifikation von Prionproteinpartikeln (Eigen, 2001; vgl. Kap. 1.9). Dieses Modell stellt ein völlig neuartiges Prinzip zur Diagnose von Prionerkrankungen dar. Durch die Etablierung eines *in vitro*-Systems zur Vermehrung der PrP^{Sc} -Einheiten, basierend auf diesem Modell, wäre ein der PCR (*polymerase chain reaction*) für Nukleinsäuren analoges Verfahren für Proteine verfügbar. Die Entwicklung eines solchen *in vitro*-Systems würde folglich in zweifacher Hinsicht einen großen Fortschritt für die Prionforschung bedeuten: Erstens stünde im Bereich der Grundlagenforschung zum ersten Mal ein System zur Verfügung, mittels dessen einzelne Schritte des Replikationsprozesses genau analysiert werden können. Der zweite Fortschritt ist im Bereich der Diagnostik zu sehen. Mit Hilfe eines *in vitro*-Systems zur Vermehrung der infektiösen Moleküle, könnten geringste Mengen PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Dadurch würde die Sensitivität bestehender Testsysteme drastisch erhöht werden.

Wie bereits erwähnt wurden zu Beginn dieser Arbeit von der Arbeitsgruppe von Soto erstmals experimentelle Daten zur *in vitro*-Amplifikation von PrP^{Sc} veröffentlicht (Saborio *et al.*, 2001). Hier wurde ein System etabliert, in welchem Hirnhomogenat infizierter Hamster als PrP^{Sc} -Quelle in Hirnhomogenat gesunder Hamster als PrP^{C} -Quelle verdünnt wird. Es kommt hierbei zu einer von PrP^{Sc} induzierten Umwandlung von PrP^{C} in eine PK-resistente Form, die sich mit bestehenden Verfahren zur TSE-Diagnostik nachweisen lässt. Mittels mehrmaliger Ultraschallbehandlung der Proben

kann die Menge an neugebildetem PK-resistentem PrP noch erhöht werden. Die Anwendbarkeit dieser Methode für eine routinemäßige Diagnostik ist auf Grund der Verwendung von Hirnhomogenat als notwendige PrP^C-Quelle allerdings als kritisch zu betrachten. Gerade in Bezug auf eine mögliche Anwendung in der Diagnostik von CJD beim Menschen muss das Amplifikationssubstrat, PrP^C, auf Grund der besseren Verfügbarkeit in synthetischer, aufgereinigter Form dem System zugeführt werden können.

Um *in vitro* eine optimale Amplifikation der Prionproteine etablieren zu können, ist eine detaillierte Analyse des bislang ungeklärten Replikationsmechanismus unerlässlich. Auch in diesem Zusammenhang ist die Verwendung von aufgereinigten Komponenten gegenüber der Verwendung von Hirnhomogenat vorzuziehen. Dies gilt sowohl für die als Nukleationskeim für die Umwandlung dienenden PrP^{Sc}-Moleküle, als auch für monomeres PrP^C, welches die Umwandlung durchlaufen soll.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines *in vitro*-Systems zur Vermehrung von PrP^{Sc} auf der Ebene des Aggregatwachstums unter Verwendung von aufgereinigten Proteinen. Die Betonung liegt dabei auf „*in vitro*“, d.h. dass nur aufgereinigte und wohl definierte Komponenten eingesetzt werden sollten. Dadurch soll sich das System deutlich von dem von der Soto Gruppe entwickelten unterscheiden, in dem ein viele Komponenten enthaltender Zellextrakt verwendet wurde. Die Verwendung aufgereinigter Komponenten bietet hierbei zwei grundsätzliche Vorteile:

1. Eindeutige mechanistische Aussagen zur Replikation sind möglich.
2. Eine bessere Verfügbarkeit der Substanzen für die Diagnose ist gewährleistet.

2 Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien wurden bei den üblichen Herstellern für Laborchemikalien bezogen und entsprechen, wenn nicht anders angegeben, dem Reinheitsgrad „pro analysi“. Zum Ansetzen von Lösungen wurde hochreines „Milli-Q-Wasser“, im Folgenden als $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ bezeichnet, verwendet. Dieses wurde von der Hausanlage mit nachgeschaltetem Wasseraufarbeitungssystem (EPA Est. 41237-MA-1; Millipore GmbH, Neu Isenburg) gefiltert. Alle angesetzten Lösungen wurden durch $0,2 \mu\text{m}$ Membranfilter (RC58, Schleicher und Schuell, Dassel) sterilfiltriert.

Alle Arbeiten mit infektiösem Material wurden ausschließlich im S2-Labor unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 und unter Verwendung entsprechender Schutzbekleidung durchgeführt. Für alle Pipettierschritte mit infektiösem Material wurden „safe seal“-PCR-Spitzen (Biozym, Hessisch-Oldendorf) verwendet. Probenträger für Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS), Circular Dichroismus (CD) oder ThioflavinT- (ThT-) Assay wurden mit infektiösem Material unter der sterilen Werkbank befüllt und verschlossen. Zur Dekontamination wurde der Festabfall in doppelte Lagen Polyamid-Vernichtungsbeutel (Greiner) für 4 Stunden bei $134 \text{ }^\circ\text{C}$ in wassergesättigtem Dampf autoklaviert. Flüssigabfall wurde auf 2 M NaOH eingestellt, mindestens 24 Stunden inkubiert und im Anschluss mit HCl neutralisiert oder unter den oben genannten Bedingungen autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte und Küvetten wurden für mindestens eine Stunde in 2 M NaOH eingelegt und dann mit 10 mM NaPi, pH 7,2 neutralisiert.

2.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

NaPi (Natriumphosphatpuffer)

100 mM Na_2HPO_4

100 mM NaH_2PO_4

wurden durch Titration auf den pH-Wert von 7,2 eingestellt.

TBST (Tris Buffered Sodium Tween)

10 mM Tris/HCl pH 8,0

150 mM NaCl

0,01 % Tween 20

NaAc (Natrium-Acetat-Puffer)

1 mM Na-Acetat/Essigsäure pH 4,0

PBS (Phosphatpuffer)

0,2 g/l	KCl
0,2 g/l	KH ₂ PO ₄
8 g/l	NaCl
1,15 g/l	Na ₂ HPO ₄

PBS wurde von der Firma PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bezogen.

Bicarbonatpuffer (10x)

1 M	Na ₂ CO ₃
1 M	NaHCO ₃

wurden durch Titration auf den pH-Wert von 8,3 eingestellt.

2.2 Verwendete Antikörper

Freundlicherweise wurden folgende Antikörper von der Arbeitsgruppe Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt.

Antikörper	Epitop	Spezifität	Anwendung
3F4	109-112	ha, hu	Immunologischer Proteinnachweis
R1	225-231	ha, mo	Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie
D13	96-104	ha, mo	Fluoreszenzkorrelations-Spektroskopie

ha = Hamster, hu = Mensch, mo = Maus

2.3 Verwendete Farbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Firma
Alexa-488	Molecular Probes, Eugene, USA
Alexa-633	Molecular Probes, Eugene, USA

2.4 Verwendete Prionproteine

2.4.1 Rekombinante Prionproteine

Rekombinantes SHa PrP (90-231), im Folgenden als rek PrP (90-231) bezeichnet, das der Aminosäuresequenz von PrP (27-30), sowie rekombinantes SHa PrP (29-231), im Folgenden als rek PrP (29-231) bezeichnet, das annähernd der Vollängensequenz (23-231) des Syrischen Goldhamsters entspricht, wurde von der Arbeitsgruppe Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) in *E. coli* kloniert und uns als

aufgereinigtes Lyophilisat zur Verfügung gestellt (Mehlhorn *et al.*, 1996). Die Aufarbeitung des Lyophilisats, De-, Renaturierung und Aufkonzentrierung, erfolgte in modifizierter Form nach dem Protokoll der Arbeitsgruppe Prusiner (Jansen *et al.*, 2001).

2.4.2 CHO-PrP^C

Transfizierte Chinesische Hamster Ovarien (CHO)-Zellen wurden von dem Labor von Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt (Blochberger *et al.* 1997). Die Aufarbeitung von PrP^C aus CHO-Zellkulturen wurde in unserer Arbeitsgruppe nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe von S. B. Prusiner optimiert (Elfrink & Riesner, 2004). Der Vorteil dieses Systems liegt darin begründet, dass CHO-Zellen, als eukaryotisches System, in der Lage sind, das exprimierte PrP^C posttranslational durch Verknüpfung des GPI-Ankers und der N-Glykosylierungen zu modifizieren. Präparationen von CHO-PrP^C wurden freundlicherweise von K. Elfrink und I. Ostermann zur Verfügung gestellt.

2.4.3 Infektiöse Prionproteine

PrP (27-30)

PrP (27-30), welches durch den in der Aufreinigung enthaltenen Proteolyseschritt mit Proteinase K (PK) N-terminal verkürzt ist, wurde als Saccharosegradientenfraction (ca. 50 % w/v Saccharose) von der Arbeitsgruppe Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt. Präparationen erfolgten gemäß dem standardisierten Protokoll (Prusiner *et al.*, 1983b) aus Hirnen Syrischer Goldhamster, die mit dem Scrapiestamm 263K infiziert wurden. Die Saccharosegradientenfractionen mit PrP (27-30) 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 (Beckman Instruments, USA) 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 (Beckman Instruments, USA) für 1 h bei 4 °C mit 42.000 rpm (100.000 × g) zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in jeweils 600 µl sterilem H₂O_{deion.} resuspendiert und wie zuvor zentrifugiert. Nach Wiederholung des letzten Waschschruttes wurden die Pellets bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Alternativ erfolgte die Isolation von PrP (27-30) aus Hirnen mit dem Scrapiestamm 263K infizierter Hamster. Diese, sowie Hirne gesunder Hamster für Kontroll-experimente, wurden von der Arbeitsgruppe Prusiner (UCSF, San Francisco, USA)

zur Verfügung gestellt. 10 %iges Hirnhomogenat (w/v) wurde unter Verwendung einer Ultraschall-Nadelsonde (Sonificator, Labsonic U, Braun Dissel, Melsungen) bei 50 W hergestellt. Die Präparation erfolgte nach Beekes *et al.* (1995). Das resultierende Pellet wurde in 100 µl des Puffers, in welchem die Experimente durchgeführt werden sollten, aufgenommen.

PrP^{Sc}

Die Isolation von PrP^{Sc} erfolgte aus Hirnen mit dem Scrapiestamm 263K infizierter Hamster. Diese, sowie Hirne gesunder Hamster für Kontrollexperimente, wurden von der Arbeitsgruppe Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt. Sämtliche Schritte der Herstellung von Hirnhomogenat wurden auf Eis durchgeführt und die Puffer auf 4 °C vorgekühlt. 4 ml PBS mit Proteinase-Inhibitor-Mix (complete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche, Mannheim) wurden auf ein Gramm Hirngewebe gegeben und 30 Sekunden mittels Homogenisator (PowerGen 125, Fisher Scientific) auf der niedrigsten Leistungsstufe und anschließend noch zweimal 30 Sekunden auf der höchsten Leistungsstufe homogenisiert. Anschließend wurden 5 ml PBS mit 4 % Sarkosyl auf das Homogenat gegeben und weitere drei mal für 30 Sekunden auf der niedrigsten Leistungsstufe homogenisiert, so dass ein 5 %iges Hirnhomogenat (w/v) in PBS mit 2 % Sarkosyl resultierte. Das Homogenat wurde eine Minute bei 5.000 x g zentrifugiert, um grobe Gewebefragmente abzutrennen. Der Überstand wurde als Hirnhomogenat eingesetzt. Die Aufreinigung erfolgte mittels NaPTA-Fällung in modifizierter Weise nach dem von Safar publizierten Protokoll (Safar *et al.*, 1998; Birkmann *et al.*, 2005). Für die NaPTA-Fällung wurden 500 µl Hirnhomogenat auf 50 U/ml Benzonase (Merck, Darmstadt) und 1 mM MgCl₂ eingestellt und für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurde das Homogenat auf 0,25 % NaPTA (Phosphotungstic acid sodium salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 10,6 mM MgCl₂ eingestellt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Der Fällungsansatz wurde anschließend für 30 min bei 14.000 x g zentrifugiert und Überstand und Pellet getrennt. Das Pellet wurde mit 200 µl PBS 250 mM EDTA pH 8 bei 37°C für 30 min geschüttelt und anschließend bei 14.000 x g für 30 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Im Anschluss erfolgte ein Waschschrift mit 250 µl des Puffers, in welchem die Experimente durchgeführt werden sollten. Das resultierende Pellet wurde in 100 µl desselben Puffers aufgenommen. Vor Verwendung der Proben wurden diese dreimal 2 s mittels einer Nadelsonde bei 30 % Leistung mit Ultraschall behandelt (Bandelin HD 2070, Bandelin Electronic, Berlin).

Als einheitliche Größe zur Benennung der eingesetzten Hirnmenge wird im Folgenden die Einheit Hirnäquivalent (HÄ) benutzt. Ein HÄ entspricht hierbei einem Gramm Hirnmaterial.

2.5 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen

Die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen erfolgte über eine kovalente Bindung des Succinimidylesters des Farbstoffs an freie Aminogruppen. Im Markierungsansatz wurden entweder 10 µg rek PrP oder 25 bis 50 µg Antikörper und 5 µg Fluoreszenzfarbstoff (hier Alexa 488 und Alexa 633) eingesetzt. Der Ansatz wurde mit 10x Bicarbonatpuffer auf 1x Bicarbonatpuffer eingestellt.

2.5.1 Fluoreszenzmarkierung von rekombinanten Prionproteinen

Die Reaktionsansätze wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, wobei der Reaktionsansatz mehrfach gemischt wurde. Die Abtrennung von freiem Farbstoff erfolgte mittels Größenausschlußchromatographie über eine NAP[®] 5-Säule (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden). Nach Equilibrieren der NAP[®] 5-Säule mit dem dreifachen Eigenvolumen an Elutionspuffer (10 mM NaPi, pH 7,2; 0,2 % SDS, 150 mM NaCl) wurde der Reaktionsansatz auf die Säule gegeben und anschließend mit Elutionspuffer eluiert. Die Fraktionierung erfolgte in 100 µl Aliquots. Durch Absorptionmessung wurde die Fraktion bestimmt, welche das mit Farbstoff markierte Protein enthielt. Markierte Proteine wurden bei 4 °C gelagert.

2.5.2 Fluoreszenzmarkierung von Antikörpern

Die Reaktionsansätze wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, wobei der Reaktionsansatz mehrfach gemischt wurde. Anschließend wurde der Ansatz bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Abtrennung des freien Farbstoffs erfolgte mittels Größenausschlußverfahren in Zentrifugenröhrchen (Biomax Ultrafree, 10 kDa, Millipore, Bedford, USA) durch Zentrifugationsschritte bei 14.000 x g und 10 °C für jeweils 1,5 Stunden. Diese enthalten Membranen mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa. Beim Größenausschlußverfahren passiert der freie Farbstoff die Membran, während die markierten Proteine zurückgehalten werden. Der Ansatz wurde achtmal mit jeweils 450 µl 100 mM Natriumbicarbonatpuffer pH 8,3 gewaschen. Die Markierung der Antikörper wurde freundlicherweise von E. Birkmann durchgeführt.

2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung (Micro BCA-Test)

Die Proteinkonzentrationsbestimmung mit Hilfe des Micro BCA[™]-Testes (Pierce, Rockford, Illinois, USA) beruht auf einer quantitativen kolorimetrischen Methode. In alkalischer Umgebung reduzieren Proteine Cu²⁺ zu Cu¹⁺. Zwei Bicinchoninsäure

(BCA)-Moleküle bilden dann mit Cu^{1+} einen Chelatkomplex, der bei 562 nm absorbiert.

Lösungen:

Micro BCA™ Reagenz A:	Natriumcarbonat, Natriumdicarbonat, Natriumtartrat, 0,2 N NaOH
Micro BCA™ Reagenz B:	4 %ige Bicinchoninsäure (BCA)
Micro BCA™ Reagenz C:	4 %ige Kupfersäure in Pentahydratwasser
Albuminstandard:	2 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) in 0,9 %iger Kochsalzlösung, 0,05 % Natriumazid
Reaktionslösung:	25 Teile Micro BCA™ Reagenz A, 24 Teile Micro BCA™ Reagenz B, 1 Teil Micro BCA™ Reagenz C

Eine 1:1 Mischung aus Proteinlösung und Reaktionslösung wird zunächst für eine Stunde bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Absorption bei 562 nm gemessen. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wird parallel eine BSA-Verdünnungsreihe gemessen und eine Eichgerade erstellt.

2.7 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer denaturierenden, diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (1989) in einer Hoefer SE 600 Gelelektrophoresekammer von Pharma Biotech (San Fransisco, USA) mit vertikalen Plattengelen. Zunächst wurde ein 12 %iges Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und ein 3 %iges Sammelgel auf das Trenngel geschichtet. Die Proben wurden 1:1 mit Auftragspuffer gemischt und 5 Minuten bei 100 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte für 30 Minuten bei 180 V und dann für zwei bis drei Stunden bei 300 V oder alternativ bei 30 V über Nacht. Zur Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteine wurde ein Proteinstandard aufgetragen.

Acrylamid-Stammlösung (30 : 0,8)

30 %	Acrylamid
0,8 %	N,N'-Methylenbisacrylamid

Die Lösung wurde für mindestens 30 Minuten mit Amberlite MB3 gerührt, um die freie Acrylsäure zu binden, und anschließend filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

10 x Gelelektrophoresepuffer nach Laemmli

0,25 M	Tris/HCl pH 8,3
1,9 M	Glycin

Bei der Elektrophorese wurde eine 1:10-Verdünnung eingesetzt, der anschließend SDS bis zu einer Endkonzentration von 0,1 % zugesetzt wurde.

Trenngel

380 mM	Tris/HCl, pH 8,8
12 %	Acrylamid/Bisacrylamid (30 : 0,8)
0,1 %	SDS (Natriumdodecylsulfat)
0,1 %	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
0,1 %	APS (Ammoniumperoxodisulfat)

Sammelgel

124 mM	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
3 %	Acrylamid/Bisacrylamid (30 : 0,8)
0,1 %	SDS (Natriumdodecylsulfat)
0,1 %	TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
0,1 %	APS (Ammoniumperoxodisulfat)

Proteinstandard

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

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

Auftragspuffer nach Laemmli

70 mM	Tris/HCl, pH 6,8
5 %	2-β-Mercaptoethanol
2 %	SDS
5 %	Glycerin
0,05 %	Bromphenolblau

2.8 Semi-Dry-Blot

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung können Proteine durch dieses Verfahren auf eine Polyvinylfluorid- (PVDF-) Membran transferiert werden. Zunächst wurde die Membran durch Schwenken in Ethanol aktiviert. Das Trenngel, sechs Chromatographiepapiere (Whatman 3MM Chr) und die PVDF-Membran wurden zunächst in 1x Laemmli-Puffer ohne SDS geschwenkt. Der Transfer erfolgte in einer "Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell" (Biorad, Hercules, USA) für ca. 1 h bei $1,5 \text{ mA/cm}^2$ und maximal 25 V und wurde folgendermaßen aufgebaut:

Anode → 3x Whatman → PVDF-Membran → Trenngel → 3x Whatman → Kathode.

Die Detektion erfolgte durch immunologischen Proteinnachweis (s. Kap. 2.10).

2.9 Dot Blot

Beim Dot-Blot Verfahren werden die Proteine unter Vakuum auf eine PVDF-Membran (Millipore GmbH, Neu Isenburg) mit einer Porengröße von $0,45 \mu\text{m}$ übertragen. Es wurde eine Apparatur mit 96 Probenlöchern (S & S Minifold I, Schleicher & Schuell, Dassel) verwendet. Die PVDF-Membran wurde zunächst mit Ethanol aktiviert und anschließend zusammen mit einem Chromatographiepapier (Whatman 3MM) in TBST geschwenkt. Der Aufbau bestand aus der unteren Kammer, dem Chromatographiepapier, der Membran und der oberen 96-Lochplatte. In die Probenlöcher wurden zunächst $100 \mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ vorgelegt, in die dann die Proben pipettiert wurden. Unter Vakuum wurden dann die Proben durch die Membran gesogen, wobei es zur Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran kommt. Die Detektion erfolgte durch immunologischen Proteinnachweis (s. Kap. 2.10). Da der PrP-spezifische Erstantikörper 3F4 nur denaturiertes Protein erkennt, wurde die proteinbeladene Membran vor Durchführung des immunologischen Nachweises für 5 min in 1 % KOH geschwenkt. Optional wurden die Proben vor dem Auftragen 1:1 mit Auftragspuffer gemischt und 5 Minuten bei 100°C inkubiert.

2.10 Immunologischer Proteinnachweis

Die verbliebenen freien Bindeplätze der PVDF-Membran wurden zunächst durch Schwenken für 1 h in 5 % Milchpulver abgesättigt. Dann wurde die Membran kurz mit TBST gewaschen und mit dem jeweils angegebenen PrP-spezifischen Erstantikörper für 1 h bei Raumtemperatur oder optional ü. N. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBST gewaschen. Als Nachweisantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper (Sheep anti mouse, Pierce Biotechnology, Inc.) verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h. Um ein starkes Hintergrundsignal zu vermeiden, wurde ungebundener Nachweisantikörper durch drei- bis viermaliges

Waschen für 10 min mit TBST entfernt. Zum Nachweis wurde die Membran dann mit dem ECL-Detektions-Reagenz (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB) für 1 min benetzt. Dieses Reagenz enthält Luminol, welches durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase in alkalischem Medium in einer Chemolumineszenzreaktion oxidiert wird. Die dabei entstehende Lumineszenz wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms (HyperfilmTM ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) mit variierenden Expositionszeiten von 10 sek bis 2 h detektiert.

2.11 Proteolyse mittels Proteinase K

Zur Bestimmung des Proteinase K-resistenten PrP - Anteils wurde die jeweilige Probe, soweit nicht anders beschrieben, auf eine Proteinase K - Konzentration (Boehringer Mannheim GmbH) von 100 ng/ μ l eingestellt und für eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Die Proteolyse wurde durch Zugabe von Auftragspuffer und fünfminütigem Kochen gestoppt.

2.12 Löslichkeitsbestimmung durch differentielle Zentrifugation

Die Löslichkeit von Proteinen kann durch differentielle Ultrazentrifugation bestimmt werden. Die Proben werden dafür 1 h bei 100.000 x g (TLA-45 Rotor) und 25°C in der Beckman Optima TM TL Ultrazentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA) zentrifugiert. Partikel, die unter diesen Bedingungen im Überstand verbleiben, gelten als löslich (Hjelmeland *et al.*, 1984). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in Auftragspuffer aufgenommen. Der relative Proteingehalt in Überstand und Pellet wurde durch Western-Blot oder Dot Blot mit anschließendem immunologischen Nachweis bestimmt.

2.13 Circular Dichroismus- (CD-) Spektroskopie

Das Messprinzip der CD-Spektroskopie beruht darauf, dass asymmetrische Moleküle unterschiedliche Extinktionskoeffizienten für links- (ϵ_L) und rechts- (ϵ_R) zirkular polarisiertes Licht aufweisen. Demnach wird links- und rechtszirkular polarisiertes Licht von diesen Molekülen unterschiedlich stark absorbiert. Bei der CD-Spektroskopie wird der Unterschied zwischen den Koeffizienten gemessen: $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$. Dieser Unterschied wird meistens in Form der Elliptizität (θ) angegeben. Dabei besteht folgender Zusammenhang zwischen $\Delta\epsilon$ und der Elliptizität:

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

mit: θ = Elliptizität
 c = Konzentration
 d = Schichtdicke
 λ = Wellenlänge
 ϵ = Extinktionskoeffizient

Gleichung 2.1

Hieraus geht hervor, dass das erhaltene Signal sowohl positive als auch negative Werte annehmen kann, was zu einer sehr scharfen Auflösung der Absorptionsbanden führt. Zu einem CD-Effekt kommt es nur bei optisch aktiven Molekülen, d.h. bei Molekülen deren elektrisches und magnetisches Übergangsdipolmoment nicht genau senkrecht aufeinander stehen. Verschiedene Sekundärstrukturelemente von Proteinen weisen unterschiedliche asymmetrische Eigenschaften auf und lassen sich somit im CD-Spektrum zuordnen. Informationen über die Sekundärstruktur liefern dabei die Elektronenübergänge der Amidgruppen im Proteinrückgrat im fernen UV-Bereich (~170-260 nm), wohingegen die Elektronenübergänge der aromatischen Seitenketten (~260-290 nm) Aufschluss über die Tertiärstruktur des Proteins geben. Anhand eines CD-Spektrums lassen sich theoretisch die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente berechnen. Da allerdings sowohl die Seitenketten als auch die Größe der einzelnen Sekundärstrukturelemente einen Einfluss auf das gemessene Spektrum nehmen, lassen sich CD-Spektren nur durch Vergleich mit den Spektren von Proteinen oder Modellpeptiden bekannter Struktur auswerten (s. Abb. 2.1). Zur Bestimmung der absoluten Anteile einzelner Sekundärstrukturelemente ist die CD-Spektroskopie daher nicht besonders gut geeignet. Zur Bestimmung relativer Änderungen der Sekundärstruktur hingegen ist die CD-Spektroskopie sehr gut geeignet.

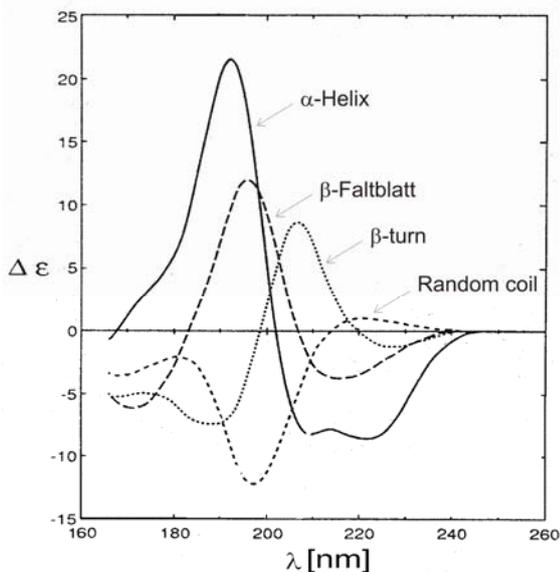


Abb. 2.1: CD-Spektren typischer Sekundärstrukturelemente von Proteinen. Verändert nach Brahms und Brahms (1980).

Die Messung der Spektren erfolgte mit einem Spektralanalysator J715 (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt). Es wurden Mikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm (Helma, Mülheim) verwendet. Diese fassen ein Probenvolumen von 200 µl. Die minimale Proteinkonzentration beträgt 100 ng/µl. Die Spektren wurden von 200 bis 260 nm bei einer Auflösung von 1 nm, einer Responsezeit von 2 s und einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min aufgezeichnet. Dabei wurden je Probe 10 Spektren akkumuliert, gemittelt und gegen das entsprechende Pufferspektrum korrigiert.

2.14 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem EM-Tecnai (G-Serie) Transmissionselektronenmikroskop (TEM) bei einer Beschleunigung von 80 kV durchgeführt.

2.14.1 Präparatherstellung für das TEM

Als Probenträger wurden mit Formvar beschichtete 200-mesh Nickelnetze (Plano, W. Plannet GmbH, Wetzlar) verwendet, auf die zunächst unter Vakuum eine Kohleschicht aufgebracht wurde. Jeweils 5 µl des zu untersuchenden Ansatzes wurden auf ein Nickelnetz gegeben und die Adsorption erfolgte über einen Zeitraum von 30 sek. Da die Atome des Präparates nur geringe Ordnungszahlen aufweisen, kommt es zu keiner hinreichenden Streuung der Elektronenstrahlen. Zur Abbildung macht man sich deshalb das Verfahren der Negativ-Kontrastierung zu Nutzen.

2.14.2 Negativ-Kontrastierung des Präparates

Die Elemente von Kontrastierungsmitteln weisen sehr hohe Ordnungszahlen auf, was zu einer starken Ablenkung der Elektronen führt. Von den verschiedenen Kontrastierungsmitteln, die eingesetzt werden können, ist Ammonium-Molybdat am besten geeignet, um fibrilläre Proteine und Membranen anzufärben. Die Färbung beruht hierbei darauf, dass sich das Salz nicht an die Biomoleküle selber anlagern kann. Es kommt also zu einer Färbung des Hintergrundes, wobei die Bereiche um die Biomoleküle am stärksten angefärbt werden. Aus diesem Grund wird diese Art der Färbung als Negativ-Kontrastierung bezeichnet. Zur Anfärbung der adsorbierten Proteine wurde eine 2,5 %ige (w/v) Ammonium-Molybdat-Lösung verwendet. Die Präparatherstellung sowie die Färbung wurde freundlicherweise von J. Stöhr durchgeführt.

2.15 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Das analytische Konzept der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wurde bereits vor 30 Jahren entwickelt (Ehrenberg & Rigler, 1976). Es basiert auf der Messung von Signalfluktuationen einer kleinen Anzahl von Molekülen in einem kleinen Messvolumen. Doch erst die Einführung der konfokalen Abbildung (Rigler *et al.*, 1993) ermöglichte es, die Fluktuation einzelner Moleküle zu beobachten.

2.15.1 Prinzip der FCS-Messungen

Im Rahmen der meisten FCS-Anwendungen werden Fluktuationen in der lokalen Teilchenkonzentration aufgrund der Brownschen Molekularbewegung genutzt, um die Diffusionsgeschwindigkeit der Teilchen zu bestimmen. Gerade in der Nutzung der Fluktuationen liegt die Stärke der Methode, da relative Fluktuationen der Konzentrationen freier beweglicher Moleküle um so größer sind, je kleiner das betrachtete Volumen und die Konzentration der Partikel ist. Bei einer Konzentration von 1 nM befindet sich in einem Messvolumen von 1 fl, also dem Messvolumen der FCS, im Mittel genau ein Molekül. Die FCS ermöglicht somit theoretisch Untersuchungen an einzelnen Molekülen, in der Praxis werden jedoch viele Moleküle beobachtet um eine statistisch abgesicherte Aussage machen zu können. Um FCS-Messungen durchführen zu können, muss also ein sehr kleines Volumenelement mit möglichst intensivem, monochromatischem Licht ausgeleuchtet werden. Durch den Einsatz von Lasern und dem Prinzip der konfokalen Abbildung ist dieses möglich. In einem Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometer wird ein Laser über einen Farbteiler in die Probe fokussiert. Die Fluorophore, die sich zu diesem Zeitpunkt in dem ausgeleuchteten Volumenelement befinden, werden angeregt. Die Fluoreszenz kann über einen Photomultiplier detektiert werden. Mit Hilfe der konfokalen Abbildungstechnik wird das detektierte Fluoreszenzlicht durch eine Lochblende auf ein kleines Volumen von weniger als einem Femtoliter beschränkt.

Gemessen werden die Signale fluoreszenzmarkierter Moleküle, die sich durch den Fokus bewegen. Die Fluoreszenzintensität im Beobachtungsvolumen wird in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Somit kann die Diffusion der Moleküle in Form von Fluoreszenzfluktuationen beobachtet werden. Aus dem Intensitätssignal lässt sich anhand der Aufenthaltsdauer des Teilchens im Beobachtungsvolumen die Diffusionszeit berechnen und aus der Amplitude die Anzahl der Teilchen bestimmen. Diese Werte werden mit Hilfe der statistischen Methode der Autokorrelation berechnet. Die Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ (Gl. 2.2; Abb. 2.2) gibt die Korrelation eines Signals zum Zeitpunkt t mit einem Signal zum Zeitpunkt $t + \tau$ an. Kleine Werte für τ resultieren hierbei in einer hohen Korrelation, nimmt τ große Werte an, so ist keine Korrelation mehr zu verzeichnen. Für den Sonderfall $\tau = \tau_{\text{Diff}}$ ergibt sich

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \left(\frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_{diff}}} \right) \cdot \sqrt{1 + \frac{\tau}{k^2 \cdot \tau_{diff}}} \quad \text{mit}$$

k = Strukturparameter (Verhältnis von Radius und Höhe des Beobachtungsvolumens)
 N = mittlere Anzahl der Moleküle im Beleuchtungsfokus
 τ = Korrelationszeit
 τ_{diff} = mittlere Diffusionszeit der Moleküle durch den Fokus

Gleichung 2.2: Autokorrelationsfunktion für ein Einkomponentensystem

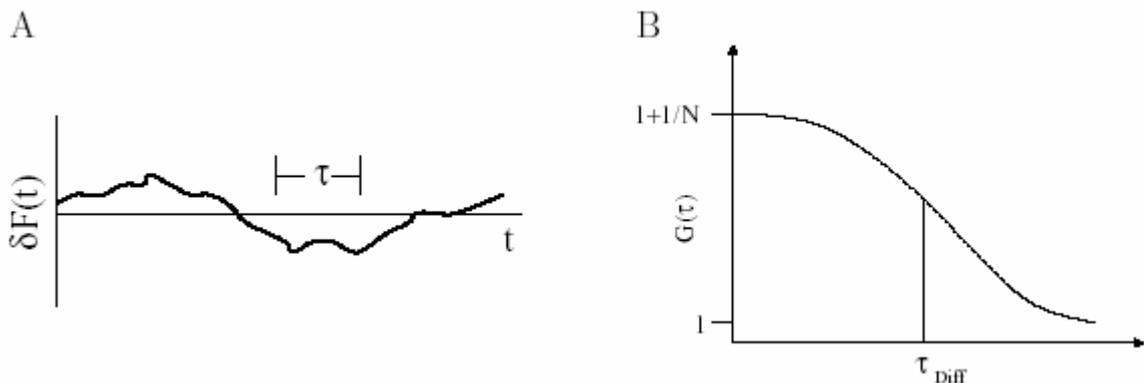


Abb. 2.2: Zeitabhängige Fluoreszenzfluktuation (A) und Korrelationsfunktion (B)

Aus der Fluoreszenzfluktuation $\delta F(t)$ wird mittels der Korrelationsfunktion $G(\tau)$ die mittlere Aufenthaltsdauer τ_{Diff} und die Anzahl N der fluoreszierenden Moleküle im konfokalen Messvolumen berechnet.

mathematisch, dass die Diffusionszeit τ_{Diff} des Teilchens aus der halben Stufenhöhe der Korrelationskurve abgelesen werden kann. Die Höhe der Korrelationskurve ist umgekehrt proportional zur Teilchenzahl. Mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie können so Diffusionszeiten von fluoreszenzmarkierten Molekülen in Lösungen geringer Konzentration bestimmt werden. Basierend auf den gemessenen Diffusionszeiten können Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der Moleküle oder Aggregate gezogen werden. Zwischen Diffusionszeit und Molekulargewicht besteht dabei folgender Zusammenhang: $\tau_{diff} \sim \sqrt[3]{MW}$.

2.15.2 Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (FIDA)

Ein weiterer Parameter, der neben der Diffusionszeit zur Charakterisierung eines Moleküls genutzt werden kann, ist die spezifische Helligkeit des Moleküls, welche mittels der Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (FIDA) ermittelt wird. Eine Analyse der Fluoreszenzintensität wurde 1990 von Qian vorgenommen (Qian, 1990). Als experimentelles Maß der spezifischen Fluoreszenzintensität kann die Zählrate der

Photonen pro Molekül und Sekunde (cpms) angesehen werden. Diese errechnet sich aus der Detektionseffizienz $W(\sim r)$ im dreidimensionalen Raum nach:

$$cpms = \int_{Vol} W(\vec{r}) d\vec{r} \quad \text{Gleichung 2.3}$$

Bei konstanter Anregung ist diese Größe proportional zum Produkt aus Quantenausbeute und Absorptionsquerschnitt des Moleküls (Kask *et al.*, 1999) und ist charakteristisch für das Molekül. Experimentell wird sie als Produkt der Korrelationsamplitude und der Fluoreszenzintensität bestimmt. Anhand der cpms lassen sich fluoreszierende Moleküle aufgrund ihrer relativen Helligkeit charakterisieren. Im Falle einer Aggregation bzw. bei der Bindung fluoreszierender Moleküle an vorhandene Aggregate steigt die relative Helligkeit der Moleküle. Vernachlässigt man das Quenching der fluoreszierenden Moleküle und deren Verdeckungseffekt im wachsenden Aggregat, so ist die Steigerung der relativen Helligkeit proportional zur Zahl der gebundenen Fluorophore. Dies kann aber in der Praxis nur zu einer groben Abschätzung genutzt werden. Wenn, wie in der vorliegenden Arbeit, keine genaue Charakterisierung der Intensitätsverteilung gefordert wird, sondern lediglich intensiv fluoreszierende Komponenten über einem Schwellenwert detektiert werden sollen, lässt sich die Verteilung der detektierten Photonen pro Messintegral als Histogramm darstellen (s. Abb. 2.3; Kap. 2.15.6).

2.15.3 FIDA-Scanning

Die Durchtrittszeit großer Moleküle durch das konfokale Volumenelement kann durch „Scannen“ der Messlösung stark verkürzt werden. Damit lässt sich bei geringer Konzentration die Rate der Moleküldurchtritte erheblich steigern. Auf diese Weise wird die Messzeit, die man zur Detektion einzelner Teilchen benötigt, verkürzt (Petersen, 1986). Dass dies gerade bei der Suche nach Aggregaten erfolgreich eingesetzt werden kann, konnte schon von Schäfer (2002) und Bieschke (2000) gezeigt werden. Dabei wird eine theoretische Sensitivitätssteigerung mittels „Scannen“ um das sechsfache für freie Diffusionsbewegungen berechnet. Der Gewinn an Sensitivität durch „Scannen“ der Probe steigt proportional zur Diffusionszeit der Partikel. Da die Aggregate aber wahrscheinlich durch Adsorptions- und Sedimentationseffekte in ihrer Diffusion behindert werden, kann der experimentell ermittelte Zuwachs an Sensitivität deutlich größer sein. Eine Bestimmung von Diffusionszeiten ist unter diesen Bedingungen allerdings nicht mehr möglich.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten FCS Olympus 2 Strahl (Evotec, Hamburg) ist ein Beamscanner implementiert, der es zulässt, eine mäanderförmige Bewegung des Volumenelements durch die Probe zu vollziehen.

2.15.4 Zweifarbenanalysen

Bei der Zweifarbenanalyse (Schwille *et al.*, 1997) wird die Fluktuation zweier Fluorophore untersucht, deren Emissionsspektren möglichst wenig überlappen. Wenn zwei Molekülspezies mit je einem dieser Fluorophore aneinander oder an einen gemeinsamen Interaktionspartner binden, entsteht eine Molekülspezies, die beide Fluorophore trägt. Bei der Zweifarbenanalyse kann diese Spezies einzeln ausgewertet werden. Auch FIDA-Messungen sind mit einer Zweifarbenanalyse möglich. Dabei sind alle Molekülspezies, beide Monomere und das Heterodimer klar voneinander unterscheidbar. Im Falle eines Aggregationsprozesses könnten Aggregationen einer einzelnen Molekülspezies weiterhin getrennt betrachtet werden.

2.15.5 Durchführung der FCS-Messungen

Die FIDA-Messungen wurden am Olympus 2-Strahl FCS der Fa. Evotec durchgeführt. Nach einer Messung werden die Fluoreszenzfluktuationen automatisch in Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungen umgerechnet und stehen nur in diesem Format zur Verfügung. Die zeitlich aufgelösten Fluoreszenzfluktuationen stehen mit der Standard-Apparatur somit nicht mehr zur Verfügung. Um auf diese für die Interpretation der Daten jedoch relevante Information zugreifen zu können, wurden die Daten durch eine Rohdatenerfassungskarte (Evotec) geleitet, um eine Speicherung der Fluoreszenzfluktuationsdaten zu ermöglichen.

Als Probengefäße wurden Assay-Chips mit 24 Messwells (Evotec, Hamburg) verwendet. Standardmäßig wurden die FIDA-Messungen für 30 s, mit einer Integrationszeit von 50 μ s und den Beamscoreinstellungen (50 Hz mit einer Amplitude von 100 μ m und einer Tischbewegung von 1 mm), durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität wird vom Gerät in kHz ausgegeben.

2.15.6 Auswertung der FCS-Daten

Die Auswertung der FIDA-Messungen wurde nach Birkmann (2005) durchgeführt. Hierbei wurde keine genaue Charakterisierung der Intensitätsverteilung der FIDA-Daten benötigt, da nur die Fluoreszenzintensitäten über einem Schwellenwert quantifiziert wurden. Daraus resultierte eine Auswertung, die die auftretenden Fluoreszenzsignale quantifiziert. Wie in Abb. 2.3 A zu sehen, wurden die mittels FCS detektierten Fluoreszenzfluktuationen in Abhängigkeit von der Zeit (hier: 30 s) ausgegeben. Die Fluoreszenzfluktuationen wurden durch Scannen der Probe detektiert.

Um das durch monomere fluoreszierende Sonden verursachte Hintergrundsignal von aggregatspezifischen Signalen zu trennen, wird die Verteilung der Fluoreszenzintensitätshäufigkeiten (Abb. 2.3 B) benötigt. In diesen Histogrammen ist die

Häufigkeit der Ereignisse gegen die relative Fluoreszenzintensität aufgetragen. Hier wird mittels der Methode der kleinsten Quadrate nach Gauß eine Ausgleichsgerade durch die Messwerte um den Wendepunkt der Verteilung nach dem Maximum berechnet. Am Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse wird ein "cut off" gesetzt. Signale unter diesem Schwellenwert werden von den monomeren Sonden

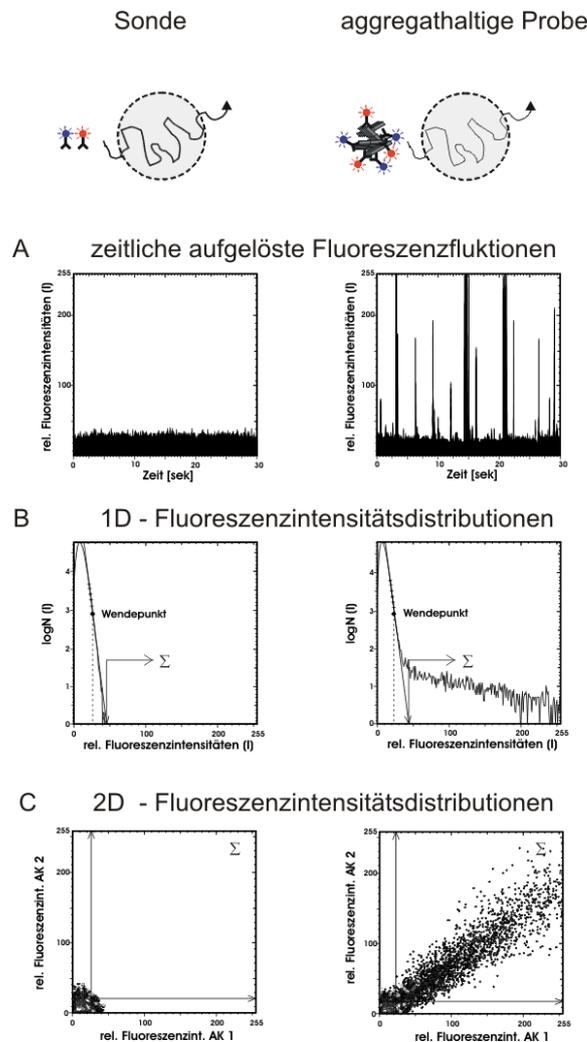


Abb. 2.3: Prinzip des Nachweises von Aggregaten mittels FIDA und Auswertung der 1D- und 2D-FIDA-Daten

Bei der Messung fluoreszmarkierter Sonden treten nur geringe Fluoreszenzintensitäten auf. Die spezifische Bindung der Sonden an Aggregate führt zu hohen Intensitäten in der Fluoreszenzfluktuation, die als Peaks auftreten (A). Werden die Häufigkeiten dieser Intensitäten ($\log N$) als Histogramm dargestellt (B), können Hintergrundsignale der monomeren Sonden von höheren Signalen, hervorgerufen durch die Aggregate, getrennt werden. Mit Hilfe der Methode der kleinsten Quadrate nach Gauß wird eine Ausgleichsgerade durch die Messwerte um den Wendepunkt berechnet. Der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse wird als "cut off" definiert und alle Werte darüber werden summiert. Die Summe wird als quantitative Größe zur Beschreibung der Aggregatanzahl herangezogen. Bei 2D-FIDA-Messungen werden nur Signale detektiert, wenn zwei, mit unterschiedlichen Farbstoffen markierte Sonden, gleichzeitig an ein Molekül binden. Wieder gehen nur Werte über berechneten Schwellenwerten in die Auswertung ein und werden summiert (C).

verursacht, Signale mit einer Intensität oberhalb des „cut off“ sind auf hochfluoreszente Aggregate zurückzuführen und gehen in die Auswertung ein. Bei der 2D-FIDA werden zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Sonden in einer Messung eingesetzt. Nur wenn beide Sonden gleichzeitig an ein Molekül binden, werden die Signale detektiert. Diese können in der 2D-Fluoreszenz-Intensitäts-Distributionen (Abb. 2.3 C) zusammengefasst werden. Hier sind die Fluoreszenz-intensitäten der beiden Sonden gegeneinander aufgetragen. Die Häufigkeit der Ereignisse ist in der z-Achse codiert. In die Auswertung gehen hier nur Signale ein, die oberhalb beider Schwellenwerte liegen. Die Häufigkeiten der Intensitäten über den Schwellenwerten werden für die Auswertung aufsummiert. In dieser Arbeit wurde der „cut off“ für jede Messung neu berechnet. Freundlicherweise wurden von A. Wilm (Arbeitsgruppe Bioinformatik, Institut für Physikalische Biologie, Heinrich Heine-Universität, Düsseldorf) Programme zur automatisierten Auswertung der FIDA-Daten entwickelt, welche unter Linux als Tcl-Skripte arbeiten.

2.16 ThioflavinT-Test

Thioflavin T (ThT) (Abb. 2.4 A) ist ein ursprünglich in der Histologie genutzter Thiazolfarbstoff. Zu den färbbaren Strukturen gehören Mucopolysaccharide, Nukleinsäuren und insbesondere eine Reihe von Einschluss-Strukturen amyloider Fibrillen. ThT weist dabei durch die Bindung an amyloide Proteinstrukturen charakteristische Änderungen seines Fluoreszenzspektrums auf. Diese zeigen sich durch batho- und hyperchrome Verschiebungen der Fluoreszenz des ThT/Amyloid-Komplexes gegenüber dem freien Farbstoff (Abb. 2.4 D,E) (LeVine, 1993).

Die Interaktion zwischen ThT und Fibrillen basiert auf den β -Faltblatt Strukturen der Fibrillen (Krebs *et al.*, 2005). Durch die Aneinanderlagerung mehrerer β -Faltblätter in Fibrillen (cross- β -Struktur) bilden die β -Faltblatt-Seitenketten Kanäle die rechtwinklig zum Rückgrat der Faltblätter stehen (Pauling & Corey, 1998; Salemme, 1983). Nach dem Modell von Krebs *et al.* könnte ThT im rechten Winkel zur β -Faltblattachse in diese Kanäle binden (Abb. 2.4 B, C). ThT wäre dann von den Seitenketten des β -Faltblatts umgeben, wodurch es zur Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten und dem ThT Molekül kommt. Diese spezifische Interaktion erlaubt es Thioflavin T zur Identifizierung von Fibrillen zu nutzen (LeVine, 1993; Naiki *et al.*, 1989). Da alle β -Faltblätter Kanäle enthalten, in denen sich ThT einlagern kann, könnten auch sie zu ThT-positiven Fluoreszenzsignalen führen. Nicht in fibrillären Strukturen vorkommende β -Faltblatt Strukturen besitzen allerdings nicht die geordnete Wiederholung der Reste wie dies bei Fibrillen der Fall ist (Krebs *et al.*, 2005). Auch die Anzahl der β -Stränge ist hier kleiner. Aus diesem Grund führt die Beimischung von

ThT zu einem nativen β -faltblattreichen Protein lediglich zu einer leicht erhöhten Fluoreszenz (LeVine, 1999).

Die Messungen wurden in einem Fluoreszenzreader Safire²™ (Tecan Trading AG, Schweiz) unter Verwendung von 96-well-Platten (Nunc GmbH, Wiesbaden) durchgeführt. Bei allen Messungen wurden Emissionsspektren mit einer Auflösung von 2 nm bei einer Excitationswellenlänge von 445 nm und einer Spaltweite von 2,5 nm aufgenommen. Die weiteren Geräteeinstellungen sind für jede Messung angegeben. Die Messungen wurden bei 37°C durchgeführt, vor jeder Messung wurde der Probenträger für 30 s linear bei mittlerer Intensität geschüttelt. Zur Auswertung wurde für jede Messung der Mittelwert der gemessenen Intensitäten um das Fluoreszenzmaximum (495-505 nm) gebildet.

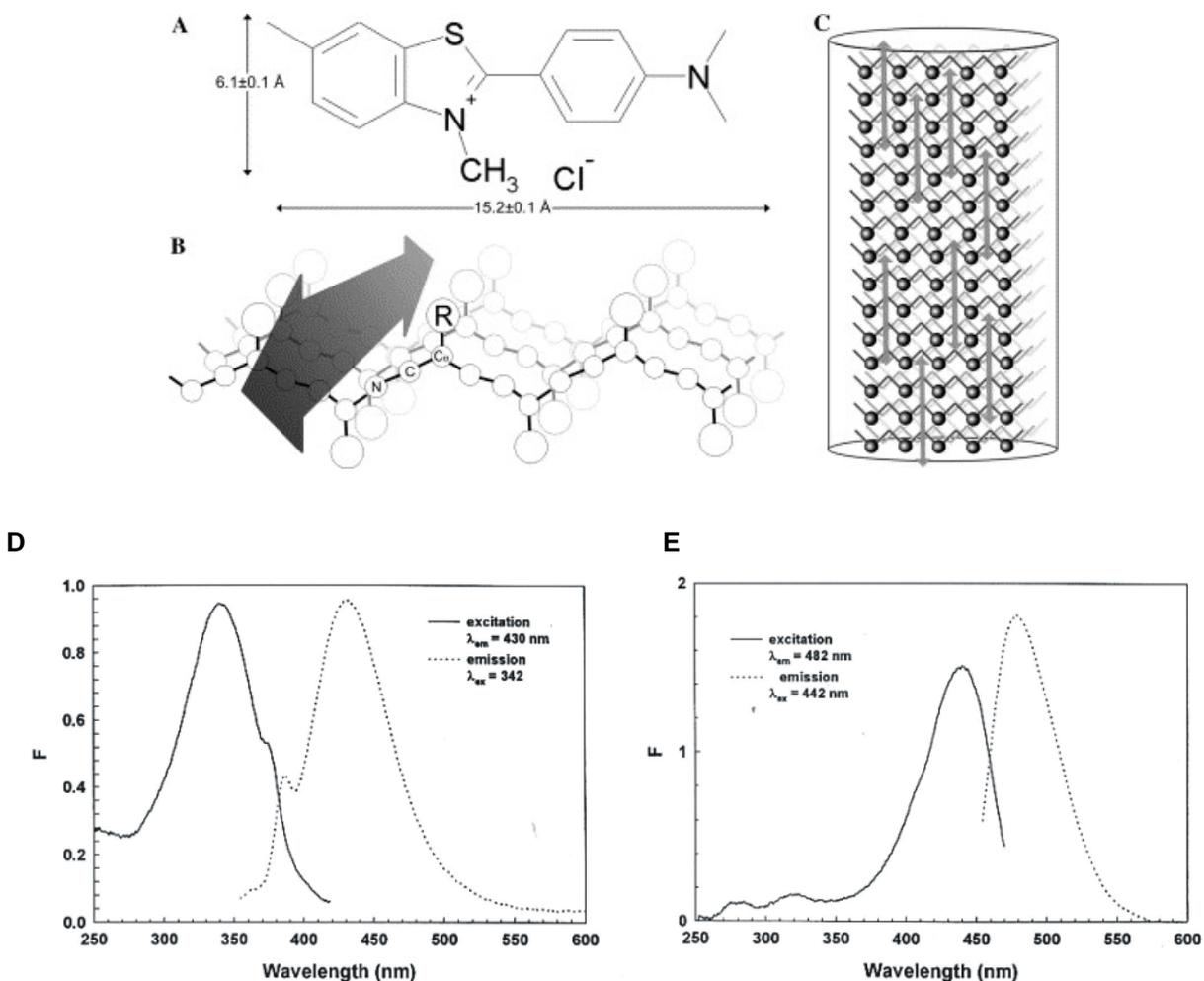


Abb. 2.4: Thioflavin T

Struktur von Thioflavin T (**A**) Orientierung eines ThT-Moleküls in der β -Faltblattstruktur eines Proteins (**B**) und Ausrichtung in einer amyloiden Fibrille (**C**), dargestellt durch graue Pfeile (A-C nach Krebs et al., 2005). Fluoreszenzspektren von freiem ThT (**D**) und ThT/Fibrillen-Komplex (**E**).

3. Ergebnisse

Für die Entwicklung eines *in vitro*-Systems zur Vermehrung von PrP^{Sc}, basierend auf dem von Eigen vorgeschlagenen Modell (s. Kap. 1.9), muss zunächst die Anlagerung von PrP^C an vorhandenes PrP^{Sc} etabliert werden. Der Anlagerung von PrP^C an PrP^{Sc} folgt nach diesem Modell die Konversion von PrP^C in die pathogene Form. Diese Konversion beinhaltet eine Änderung verschiedener struktureller, sowie physikalisch-chemischer Eigenschaften. So ist PrP^{Sc} im Gegensatz zu PrP^C unlöslich und teilweise PK-resistent. Außerdem besitzt PrP^{Sc} einen höheren β -Faltblattanteil und bildet große Aggregate mit fibrillären Strukturen aus (vgl. Kap. 1.5). Folglich kann die Konversion von PrP^C in Anwesenheit von PrP^{Sc} anhand der Veränderung der gerade beschriebenen Eigenschaften nachgewiesen werden. Diese Eigenschaften können mittels differentieller Ultrazentrifugation, Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), Circular Dichroismus- (CD-) Spektroskopie oder ThioflavinT- (ThT-) Test erfasst werden.

Für Untersuchungen zur Aggregationsinduktion von monomerem PrP durch PrP, das bereits in aggregierter Form vorliegt, stehen sowohl auf Seiten der Monomere als auch auf Seiten der Keime verschiedene Formen von PrP zur Auswahl. Der Ausdruck „Monomer“ definiert im Folgenden den löslichen Charakter der Proteine, die unter den jeweils gewählten Bedingungen auch als Oligomere vorliegen können, aber in diesem Zustand immer noch löslich sind. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die unterschiedlichen Prionproteine, die als Keim oder Monomer eingesetzt werden können. Da es sich zunächst um eine Modellstudie handelt, ist prinzipiell jede Kombination von Keim und Monomer möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle aufgeführten Keime auf ihre Fähigkeit hin untersucht, für Monomere als Aggregationskeim zu wirken, und für jeden Keim wurden die Untersuchungen mit verschiedenen Monomeren durchgeführt. Sowohl natürliche Prionen als auch rekombinantes PrP (rek PrP) waren hierbei aus dem Hamstersystem.

Tab. 3.1: Prionproteine, die als Monomer bzw. Keim eingesetzt werden können

Monomer	Keim
rek PrP (90-231) rek PrP (29-231) CHO-PrP ^C	synthetische Keime (rek PrP) PrP (27-30) PrP ^{Sc}

Zunächst wurden als Modellsystem synthetische Keime, aus rek PrP bestehend, verwendet. Im späteren Verlauf dieser Arbeit wurden die natürlich vorkommenden Keime, PrP (27-30) und PrP^{Sc} in das *in vitro*-System eingesetzt. Die ersten Untersuchungen zur Anlagerung von monomerem PrP an vorhandene Keime wurden mittels Löslichkeitsanalyse und Fluoreszenz-Korrelation-Spektroskopie (FCS) durchgeführt. Mit diesen Methoden wird der Aggregationszustand der Proteine analysiert. Erst im Verlauf dieser Arbeit stellte sich heraus, dass das entscheidende Kriterium eines funktionierenden *in vitro*-Systems zur Vermehrung der eingesetzten Keime, eine mit der Aggregation einhergehende Ausbildung fibrillärer Strukturen ist.

3.1. Induktion der Aggregation von PrP durch spezifische Keime

Für Untersuchungen zur keiminduzierten Aggregation ist es wichtig, Bedingungen zu wählen, unter denen keine, zumindest keine messbare, spontane Aggregation von monomerem PrP stattfindet oder zumindest erst zeitlich stark versetzt einsetzt, aber dennoch eine Aggregation in Anwesenheit spezifischer Keime auftritt. Es ist somit notwendig, spontane von keiminduzierter Aggregation unterscheiden zu können. Hierfür wurde zunächst das Löslichkeitsverhalten mittels differentieller Ultrazentrifugation, sowie die Ausbildung von Aggregaten mittels FCS untersucht.

3.1.1. Keiminduzierte Aggregation mit synthetischen Keimen als Modellsystem

Zunächst wurden als Modellsystem synthetische Keime aus rek PrP (29-231) gewählt, da dieses in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Anhand dieses Modellsystems sollten die Bedingungen für eine keiminduzierte Aggregation optimiert und später auf die Verwendung von natürlichen Keimen (PrP^{Sc}, PrP (27-30)) übertragen werden. Die synthetischen Keime wurden mit dem in Kapitel 1.7 beschriebenen Konversionssystem durch Inkubation (16 h) von rek PrP (29-231) in 0,002 % SDS hergestellt. Unter diesen Bedingungen bildet das Material unlösliche, amorphe Aggregate aus. Als Monomer wurde rek PrP (90-231) eingesetzt, da es in Anwesenheit von SDS etwas löslicher ist als rek PrP (29-231), wie in Abbildung 3.1 dargestellt. Beide rek PrP-Formen wurden in 0,2 % SDS für 16 h vorinkubiert und im Anschluss auf die jeweilige SDS-Konzentration eingestellt und für weitere 24 h inkubiert. Danach wurde eine differentielle Ultrazentrifugation (1 h bei 100.000 x g) durchgeführt und die Proben in Überstand (Ü) als lösliche und Pellet (P) als unlösliche Fraktion getrennt. Rek PrP (29-231) beginnt bereits bei 0,03 % SDS zu aggregieren, hier ist ein schwaches Signal im Pellet zu erkennen, und befindet sich bei 0,02 % SDS bereits zu 50 % im Pellet. Bei rek PrP (90-231) hingegen ist bei 0,02 % SDS ein

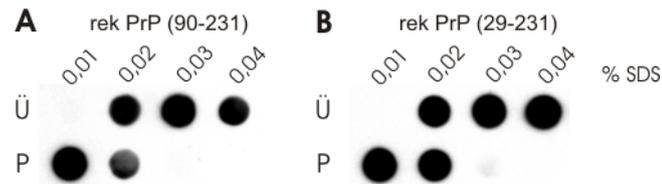


Abb. 3.1: Löslichkeitsverhalten von rek PrP (90-231) und rek PrP (29-231)

A rek PrP (90-231)

B rek PrP (29-231)

PrP wurde in 10 mM NaPi pH 7,2 mit 0,2 % SDS vorinkubiert (16 h) und dann auf die entsprechenden SDS-Konzentrationen (0,01-0,04 %) eingestellt und weitere 24 h inkubiert. Die Proteinkonzentration betrug in allen Proben 20 ng/µl. Nach differentieller Ultrazentrifugation (1 h bei 100.000 x g) wurden die Proben in Überstand (Ü) als lösliche und Pellet (P) als unlösliche Fraktion getrennt. Die Analyse erfolgte mittels Dot Blot (Detektionsantikörper: 3F4).

deutlich schwächeres Signal im Pellet zu detektieren. Durch die Vorinkubation von rek PrP (29-231) in 0,002 % SDS zur Herstellung der Aggregate, ist die Löslichkeitsgrenze bei erneuter Zugabe von SDS zu höheren SDS-Konzentrationen hin verschoben, d.h. die vorgebildeten Aggregate lösen sich erst bei höheren SDS-Konzentrationen wieder auf (Daten nicht gezeigt).

Die ersten Untersuchungen zur Unterscheidung von keiminduzierter und spontaner Aggregation wurden in Anlehnung an das von Post *et al.* (1998) entwickelte Konversionssystem (vgl. Kap. 1.7) in NaPi bei 0,03 % und 0,04 % SDS durchgeführt. Unter diesen Bedingungen sollte das Monomer (rek PrP (90-231)) nicht spontan aggregieren und die in 0,002 % SDS vorgebildeten Keime aus rek PrP (29-231) sich nicht auflösen. In diesem Experiment wurden zwei verschiedene Keimkonzentrationen eingesetzt. Die Konzentration der Monomere wurde nicht variiert. Somit ergaben sich Verhältnisse von Monomer zu Keim, bezüglich der eingesetzten Proteinkonzentrationen, von 10:1 bzw. 50:1. Dies bedeutet, dass 15 bzw. 75 Moleküle rek PrP (90-231) auf ein Molekül rek PrP (29-231) kommen, wobei die Frage offen bleibt, wie viele Moleküle rek PrP (29-231) ein Aggregat bilden. In Abbildung 3.2 ist eine Westernblot-Analyse dieses Experiments nach differentieller Ultrazentrifugation gezeigt. Durch die Wahl zweier Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten sind Keim (23 kDa) und Monomer (16 kDa) in der Gelelektrophorese unterscheidbar.

In Abbildung 3.2 A ist zu erkennen, dass rek PrP (90-231) ohne Keimzugabe in 0,03 % SDS wie erwartet vollständig löslich ist. Weiterhin ist unter diesen Bedingungen durch die Zugabe von spezifischen Keimen eine Aggregation des Monomers zu erkennen, d.h. in diesen Proben findet sich rek PrP (90-231) z.T. im Pellet wieder. Erstaunlicherweise ist dieser Effekt bei geringerer Keimkonzentration sogar ausgeprägter. Bei 0,04 % SDS (Abb. 3.2 B) ist der Anlagerungseffekt

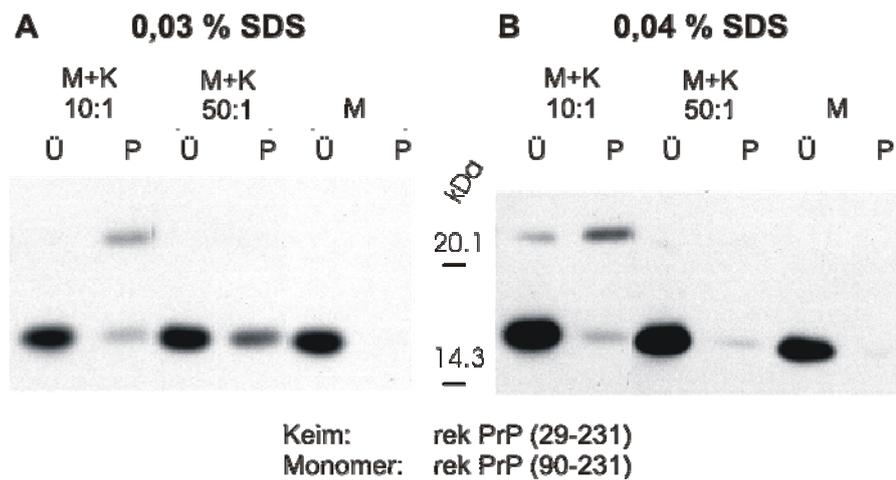


Abb. 3.2: Keiminduzierte Aggregation mit synthetischen Keimen

Rek PrP (90-231) wurde in 0,2 % SDS, rek PrP (29-231) zur Ausbildung von Aggregaten in 0,002 % SDS vorinkubiert (16 h). 50 ng/µl rek PrP (90-231) als Monomer (M) wurden entweder mit 5 ng/µl bzw. 1 ng/µl rek PrP (29-231) als Keim (K) oder ohne Zugabe von Keim 20 h bei 37°C in **A** 0,03 % SDS oder **B** 0,04 % SDS in 10 mM NaPi pH 7,2 inkubiert. Nach differentieller Ultrazentrifugation (1 h bei 100.000 x g) wurden die Proben in Überstand (Ü) und Pellet (P) getrennt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot (Detektionsantikörper: 3F4).

vergleichbar, jedoch bei einem Keim/Monomerverhältnis von 1:50 deutlich geringer als bei 0,03 % SDS. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Keime aus rek PrP (29-231), die nur in der höheren eingesetzten Konzentration zu detektieren sind, bei der höheren SDS-Konzentration beginnen sich aufzulösen. Für diese Kombination von Keim und Monomer scheint folglich eine SDS-Konzentration von 0,03 % besser geeignet zu sein.

Aus diesem Grund wurden bei 0,03 % SDS 1D-Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analysen (FIDA) mittels FCS durchgeführt (s. Kap. 2.15). Während mittels differentieller Ultrazentrifugation zwischen löslichem und unlöslichem Zustand unterschieden wird, werden mittels FCS einzelne Aggregate detektiert. Da sich an große Aggregate mehrere Sonden anlagern können, sind diese stärker fluoreszenzmarkiert als die Monomere. Gelangen diese Aggregate in den Fokus, so resultiert ein Fluoreszenzsignal höherer Intensität als bei nur einfach markierten Monomeren. Liegt dieses Signal über einem bestimmten Schwellenwert (vgl. Kap. 2.15.6), so geht es in die Auswertung ein. Sehr große Aggregate können sich hierbei, auf Grund der längeren Diffusionszeit, länger im Fokus aufhalten und somit mehrfach angeregt werden. Dies führt dazu, dass von großen Aggregaten mehrere Signale oberhalb des „cut off“ verzeichnet werden können. Material, welches sich nach differentieller Ultrazentrifugation im Überstand befindet, sollte bei dieser Messmethode kein Signal auslösen. Es sollte die Unterscheidbarkeit von spontaner und keiminduzierter Aggregation auf Grundlage der Aggregatbildung analysiert werden. Idealerweise sollte die keiminduzierte Aggregation innerhalb von wenigen

Minuten ablaufen, die spontane Aggregation hingegen erst im Stundenbereich stattfinden (Pitschke, 1999). Weiterhin war zu überprüfen, ob durch die Zugabe von Monomeren zu Keimen mehr Aggregate als in der Keimkontrolle detektiert werden. Als Sonde für die Messungen diente fluoreszenzmarkiertes rek PrP (90-231) (Alexa 633), welches zusätzlich in allen Proben vorhanden war. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die Probe mit rek PrP (29-231) als Keim und einem Überschuss an unmarkiertem rek PrP (90-231) als Monomer das höchste Signal liefert. Aber auch die Monomerkontrolle zeigt ein deutliches Signal. Es muss demnach eine spontane Aggregation des rek PrP (90-231) stattgefunden haben, die im Westernblot nicht zu detektieren war. Der Unterschied zwischen diesen beiden Proben entspricht in etwa dem Signal, welches für den Keim durch Anlagerung von fluoreszenzmarkiertem rek PrP detektiert wurde. Es scheint demnach keine zusätzliche Anlagerung von rek PrP (90-231) an die Keime stattgefunden zu haben. Dies spricht für die Wahl einer zu hohen SDS-Konzentration, bei der die Anlagerung von unmarkierten Monomeren an die Keime unterdrückt wird. Bei einer weiteren Erniedrigung der SDS-Konzentration, würde das rek PrP (90-231), wie bereits erwähnt, allerdings noch stärker spontan aggregieren (vgl. Abb. 3.1). Warum die mittels differentieller Ultrazentrifugation nachgewiesene Aggregation von rek PrP (90-231) in Anwesenheit der Keime in den FCS-Messungen nicht bestätigt

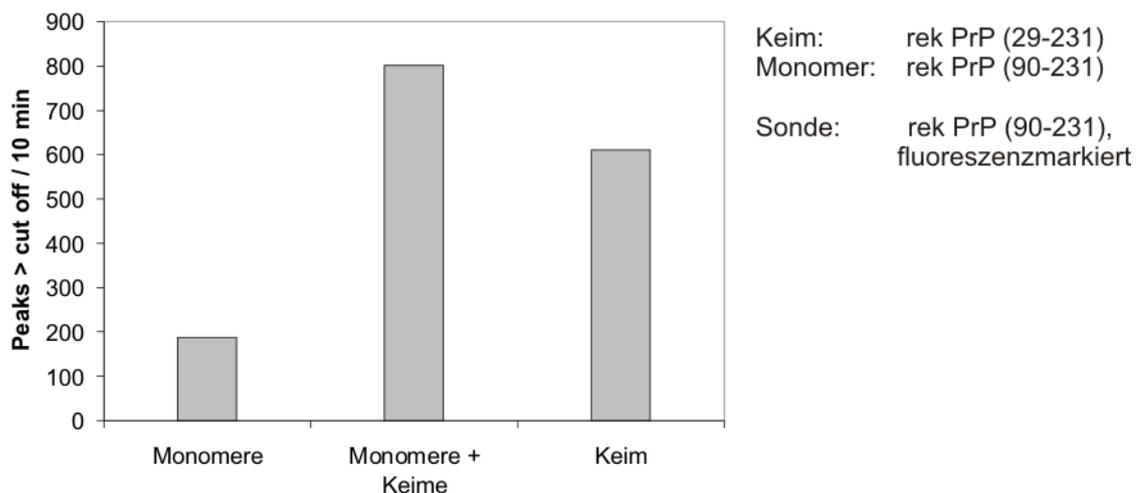


Abb. 3.3: 1D-FIDA-Analysen der keiminduzierten Aggregation mit synthetischen Keimen bei 0,03 % SDS

Rek PrP (90-231) wurde in 0,2 % SDS, rek PrP (29-231) zur Ausbildung von Aggregaten in 0,002 % SDS vorinkubiert. Sowohl rek PrP (90-231) als Monomer als auch rek PrP (29-231) als Keim wurden in einer Konzentration von 10 ng/µl in 10 mM NaPi pH 7,2 mit 0,03 % SDS eingesetzt. Die Ansätze wurden direkt nach dem Zusammengeben gemessen. Allen Ansätzen wurde als Fluoreszenzsonde Alexa-633 markiertes rek PrP (90-231) in einer Verdünnung zugegeben, die im Messansatz eine Countrate von 30 kHz erreicht. Gemessen wurden die Ansätze jeweils zehnmals für 60 s. Alle Fluoreszenzsignale über einem bestimmten Grenzwert wurden aufsummiert.

werden konnte, konnte nicht abschließend geklärt werden. Mit der gewählten Keim/Monomerkombination gelang es nicht eine SDS-Konzentration zu finden, bei der sich die vorgebildeten Keime nicht auflösen und die Monomere nicht spontan aggregieren, sich aber dennoch an die Keime anlagern.

Aufgrund dieser Ergebnisse war es nahe liegend, sich von den synthetisch hergestellten Keimen für weitere Untersuchungen abzuwenden. Erstens, da die Variationsbreite der Pufferbedingungen durch ein mögliches Auflösen der Aggregate stark beschränkt ist. Der zweite Aspekt ist die Intention, ein für diagnostische Zwecke anwendbares System zu etablieren. Dieses sollte selbstverständlich auf die Detektion von natürlich vorkommenden Keimen optimiert sein. Aus diesem Grunde wurden die folgenden Experimente mit verschiedenen natürlichen Keimen durchgeführt.

3.1.2. Keiminduzierte Aggregation mit natürlichen Keimen

An natürlichen Keimen stehen zwei verschiedene Spezies zur Verfügung: PrP^{Sc}, welches der vollen Länge entspricht und die durch Proteinase K (PK)-Verdauung N-terminal verkürzte Form PrP (27-30). Beide Formen sind infektiös. Die verschiedenen Protokolle zur Aufreinigung von natürlichen Keimen wurden ausführlich in Kapitel 2.4.3 dargestellt. Zur Präparation von PrP (27-30) standen zwei verschiedene Aufreinigungsprotokolle zur Verfügung. Diese machen sich die PK-Resistenz von infektiösem PrP zunutze und beinhalten eine Verdauung mit PK in Anwesenheit von Sarcosyl. PrP^{Sc} hingegen kann aus Hirnhomogenat Scrapie-infizierter Tiere mittels Wolframat- (NaPTA-) Fällung selektiv aufgereinigt und von PrP^C getrennt werden. Deshalb kann bei dieser Präparation auf einen Aufreinigungsschritt mit PK verzichtet werden. Das ursprüngliche Protokoll der Fällung wurde in unserem Institut für unsere Anwendungen optimiert.

Bei der Verwendung von natürlichen Keimen ist eine bloße Unterscheidung zwischen spontaner und keiminduzierter Aggregation nicht mehr ausreichend. Einen wichtigen Aspekt dieser Arbeit stellt die Etablierung eines auch in der Diagnostik anwendbaren Systems dar. Folglich sollte Probenmaterial von gesunden Tieren mit diesem System deutlich von Probenmaterial von Scrapie-infizierten Tieren unterschieden werden können. Um also zu gewährleisten, dass tatsächlich eine keimspezifische Aggregation stattgefunden hat, sind zusätzliche Kontrollansätze notwendig. Hierfür wurde Hirnhomogenat von gesunden Tieren stets der gleichen Aufreinigungsmethode unterzogen wie die verwendeten Keime. Dieses Material wird im Folgenden kurz als Negativkontrolle bezeichnet.

3.1.2.1. Ergebnisse mit PrP (27-30) als Keim

Zunächst wurde PK-verdautes PrP (27-30) als Keim für weitere Experimente eingesetzt und auf seine Eigenschaft, als Aggregationskeim für verschiedene PrP-Monomere zu wirken, untersucht. Grundsätzlich kann an dieser Stelle vorweggenommen werden, dass sich die aus den verschiedenen Aufreinigungsmethoden resultierenden PrP (27-30)-Präparationen bei den folgenden Untersuchungen in ihren Eigenschaften nicht unterscheiden. Daher werden sie im Folgenden nicht getrennt voneinander betrachtet. Für die Anlagerungsversuche mit diesen Keimen wurde als Monomer sowohl rek PrP (90-231) als auch rek PrP (29-231) verwendet. Da aber auch hier keine unterschiedlichen Ergebnisse erzielt wurden, werden in diesem Abschnitt nur Experimente mit rek PrP (90-231) als Monomer gezeigt.

Zunächst wurde bei verschiedenen SDS-Konzentrationen untersucht, ob ein Übergang der Monomere vom löslichen zum unlöslichen Zustand stattfindet, was eine Anlagerung der Monomere an die Keime bedeuten würde. Eine Dot Blot-Analyse eines Experiments bei 0,03 % SDS ist in Abbildung 3.4 A dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass rek PrP (90-231) sich ohne Keim vollständig im Überstand befindet. Durch die Zugabe von PrP (27-30) als Keim dagegen ist im Überstand kein Signal mehr zu detektieren. Zunächst wurde dieses Ergebnis als eine vollständige Aggregation des rek PrP (90-231) in Anwesenheit von PrP (27-30) gedeutet. Bei näherer Betrachtung wird allerdings deutlich, dass dies nicht der Fall war. Abb. 3.4 B zeigt, dass es durch die Zugabe von Keimen zu monomerem PrP (K+M) zu einem deutlichen Materialverlust kommt. Je weniger Keim eingesetzt wurde (K (1/100), K (1/10000)), desto mehr rek PrP (90-231) wurde im Überstand detektiert. Dieses Ergebnis lässt sich durch eine Proteinase K-Restaktivität im PrP (27-30) erklären. Rek PrP (90-231) wird demnach während der Inkubation mit PrP (27-30) verdaut. Eindeutig für diese Vermutung spricht auch die Negativkontrolle (N+M). Auch hier ist nur noch ein sehr schwaches Signal der Monomere im Überstand zu erkennen. Auf Grund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass auch in dem in Abbildung 3.4 A gezeigten Versuch keine keiminduzierte Aggregation stattgefunden hat, sondern rek PrP (90-231) lediglich durch PK verdaut worden ist.

Im Folgenden wurden verschiedene Versuche unternommen, die im PrP (27-30) vorhandene PK zu inaktivieren. Eine häufig verwendete Substanz zur Inaktivierung von PK ist Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF). In Abbildung 3.4 C ist ein Experiment mit PMSF zur Inaktivierung der PK dargestellt. PrP (27-30) wurde vor der Zugabe von rek PrP (90-231) für 2 h bei 50°C mit PMSF inkubiert. In dieser Probe wurde ein etwa gleich starkes Signal im Überstand detektiert wie in der Probe mit Monomer ohne

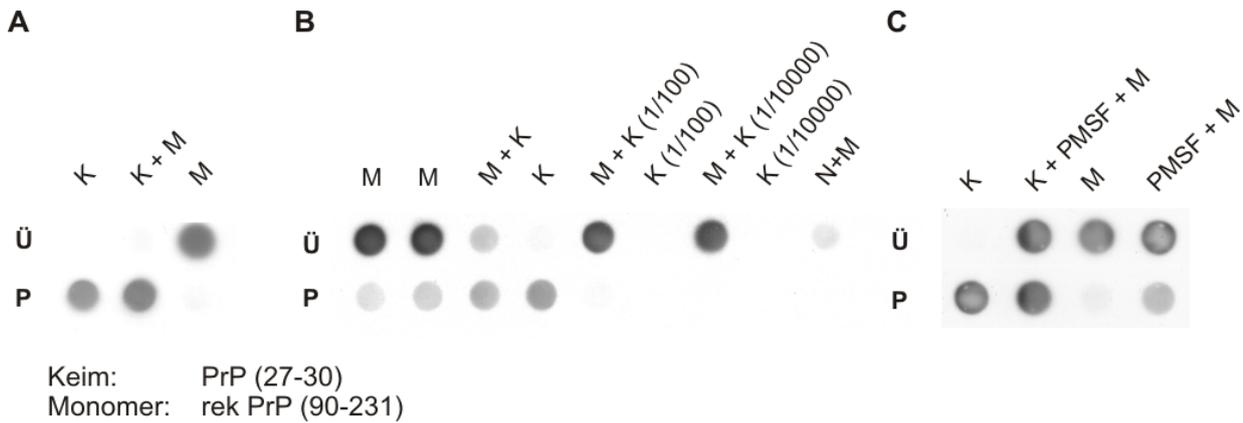


Abb. 3.4: Keiminduzierte Aggregation von rek PrP (90-231) durch PrP (27-30)

Alle drei Abbildungen zeigen einen Dot Blot (Detektionsantikörper: 3F4) nach differentieller Ultrazentrifugation: Im Anschluss an die jeweilige Inkubation wurden die Proben bei 100.000 x g für 1 h zentrifugiert und in Überstand (Ü) und Pellet (P) getrennt. Alle Experimente wurden in 10 mM NaPi pH 7,2 mit 0,03 % SDS durchgeführt. Als Monomer (M) wurde rek PrP (90-231) in 0,2 % SDS vorinkubiert und lag in den Ansätzen in einer Konzentration von 10 ng/µl vor. Als Keim (K) wurde in allen Ansätzen PrP (27-30) verwendet.

A PrP (27-30) wurde in einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-4}$ Hirnäquivalenten (HÄ)/µl (K) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C.

B PrP (27-30) wurde in verschiedenen Konzentrationen (K: $2,5 \times 10^{-4}$ HÄ/µl; K (1/100): $2,5 \times 10^{-6}$ HÄ/µl; K (1/10000): $2,5 \times 10^{-8}$ HÄ/µl) eingesetzt. Als Negativkontrolle (N+M) wurde negatives, aufgereinigtes Hirnhomogenat in einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-4}$ HÄ/µl verwendet. Die Inkubationszeit betrug 15 min bei 37°C.

C PrP (27-30) wurde in einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-4}$ HÄ/µl (K) eingesetzt und vor der Zugabe von Monomeren 2 h bei 50°C in Anwesenheit von 1,5 mM PMSF inkubiert. Als Kontrolle wurden 1,5 mM PMSF mit Puffer 2 h bei 50°C inkubiert und im Anschluss Monomere zugegeben. Inkubiert wurde 15 min bei 37°C.

Keimzugabe. Folglich scheint eine vollständige Inaktivierung der PK gelungen zu sein. Eine keiminduzierte Aggregation war in diesem Ansatz aber nicht nachweisbar. In der Kontrolle mit PMSF und rek PrP (90-231) ist deutlich ein Signal im Pellet zu sehen, das in dem gleichen Ansatz ohne PMSF nicht auftaucht. Daraus kann geschlossen werden, dass PMSF für rek PrP (90-231) als eine Art unspezifischer Keim zur Aggregation dient. Versuche mit anderen Substanzen zur Inaktivierung der PK-Restaktivität in den PrP (27-30)-Proben lieferten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Neben der PK-Restaktivität im PrP (27-30) trat bei diesen Keimen noch ein weiteres Problem auf. Anders als bei den in Abbildung 3.4 gezeigten Ergebnissen, in denen PrP (27-30) immer wie erwartet im Pellet zu detektieren war, war in verschiedenen Experimenten immer wieder PrP (27-30) auch im Überstand zu finden. Auf Grund dieser Tatsache wurde eine SDS-Konzentrationsreihe mit PrP (27-30) durchgeführt,

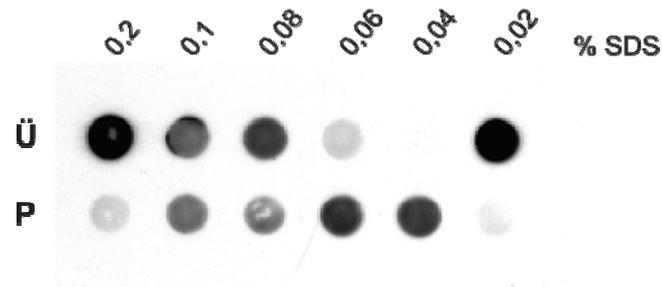


Abb. 3.5: SDS-Konzentrationsreihe mit PrP (27-30)

PrP (27-30) wurde jeweils auf die entsprechende SDS-Konzentration in 10 mM NaPi pH 7,2 eingestellt und 1 h inkubiert. Nach differentieller Ultrazentrifugation (1 h bei 100.000 x g) wurden die Proben in Überstand (Ü) und Pellet (P) getrennt. Die Analyse erfolgte mittels Dot Blot (Detektionsantikörper: 3F4).

um festzustellen, ob dieser Effekt von der SDS-Konzentration abhängig ist. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.5 zu sehen. Hier ist kein systematischer Zusammenhang zwischen der Verteilung von PrP (27-30) auf Überstand und Pellet und der eingesetzten SDS-Konzentration zu erkennen. Besonders das Auftreten des im Überstand detektierten Signals bei der niedrigsten SDS-Konzentration (0,02 %) war hierbei nicht zu erwarten. Es konnte abschließend nicht genau geklärt werden, warum das Verhalten dieser PrP (27-30)-Präparation nicht mit Literaturdaten übereinstimmt.

Die Verwendung natürlicher Keime in dem hier zu etablierenden Systems ist, mit Blick auf eine mögliche Anwendung in der Diagnostik, unverzichtbar. PrP (27-30) erwies sich allerdings als ungeeignet, um als Keim für eine Aggregation von rek PrP zu dienen. Auf Grund der Präparationsmethode ist in ihnen eine PK-Restaktivität festzustellen, bzw. auch bei anderen Präparationen nicht auszuschließen, die ausreicht, um rek PrP zu verdauen. Demnach erschien es sinnvoll Keime zu verwenden, die ohne jegliche Zugabe von PK aufgereinigt werden können.

3.1.2.2. Ergebnisse mit PrP^{Sc} als Keim

PrP^{Sc} kann, wie bereits erwähnt, aus Hirnhomogenat mittels NaPTA-Fällung selektiv aufgereinigt werden. Auf eine Verdauung mit PK wird hierbei gänzlich verzichtet. Abbildung 3.6 zeigt die Westernblot-Analyse der verschiedenen Aufreinigungsschritte einer Fällung aus Hirnhomogenat von einem gesunden (A) und einem Scrapie-infizierten Hamster (B). Die einzelnen Aufreinigungsschritte wurden jeweils einmal mit PK verdaut und einmal unbehandelt aufgetragen, um PrP^C (PK-sensitiv) und PrP^{Sc} (PK-resistent) voneinander unterscheiden zu können. Bei Verwendung von gesundem Hirnhomogenat lässt sich erkennen, dass erstens kein PK resistentes Ausgangsmaterial (HH) vorhanden ist und, dass zweitens PrP^C im ersten Überstand (S) verbleibt. Im resultierenden Pellet (P) ist kein PrP^C zu detektieren. In Abbildung 3.6 B (Scrapie) ist im Hirnhomogenat deutlich PK-resistentes Protein zu erkennen. Während

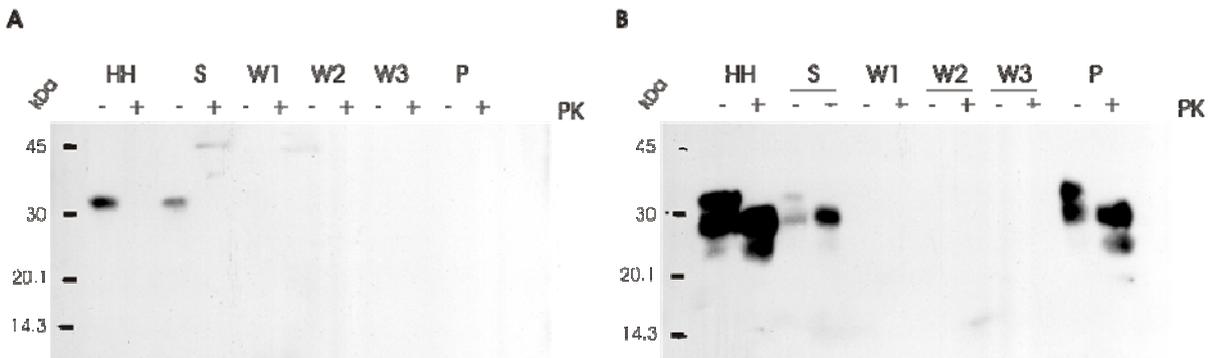


Abb. 3.6: Präparation von PrP^{Sc} mittels NaPTA-Fällung

A gesundes Hirnhomogenat

B Scrapie-infiziertes Hirnhomogenat

Das Ausgangsmaterial (Hirnhomogenat: HH), der erste Überstand (S) und die verschiedenen Waschschrte während der Aufarbeitung (W1: erster Waschschrte, W2: zweiter Waschschrte, W3: dritter Waschschrte) wurden getrennt gesammelt. Es wurden alle Proben auf 2 % Sarcosyl in PBS eingestellt und von den verschiedenen Proben jeweils $1,25 \times 10^{-3}$ HÄ für die PK-Verdauung (100 ng/ μ l PK für 1 h bei 37°C) eingesetzt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot (Detektionsantikörper: 3F4).

der Aufreinigung geht nur wenig PK-resistentes Material im Überstand verloren. Der meiste Anteil findet sich im Pellet der Fällung wieder. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei ausschließlich um PrP^{Sc} handelt, da in der Negativkontrolle kein Signal im Pellet auftrat.

Für die Anlagerungsversuche mit PrP^{Sc} als Keim wurde als Monomer sowohl rek PrP (90-231) als auch rek PrP (29-231) verwendet. Da aber keine unterschiedlichen Ergebnisse erzielt wurden, werden in diesem Abschnitt nur Experimente mit rek PrP (90-231) als Monomer gezeigt.

Analysen unter Standardbedingungen (NaPi/SDS)

Die ersten Ansätze mit PrP^{Sc} als Keim wurden, ebenso wie die bisher beschriebenen Experimente, in NaPi in Anwesenheit von SDS durchgeführt und als 2D-FIDA mittels FCS gemessen. Hierbei wurde die Fähigkeit von PrP^{Sc} als Keim für eine Aggregation von rek PrP (90-231) zu wirken mit der von PrP (27-30) verglichen. Als Sonde für die Messungen diente mit zwei unterschiedlichen Farbstoffen fluoreszenzmarkiertes rek PrP (90-231) (Alexa 488, Alexa 633), welches zusätzlich in allen Proben vorhanden war. In der 2D-FIDA werden Signale nur detektiert, wenn beide Sonden gleichzeitig an ein Molekül gebunden vorliegen. Liegen diese Signale bezüglich der Intensität, z.B. durch die Mehrfachmarkierung großer Aggregate mit beiden Sonden, über einem bestimmten Schwellenwert (vgl. Kap. 2.15.6), so gehen sie in die Auswertung ein.

Die vergleichenden Ergebnisse der 2D-FIDA sind in Abbildung 3.7 dargestellt. Hier ist auf den ersten Blick zu erkennen, dass mit PrP^{Sc} als Keim deutlich zwischen positiven (rot) und negativen (grün) Proben bzw. zwischen Proben mit Keim und Monomer (P1, P2) und den entsprechenden Negativkontrollen mit Monomer (N1, N2) unterschieden werden kann. Dies ist in den Proben mit PrP (27-30) als Keim (P3, P4) und den dazugehörigen Negativkontrollen (N3, N4) nicht der Fall. Obwohl mit PrP^{Sc} als Keim positive von negativen Proben unterschieden werden können, ist das Signal in den Negativkontrollen nicht zu vernachlässigen. Auch unter diesen Bedingungen hat wieder spontane Aggregation stattgefunden. Beim Versuch der Optimierung der Anlagerung von rek PrP an PrP^{Sc} unter diesen Bedingungen musste leider festgestellt werden, dass das Ergebnis der 2D-FIDA nicht einheitlich reproduzierbar war.

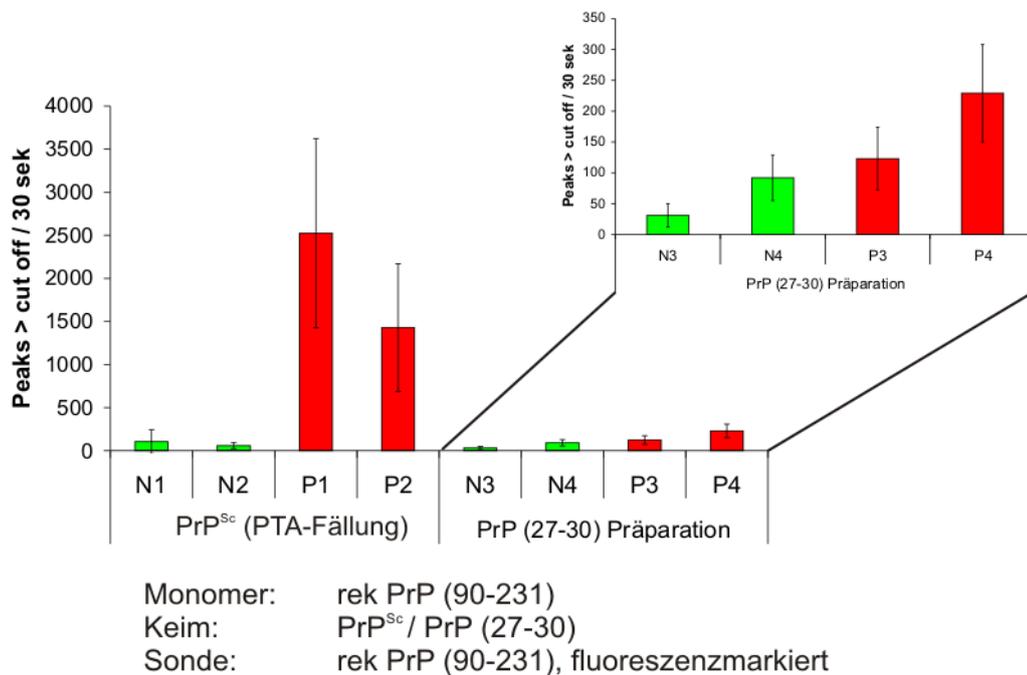


Abb. 3.7: 2D-FIDA zur keiminduzierten Aggregation: PrP^{Sc} und PrP (27-30) im Vergleich

Rek PrP (90-231) lag in den Ansätzen in einer Konzentration von 10 ng/μl vor und wurde in 0,2 % SDS vorinkubiert. PrP^{Sc} bzw. PrP (27-30) wurden in einer Konzentration von 1,25x10⁻⁴ HÄ/μl eingesetzt. Gleiches gilt für die entsprechenden Negativkontrollen. Alle Ansätze enthielten als Sonden mit Alexa-488 und Alexa-633 fluoreszenzmarkiertes rek PrP (90-231). Diese wurden in solch einer Verdünnung eingesetzt, dass jeweils eine Countrate von ca. 30 kHz erreicht wurde. Die SDS-Konzentration lag in allen Ansätzen bei 0,03 % in 10 mM NaPi pH 7,2. Alle Proben wurden direkt nach dem Ansetzen zehnmal 30 s gemessen. Zur Auswertung wurden für jede Messung alle Fluoreszenzsignale über einem bestimmten Grenzwert aufsummiert und dann der Mittelwert aus den 10 Messungen gebildet. (P1, P2: PrP^{Sc} + Monomer; N1, N2: entsprechende Negativkontrollen; P3, P4: PrP (27-30) + Monomer; N3, N4: entsprechende Negativkontrollen; P1 und P2, sowie P3 und P4 sind verschiedene Präparationen desselben Hirnhomogenats).

Um zu überprüfen, ob die in der 2D-FIDA gemessenen Signalerhöhungen in den Proben mit PrP^{Sc} und rek PrP durch eine verstärkte Aggregation von rek PrP hervorgerufen wird, wurde ein gleiches Experiment mittels differentieller Ultrazentrifugation und anschließendem Westernblot analysiert. Hierbei wurde zudem die SDS-Konzentration über einen Bereich von 0,04 % bis 0,025 % variiert, um die für diese Keim/Monomerkombination optimale SDS-Konzentration zu bestimmen. Die Inkubationszeit betrug 24 h. In Abbildung 3.8 B ist zu erkennen, dass in den Ansätzen mit Keim und Monomer immer ein deutliches Signal von rek PrP (90-231) im Pellet (P) auftritt, was für eine Anlagerung der Monomere an das PrP^{Sc} sprechen würde. Der Ansatz bei 0,03 % SDS stellt hierbei eine Ausnahme dar. In dieser Probe konnte allerdings auch kein PrP^{Sc} detektiert werden. Da die Verteilung von PrP^{Sc}-Aggregaten in der Ausgangssuspension nicht homogen ist, gestaltet sich die quantitative Entnahme von Aggregaten als problematisch.

In den Kontrollexperimenten (Abb. 3.8 A und C) war allerdings auch stets ein deutlicher Hintergrund, also rek PrP (90-231) im Pellet vorzufinden. Auch kürzere Inkubationszeiten lieferten ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). In den Kontrollansätzen ist, neben der rek PrP (90-231)-Bande bei 16 kDa, zusätzlich ein Signal im Überstand zu verzeichnen, welches bei etwa 32 kDa ungefähr auf einer Höhe mit PrP^{Sc} läuft. Dieses ist auf Dimere von rek PrP (90-231) zurückzuführen, die allerdings nur auftreten, wenn große Mengen des Proteins auf das Gel aufgetragen wurden.

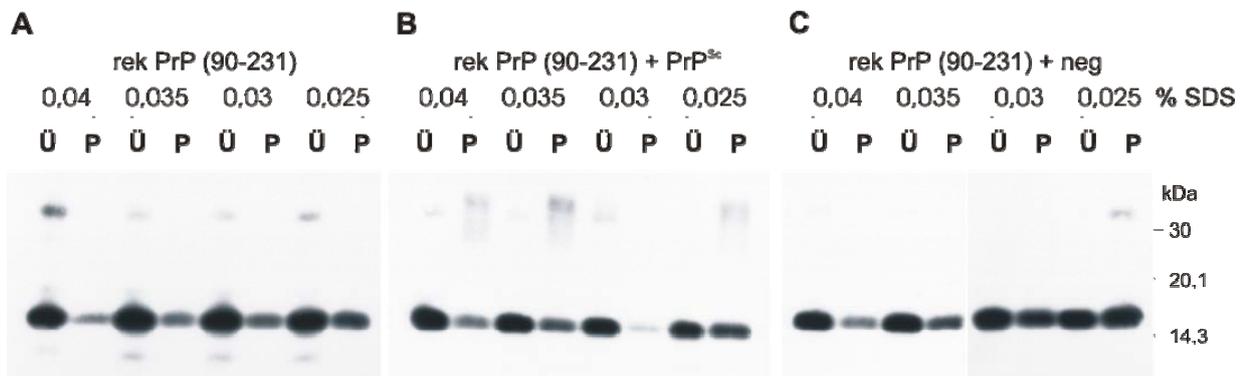


Abb. 3.8: Keiminduzierte Aggregation mit PrP^{Sc} und rek PrP (90-231) bei verschiedenen SDS-Konzentrationen

A 20 ng/ μ l rek PrP wurden entweder B mit $1,25 \times 10^{-4}$ HÄ/ μ l PrP^{Sc} oder C der entsprechenden Negativkontrolle bei verschiedenen SDS-Konzentrationen in 10 mM NaPi pH 7,2 für 24 h bei 37°C inkubiert. Nach differentieller Ultrazentrifugation (1 h bei 100.000 x g) wurden die Proben in Überstand (Ü) und Pellet (P) getrennt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot (Detektionsantikörper: 3F4).

Das größte Problem bei der Deutung der hier durchgeführten Experimente ist offensichtlich das Hintergrundsignal in den Kontrollansätzen, d.h. in den Proben ohne Keim. Durch diesen Hintergrund kann nicht eindeutig festgestellt werden, ob in den Proben mit Keim eine keimspezifische Aggregation von rek PrP stattgefunden hat. Eine nahe liegende Idee zur Verringerung des unspezifischen Hintergrundes ist sicherlich die Erhöhung der SDS-Konzentration, wodurch die Löslichkeit der Monomere zunimmt. Untersuchungen mit PrP^{Sc} bei verschiedenen SDS-Konzentrationen (Abbildung 3.9) zeigten aber, dass dieses ab 0,04 % SDS nach differentieller Ultrazentrifugation zu geringen Anteilen im Überstand erscheint. Bei 0,05 % SDS befindet sich PrP^{Sc} vollständig im Überstand. Dieser Effekt konnte in dem in Abbildung 3.8 gezeigten Westernblot nicht beobachtet werden. Dort wurden allerdings deutlich geringere PrP^{Sc}-Mengen aufgetragen, so dass die eventuell im Überstand vorhandene PrP^{Sc}-Menge somit unter der Nachweisgrenze des Westernblots liegt.

Anders als im Fall von PrP (27-30) besteht bei PrP^{Sc} eine klare Abhängigkeit zwischen der Verteilung des Proteins auf Überstand und Pellet und der SDS-Konzentration. Die Möglichkeit, den unspezifischen Hintergrund durch eine Erhöhung der SDS-Konzentration zu reduzieren, konnte dennoch verworfen werden.

Analysen zur PK-Resistenz

Es bestand weiterhin die Möglichkeit, dass sich spontan und keiminduziert gebildete Aggregate hinsichtlich ihrer PK-Resistenz unterscheiden. Aus diesem Grund wurden

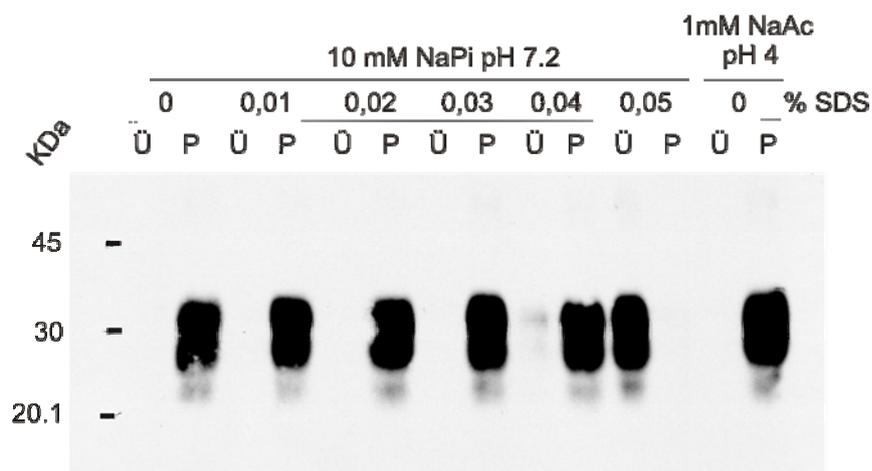


Abb. 3.9: SDS-Konzentrationreihe mit PrP^{Sc}

Es wurden jeweils $1,25 \times 10^{-3}$ HÄ PrP^{Sc} auf die entsprechende SDS-Konzentration in 10 mM NaPi pH 7,2 eingestellt und 1 h inkubiert. Nach differentieller Ultrazentrifugation (1 h bei 100.000 x g) wurden die Proben in Überstand (Ü) und Pellet (P) getrennt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot (Detektionsantikörper: 3F4).

mit verschiedenen Ansätzen nach der Inkubation Verdauungen mit PK durchgeführt. Diese Analysen sollten Aufschluss darüber geben, ob es einen Unterschied in der PK-Resistenz zwischen den spontan und keiminduziert gebildeten unlöslichen Aggregaten aus rek PrP gibt. In allen Ansätzen wurde jedoch rek PrP vollständig verdaut (Daten nicht gezeigt).

Variation des pH-Werts

Da bekannt ist, dass rek PrP (90-231) bei saurem pH ebenfalls löslich ist (Leffers *et al.*, 2004), wurden die nächsten Experimente bei pH 4 in NaAc (1 mM) ohne Zugabe von SDS durchgeführt. Wie in Abbildung 3.9 rechts zu sehen, ist PrP^{Sc} unter diesen Bedingungen vollständig unlöslich. rek PrP (29-231) weist unter diesen Bedingungen eine deutlich schlechtere Löslichkeit als in NaPi/SDS auf. Deshalb wurden diese Experimente nur mit rek PrP (90-231) als Monomer durchgeführt. Abbildung 3.10 zeigt einen Ansatz zur keiminduzierten Aggregation mit PrP^{Sc} als Keim und rek PrP (90-231) als Monomer in 1 mM NaAc bei pH 4. Auch unter diesen Bedingungen ist in der Probe mit Keim und Monomer (M+K) deutlich rek PrP im Pellet zu erkennen. Wiederum tritt aber auch unter diesen Bedingungen der bereits beschriebene unspezifische Hintergrund in den Kontrollansätzen (M und M+N) auf. Hier ist erneut ein schwaches Signal im Pellet vorzufinden.

Zur Reduktion des Hintergrundes wurde auch hier wiederum untersucht, ob sich in den Proben mit Keim und Monomer während der Inkubation PK-resistentes, unlösliches Material gebildet hat. Dies war wiederum nicht der Fall; in allen Ansätzen wurde rek PrP (90-231) vollständig verdaut (Daten nicht gezeigt).

Weitere Variation der Bedingungen

Im Folgenden wurden verschiedene Parameter des Systems variiert, mit der Intention eine Verbesserung der keimspezifischen Anlagerung zu erreichen. So wurden beispielsweise Versuche bei verschiedenen Inkubationstemperaturen durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass bei den bisher eingesetzten 37°C das beste Ergebnis erzielt wurde. Auch wurde untersucht, ob durch eine Erhöhung der Keimkonzentration in den Aggregationsansätzen eine verstärkte Anlagerung induziert werden konnte. Dieser Effekt konnte nicht nachgewiesen werden. Ebenso war mit Erhöhung der Monomerkonzentration keine verstärkte Anlagerung nachzuweisen. Erst Experimente bei verschiedenen pH-Werten (4; 4,5; 5; 5,5) sowie verschiedenen NaAc-Konzentrationen (1, 10, 100 mM), zeigten, dass durch einen Wechsel der Bedingungen auf 10 mM NaAc bei pH 4,5 eine deutliche Verbesserung der keimspezifischen Anlagerung erreicht werden konnte, wie in Abbildung 3.11 A dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass in Anwesenheit von PrP^{Sc} der größte Anteil von

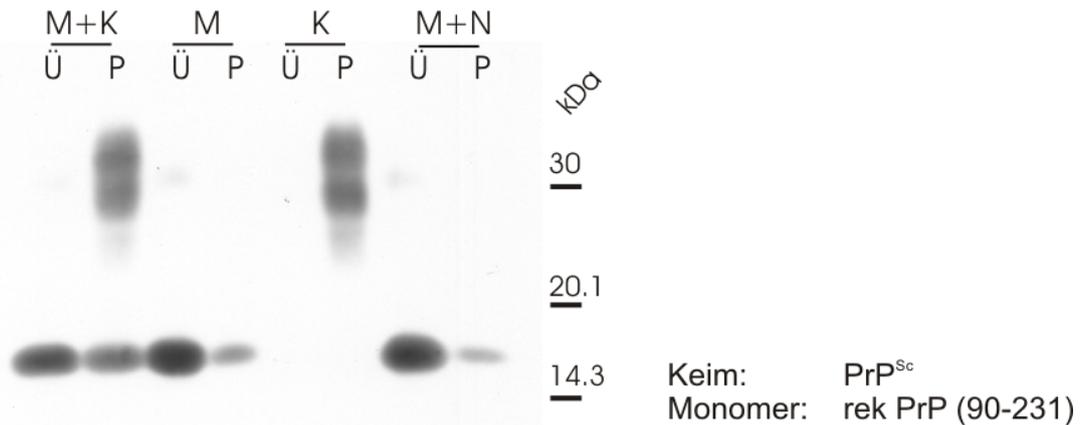


Abb. 3.10: Keiminduzierte Aggregation mit PrP^{Sc} in 1 mM NaAc pH 4

Es wurden jeweils 20 ng/μl rek PrP (90-231) als Monomer (M) mit 6×10^{-5} HÄ/μl PrP^{Sc} als Keim (K) oder der entsprechenden Negativkontrolle (N) für 3 h bei 37°C in 1 mM NaAc pH 4 inkubiert. Nach differentieller Ultrazentrifugation (1 h bei 100.000 x g) wurden die Proben in Überstand (Ü) und Pellet (P) getrennt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot (Detektionsantikörper: 3F4).

rek PrP (90-231) (M+K) in einen unlöslichen Zustand übergegangen ist. Ohne Keimzugabe ist rek PrP (90-231) unter diesen Bedingungen vollständig löslich (M). Aber immer noch ist in der Negativkontrolle (M+N) unspezifischer Hintergrund im Pellet zu verzeichnen.

Es bestand der Verdacht, dass diese als Hintergrund detektierten rek PrP-Aggregate erst während der Zentrifugation (1 h, 100.000 x g) zur Trennung von Überstand und Pellet ausgebildet werden. Weitere Analysen von rek PrP zeigten, dass nach mehrmaliger Zentrifugation des „löslichen“ Überstandes immer wieder ein gewisser Anteil rek PrP in der Pelletfraktion vorzufinden war (Daten nicht gezeigt). Daraus kann geschlossen werden, dass sich während der Zentrifugation ein Gleichgewicht zwischen löslichem und unlöslichem rek PrP einstellt. Deshalb wurde ein gleiches Experiment wie in Abbildung 3.11 A dargestellt, mittels FCS und anschließender 2D-FIDA durchgeführt. Als Sonden wurden zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Antikörper (R1, D13) verwendet. Da mit dieser Methode auf eine Zentrifugation verzichtet werden kann, sollte die spontane Aggregation von rek PrP, so sie durch die Zentrifugation forciert wird, stark reduziert sein. Abbildung 3.11 B zeigt, dass mit dieser Methode in den Kontrollen (M, M+N, N) tatsächlich kaum Hintergrundsignal zu detektieren ist. Außerdem kann zwischen NaPTA-gefälltem Hirnhomogenat Scrapieinfizierter Tiere, (K), also PrP^{Sc} und negativem, NaPTA-gefälltem Hirnhomogenat (N) deutlich unterschieden werden. In dem eigentlichen Aggregationsansatz mit Keim und Monomer (M+K) liegt das Signal aber unter dem von PrP^{Sc}. An der großen Standardabweichung ist zu erkennen, dass hier starke Schwankungen zwischen den einzelnen Messungen auftraten.

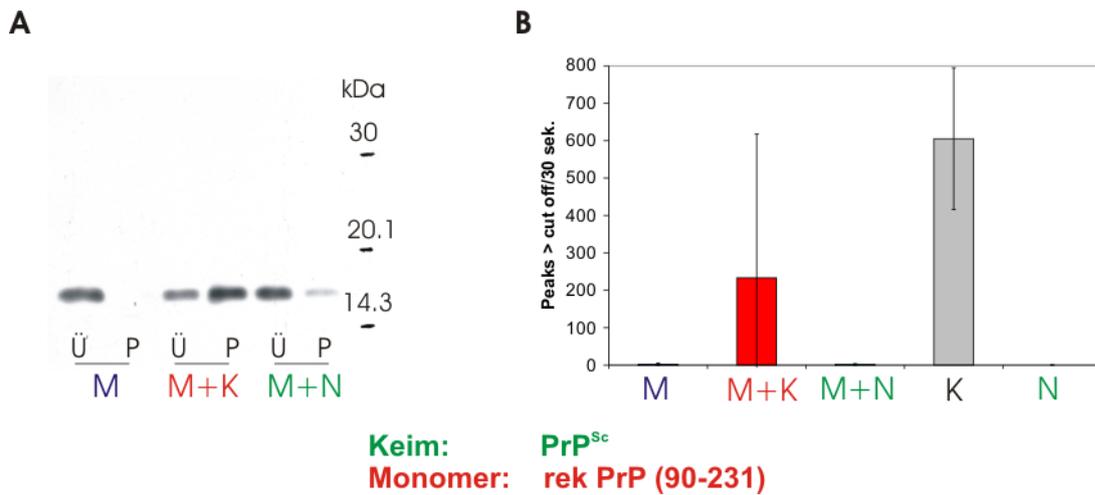


Abb. 3.11: Keiminduzierte Aggregation mit PrP^{Sc} in 10 mM NaAc pH 4,5

50 ng/μl rek PrP (90-231) als Monomer (M) wurden mit $7,5 \times 10^{-5}$ HÄ/μl PrP^{Sc} als Keim (K) oder der entsprechenden Negativkontrolle (N) für 3 (A und B) bzw. 24 h (A) bei 37°C in 10 mM NaAc pH 4,5 inkubiert.

A Nach differentieller Ultrazentrifugation (1 h bei 100.000 x g) wurden die Proben in Überstand (Ü) und Pellet (P) getrennt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot (Detektionsantikörper: 3F4).

B Alle Ansätze enthielten als Sonden mit Alexa-488 fluoreszenzmarkierten Antikörper R1 sowie mit Alexa-633 fluoreszenzmarkierten Antikörper D13. Diese wurden in einer Verdünnung eingesetzt, dass jeweils eine Countrate von ca. 30 kHz erreicht wurde. Alle Proben wurden zehnmals für 30 s gemessen. Zur Auswertung wurden für jede Messung alle Fluoreszenzsignale über einem bestimmten Grenzwert aufsummiert und dann der Mittelwert aus den 10 Messungen gebildet.

Durch Vermeidung der Zentrifugation und der Durchführung von FCS-Messungen, konnte der unspezifische Hintergrund in den Kontrollen unter diesen Bedingungen reduziert werden. Eine Anlagerung der Monomere an die Keime und damit verbundene Signalzunahme in dieser Probe konnte allerdings nicht bestätigt werden.

3.2. Bildung von Fibrillen statt unspezifischer Aggregate

Eine eindeutig nachweisbare, keimabhängige Aggregation der Monomere konnte bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht erreicht werden. Hierbei stellte der Hintergrund, d.h. die spontane Aggregation der Monomere in den Kontrollansätzen das größte Problem dar. Dies könnte zwei Gründe haben:

1. Die Lösungsmittelbedingungen für spontane und keiminduzierte Aggregatbildung liegen zu dicht beisammen, d.h. unter den Bedingungen der keiminduzierten Aggregation sind die Monomere schon zu dicht an ihrer Löslichkeitsgrenze.
2. Die bisher beschriebenen Ergebnisse beschränkten sich auf Untersuchungen zur Löslichkeit mittels differentieller Ultrazentrifugation

und zum Aggregationszustand mittels FCS der neu gebildeten Aggregate. Betrachtet man nur diese beiden Eigenschaften, so ist es schwierig zwischen spontaner und keiminduzierter Aggregation zu unterscheiden, da die Monomere, unter den getesteten Bedingungen, immer zu einem gewissen Anteil spontan aggregierten. Mit den gewählten Methoden sind diese Aggregate nicht von denen, die in Anwesenheit von Keimen gebildet worden sind zu unterscheiden. Man müsste also zusätzlich die Qualität der gebildeten Aggregate auswerten können.

Während dieser Arbeit wurde durch die Arbeiten von Leffers und Stöhr in unserer Gruppe bekannt, dass bei rek PrP unter bestimmten Bedingungen, statt der amorphen Aggregation, auch eine Ausbildung von Fibrillen induziert werden kann (Leffers *et al.* 2005). In Anwesenheit von SDS und NaCl in 10 mM NaPi gelang es, die Fibrillenbildung von rek PrP (90-231) über einen Zeitraum von 5 Wochen zu induzieren. Diese Fibrillen können mittels ThioflavinT- (ThT-) Assay spezifisch nachgewiesen werden (Kapitel 2.16). Mit einem ähnlichen Konversionssystem zur Herstellung von Fibrillen aus rek PrP konnte zum ersten Mal die Generierung von *de novo*-Infektiosität *in vitro* gezeigt werden. Daher ist anzunehmen, dass die Bildung von Fibrillen eine wichtige Rolle bei der Prionpropagation spielt.

Aus 1. und 2., sowie neuen Kenntnissen über die Fibrillenbildung von rek PrP ergab sich für die vorliegende Arbeit ein neues Konzept: Die weitere Etablierung der keiminduzierten Anlagerung von Monomeren sollte in NaPi in Anwesenheit von SDS und NaCl durchgeführt und hinsichtlich der Ausbildung von Fibrillen statt unspezifischer Aggregate untersucht werden.

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten werden also diese Bedingungen genutzt, um eine Fibrillenbildung von PrP durch spezifische Keime zu induzieren. Eventuell auftretende amorphe Aggregation von Monomeren sollte kein Problem mehr darstellen, da mittels ThT-Assay nur fibrilläre Strukturen detektiert werden.

3.2.1. Veränderung der Löslichkeit von rek PrP (90-231) durch NaCl-Zugabe

Wie bereits erwähnt, kann in Anwesenheit von SDS und NaCl in 10 mM NaPi bei rek PrP (90-231) eine Fibrillogenese induziert werden. Unter diesen Bedingungen weist das Protein zunächst eine höhere Löslichkeit auf bzw. die Löslichkeitsgrenze ist zu niedrigeren SDS-Konzentrationen hin verschoben, als unter gleichen Bedingungen ohne NaCl-Zugabe. Abbildung 3.12 A zeigt diesen Effekt anhand einer Dot Blot-Analyse. Hier wurden 20 ng/µl rek PrP (90-231) (vorinkubiert in 0,2 % SDS) bei

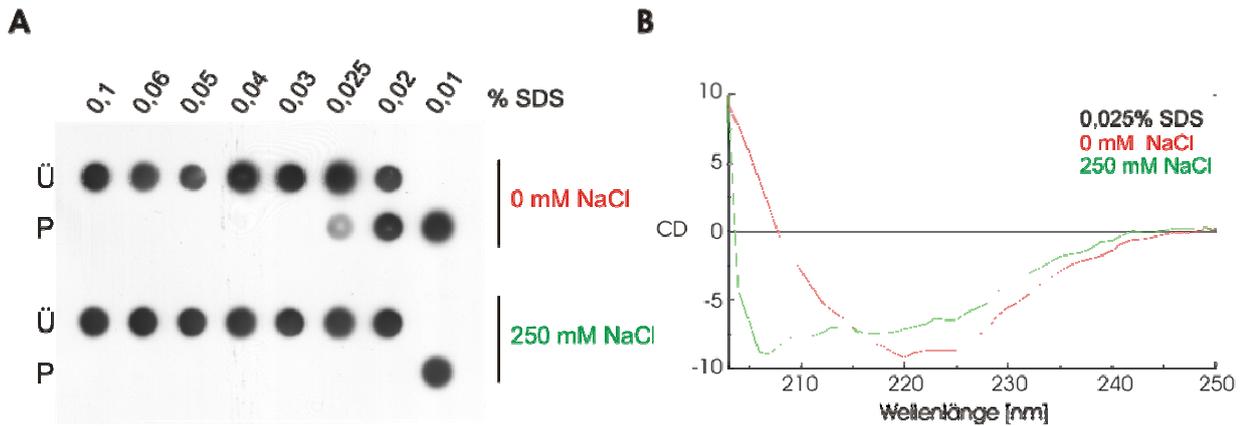


Abb. 3.12: Einfluss von NaCl auf die Löslichkeit und die Sekundärstruktur von rek PrP (90-231)

A Dot Blot (Detektionsantikörper: 3F4): rek PrP (90-231) wurde in 10 mM NaPi pH 7.2 mit 0,2 % SDS vorinkubiert und im Anschluss auf 50 ng/μl und die jeweilige SDS- bzw. NaCl-Konzentration eingestellt und für weitere 20 h inkubiert. Nach differentieller Ultrazentrifugation (1 h bei 100.000 x g) wurden die Proben in Überstand (Ü) und Pellet (P) getrennt.

B CD-spektroskopische Analyse der Sekundärstruktur von rek PrP (90-231) bei 0,025 % SDS: rek PrP (90-231) wurde in 10 mM NaPi pH 7.2 mit 0,2 % SDS vorinkubiert und im Anschluss auf 20 ng/μl und 0,025 % SDS und die angegebene NaCl-Konzentration eingestellt. Nach Inkubation für weitere 20 h wurden die Proben gemessen.

verschiedenen SDS-Konzentrationen in An- oder Abwesenheit von NaCl für 20 h inkubiert. In den Ansätzen ohne NaCl beginnt bereits bei einer SDS-Konzentration von 0,025 % die Aggregation des rek PrP. In den Ansätzen mit NaCl hingegen bleibt das Protein bis einschließlich 0,02 % SDS vollständig löslich. Diese erhöhte Löslichkeit von rek PrP (90-231) durch NaCl-Zugabe ermöglicht es, Untersuchungen zur keiminduzierten Aggregation bei niedrigeren SDS-Konzentrationen als zuvor beschrieben durchzuführen. In Abbildung 3.12 B sind CD-Spektren der Proben bei 0,025 % SDS dargestellt. In Anwesenheit von NaCl (grüne Kurve) spiegelt das CD-Spektrum eine teildenaturierte/ α -helikale Struktur wieder. Ohne Zugabe von NaCl (rote Kurve) weist die Sekundärstruktur des rek PrP bei dieser SDS-Konzentration einen deutlich erhöhten β -Faltblattanteil auf. Diese CD-Spektren wurden zuerst von J. Stöhr aufgenommen (unpublizierte Daten) und im Rahmen dieser Arbeit reproduziert.

3.2.2. Einfluss spezifischer Keime auf die Kinetik der Fibrillogenese von rek PrP

Zur Untersuchung der keiminduzierten Fibrillenbildung wurden Bedingungen gewählt, unter denen rek PrP (90-231) nach 6 Wochen Inkubation unter Schütteln bei 37°C Fibrillen ausbildet. Alle Ansätze wurden wöchentlich über einen Zeitraum von 3 Wochen beobachtet. Hierbei sollte untersucht werden, ob es bei Anwesenheit von PrP^{Sc} zu einem früheren Zeitpunkt zur Ausbildung von Fibrillen kommt. In Abbildung

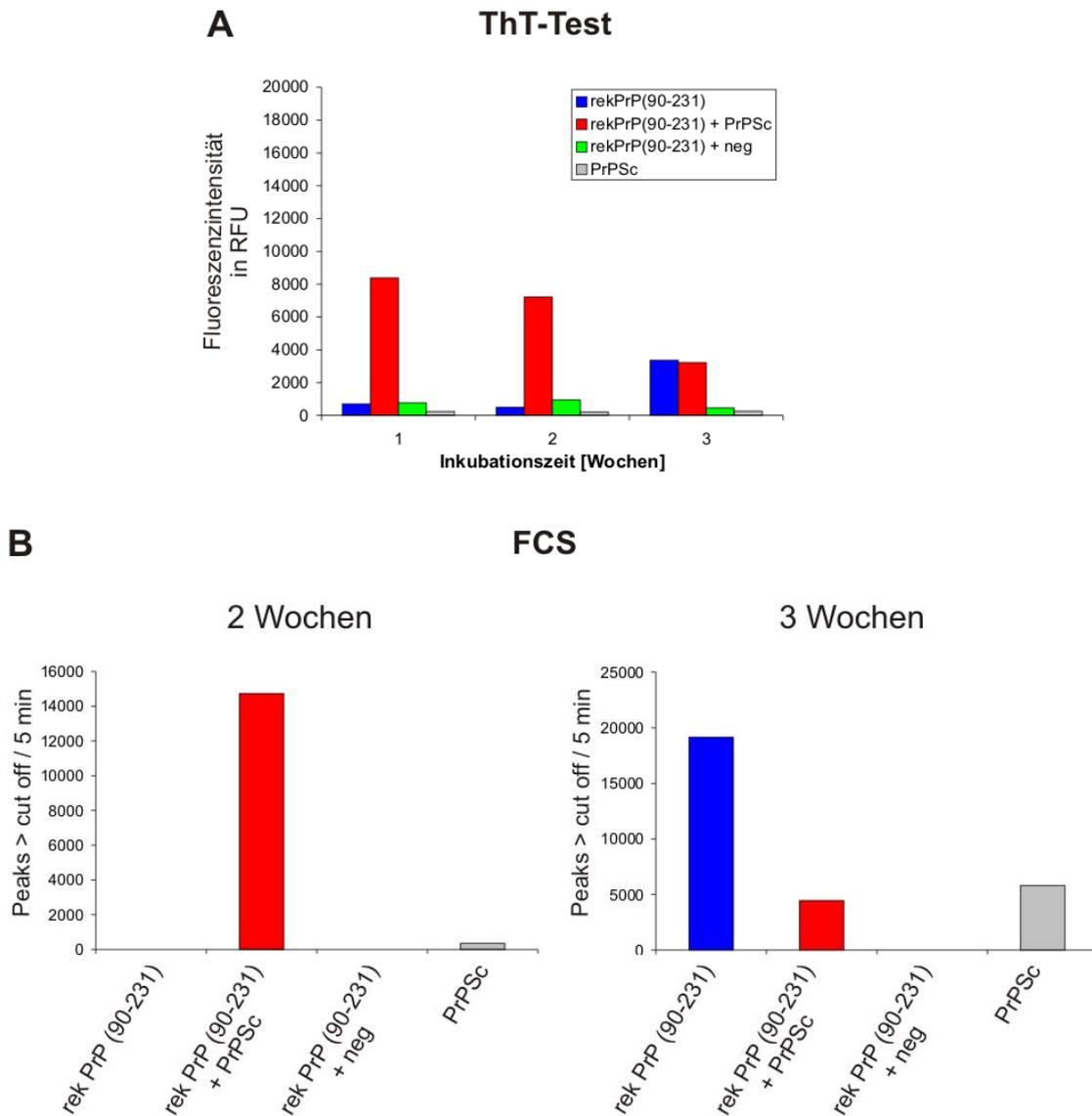


Abb. 3.13: Einfluss spezifischer Keime auf die Fibrillogenese von rek PrP (90-231)

Die Ansätze (200 µl) enthielten jeweils 80 ng/µl rek PrP (90-231) (vorinkubiert in 0,2 % SDS) und ggf. $1,25 \times 10^{-4}$ HÄ/µl PrP^{Sc} oder die entsprechende Negativkontrolle (neg) und wurden auf 10 mM NaPi pH 7.2 mit 0,025 % SDS und 250 mM NaCl eingestellt. Die Proben wurden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Jede Woche wurden aus den Ansätzen 20 µl für den ThT-Assay sowie 10 µl für FCS-Messungen entnommen, die restlichen Ansätze wurden weiter bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

A ThT-Assay: Die vom Gesamtansatz abgenommenen 20 µl wurden jeweils auf eine rek PrP-Endkonzentration von 10,6 ng/µl bei gleich bleibender SDS-Konzentration verdünnt. Anschließend wurde ThT (Endkonzentration 5 µM) zugegeben und nach 15 min Inkubation wurde die Messung gestartet. (Gain: 180; Z-Position: 4150 µm)

B 2D-FIDA nach 2 und 3 Wochen Inkubation: Als Sonden wurden den Proben mit Alexa-488 fluoreszenzmarkierter Antikörper R1 sowie mit Alexa-633 fluoreszenzmarkierter Antikörper D13 zugefügt. Diese wurden in einer Verdünnung eingesetzt, dass jeweils eine Countrate von ca. 30 kHz erreicht wurde. Alle Proben wurden zehnmal 30 s gemessen. Zur Auswertung wurden alle Fluoreszenzsignale der 10 Messungen über einem bestimmten Grenzwert aufsummiert.

3.13 A sind die Ergebnisse der ThT-Messungen dargestellt. Durch die Zugabe von PrP^{Sc} zu rek PrP (roter Balken) beginnt die Fibrillogenese bereits nach einer Woche. Zu diesem Zeitpunkt ist ein hohes Signal zu verzeichnen, das allerdings über die Zeit wieder abnimmt. In der Probe mit rek PrP (90-231) (blauer Balken) ist erst in der dritten Woche ein Anstieg in der Fluoreszenz zu beobachten. Zu diesem Zeitpunkt setzt also die spontane Fibrillenbildung unter diesen Bedingungen ein. Die Kontrollansätze (PrP^{Sc}, rek PrP (90-231) + neg) bleiben über den gesamten untersuchten Zeitraum bei Signalen unter 1000 RFU. Die als Keim eingesetzte Menge PrP^{Sc} ist also so gering, dass sie mittels ThT-Assay nicht detektiert werden kann. Des Weiteren sind in Abbildung 3.13 B exemplarisch die FCS-Messungen (2D-FIDA) nach 2 und 3 Wochen Inkubation dargestellt. Bei den Messungen nach 2 Wochen Inkubation wurden nur in der Probe mit PrP^{Sc} und rek PrP (90-231) (roter Balken) deutliche Signale über einem Grenzwert gemessen. Dieses Signal ist in der dritten Woche stark abgesunken. Nach 3 Wochen Inkubation wurden in der Probe mit rek PrP (90-231) (blauer Balken) die meisten Signale detektiert. Die Anzahl der gewerteten Signale liegt hier sogar höher als in der Woche zuvor in der Probe mit Keim und Monomer. Die Zunahme des PrP^{Sc}-Signals in der dritten Woche, ist vermutlich auf unterschiedliche Mengen von PrP^{Sc} in den FCS-Messansätzen zurückzuführen. Wie bereits erwähnt, ist die quantitative Entnahme von Aggregaten problematisch, da diese in Suspension sehr inhomogen verteilt vorliegen.

Da aus den in Abbildung 3.13 A dargestellten ThT-Ergebnissen geschlossen werden kann, dass die keiminduzierte Fibrillenbildung bereits nach einer Woche abgeschlossen ist, während die spontane erst zwischen der 2. und 3. Woche einsetzt, wurde der zu untersuchende Zeitabschnitt stark verkürzt. Die folgenden Experimente beschränken sich auf die detaillierte Untersuchung der ersten Stunden der keiminduzierten Fibrillogenese, um Aufschluss über folgende Fragen zu erhalten: Zu welchem Zeitpunkt beginnt die keiminduzierte Fibrillogenese, wie sieht ihr Verlauf aus, wann ist sie abgeschlossen und von welchen Parametern kann sie beeinflusst werden?

Bislang wurde für eine Analyse der Fibrillogenese mittels ThT-Assay standardgemäß eine Probe angesetzt und inkubiert, aus der zu bestimmten Zeitpunkten Aliquots entnommen wurden. Diese wurden dann verdünnt, mit ThT versetzt und anschließend wurden Einzelmessungen im Fluoreszenzreader durchgeführt. Wenn man nun den Verlauf einer Fibrillogenese z.B. über 20 h alle 15 min betrachten möchte (80 Einzelmessungen) und zu jedem Zeitpunkt 20 µl Probe für die Messung abnimmt, wird ein Gesamtvolumen einer Probe von 1600 µl benötigt. Dies bedeutet nicht nur einen immensen Materialverbrauch, sondern auch, dass zu Beginn der Messreihe ein großes Inkubationsvolumen vorhanden war, wohingegen die letzte zu messende Probe nur noch ein Inkubationsvolumen von 20 µl besitzt. Nach Baskakov *et al.*

(2005) weist die Fibrillogenese jedoch eine gewisse Abhängigkeit vom Verhältnis Wandfläche zu Volumen auf. An dieser Stelle wird der Versuch unternommen, die Fibrillogeneseansätze direkt in Anwesenheit von ThT im Fluoreszenzreader zu inkubieren und in bestimmten Abständen zu messen. Hierzu wurden 200 µl-Ansätze vorbereitet. Diese enthielten 80 ng/µl rek PrP (90-231) (vorinkubiert in 0,2 % SDS) ggf. mit $1,25 \times 10^{-4}$ HÄ/µl PrP^{Sc} oder der entsprechenden Menge an NaPTA-gefälltem Hirnhomogenat gesunder Tiere (neg). Als Kontrolle wurde zusätzlich PrP^{Sc} ($1,25 \times 10^{-4}$ HÄ/µl) gemessen. Die Messungen wurden in 10 mM NaPi pH 7.2 mit 0,025 % SDS und 250 mM NaCl in Anwesenheit von 5 µM ThT durchgeführt und erfolgten über 88 h alle 2 h. Vor jeder Messung wurden die Proben 30 s geschüttelt, die Temperatur betrug während der gesamten Laufzeit 37°C. In Abbildung 3.14 sind die Ergebnisse dieser Messung als Diagramm (relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) über die Zeit) dargestellt. In dem Ansatz mit Keim und Monomer (rote Kurve) lässt sich nach ca. 4 h ein Anstieg in der Fluoreszenz beobachten. Dieser Verlauf ist zunächst recht steil und flacht nach ca. 12 h etwas ab. In allen anderen Proben ist über den gesamten untersuchten Zeitraum kein Anstieg in der Fluoreszenz zu beobachten. Unter diesen Bedingungen kann also klar zwischen spontaner und keiminduzierter Fibrillenbildung unterschieden werden, und das Signal des eigentlichen Keimes, PrP^{Sc}, konnte durch Zugabe von rek PrP (90-231) um den

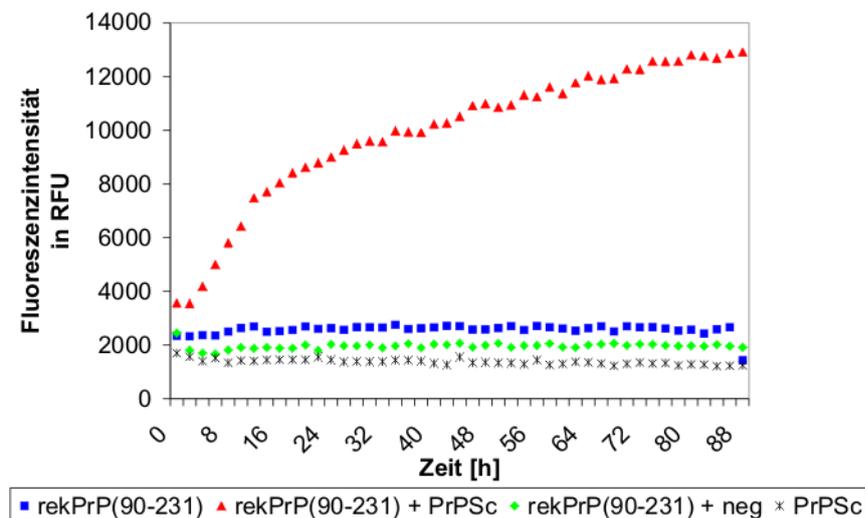


Abb. 3.14: Kinetik der keiminduzierten Fibrillogenese

ThT-Assay: Die Messungen wurden in 10 mM NaPi, pH 7.2 mit 0,025 % SDS und 250 mM NaCl in Anwesenheit von 5 µM ThT durchgeführt. Das Probenvolumen betrug jeweils 200 µl. Die verschiedenen Ansätze enthielten 80 ng/µl rek PrP (90-231) mit ggf. $1,25 \times 10^{-4}$ HÄ/µl PrP^{Sc} oder der entsprechenden Negativkontrolle (neg). Als Kontrolle wurde zusätzlich PrP^{Sc} ($1,25 \times 10^{-4}$ HÄ/µl) gemessen. Die Proben wurden direkt nach dem Ansetzen in 96-Well-Platten überführt und über 88 h alle 2 h gemessen. Vor jeder Messung wurden die Proben 30 s geschüttelt, die Temperatur betrug während der gesamten Laufzeit 37°C. (Gain: 180; Z-Position: 4150 µm)

Faktor 10 verstärkt werden. Damit ist eine klare Unterscheidung zwischen der Probe eines infizierten und eines gesunden Tieres möglich.

Für eine direkte Gegenüberstellung des ThT-Assays, also der Detektion amyloider Strukturen, und der bislang größtenteils durchgeführten Löslichkeitsanalyse, wurden parallel zu dem zuletzt beschriebenen Experiment (Abb.3.14) gleiche Ansätze mittels differentieller Ultrazentrifugation und anschließender SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Hierfür wurden zum Zeitpunkt 0 und 24 h Aliquots entnommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.15 zu sehen. Zum Zeitpunkt 0 h (A) ist in allen Proben, die Monomer enthalten, ein schwaches Signal des rek PrP (90-231) im Pellet zu detektieren. Der größte Anteil befindet sich jedoch im Überstand. Nach 24 h (B) hat in der Probe mit PrP^{Sc} und rek PrP (90-231) (M+K) der unlösliche Anteil des rek PrP zwar deutlich zugenommen, aber auch in der Negativkontrolle (M+N) ist ein deutliches Signal im Pellet zu erkennen. PrP^{Sc} ist in diesem Fall nicht zu erkennen. Mittels Löslichkeitsanalyse kann in diesem Fall wiederum nicht zwischen dem Ansatz mit Monomer und Keim und der Negativkontrolle unterschieden werden. Die Monomere bilden also auch unter diesen Bedingungen spontan Aggregate, aber nur durch Zugabe von PrP^{Sc} findet in diesem Zeitrahmen Fibrillenbildung statt, die mittels ThT-Assay nachgewiesen werden kann. Ein Vergleich mit den FCS-Messungen aus

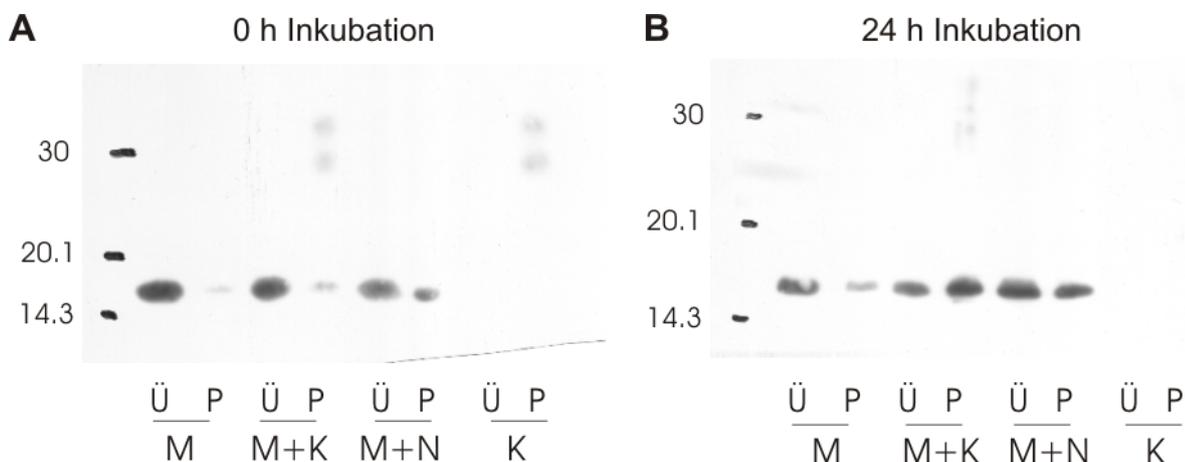


Abb. 3.15: Löslichkeitsanalyse der keiminduzierten Aggregation unter Fibrillogenesebedingungen

Die Proben wurden in 10 mM NaPi, pH 7.2 mit 0,025 % SDS und 250 mM NaCl angesetzt. Das Probenvolumen betrug jeweils 200 µl. Die verschiedenen Ansätze enthielten 80 ng/µl rek PrP (90-231) (M) mit ggf. $1,25 \times 10^{-4}$ HÄ/µl PrP^{Sc} (K) oder der entsprechenden Negativkontrolle (N). Als Kontrolle wurde zusätzlich PrP^{Sc} ($1,25 \times 10^{-4}$ HÄ/µl) gemessen. Zum Zeitpunkt **A** 0 h und **B** 24 h wurden jeweils Aliquots entnommen. Nach differentieller Ultrazentrifugation (1 h bei 100.000 x g) wurden die Proben in Überstand (Ü) und Pellet (P) getrennt und anschließend mittels SDS-PAGE und Westernblot (Detektionsantikörper: 3F4) analysiert.

Abbildung 3.13 B zeigt erneut, dass die spontane Aggregation durch Zentrifugation favorisiert wird.

3.2.3. Analyse des Aggregatzustandes und der Sekundärstruktur keiminduzierter Fibrillen

In Abb. 3.14 war zu erkennen, dass eine Fluoreszenzzunahme im ThT-Assay im Fall der keiminduzierten Fibrillenbildung erst nach etwa 4 h zu verzeichnen ist. Es stellte sich daher die Frage, ob innerhalb dieser Zeitspanne, in der offensichtlich noch keine amyloiden Strukturen ausgebildet werden, rek PrP (90-231) eventuell zunächst hinsichtlich der Sekundärstruktur oder des Aggregationszustandes einer Umwandlung unterliegt. Auf Grund dessen wurde dieser Anfangsbereich genauer untersucht. Hierzu wurden sowohl FCS-Messungen als auch CD-spektroskopische Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.16 dargestellt. Für die FCS-Messungen wurde den Proben mit Alexa-488 fluoreszenzmarkiertes sowie mit Alexa-633 fluoreszenzmarkiertes rek PrP (90-231) als Sonden zugefügt. Die Daten der 2D-FIDA (A) zeigen, dass es innerhalb der ersten Stunde nach Zugabe von PrP^{Sc} zu rek PrP (90-231) (rote Datenpunkte) zu einer Zunahme der Aggregatanzahl oder Aggregatgröße kommt. Dieses kann mit der hier verwendeten Art der Auswertung nicht klar unterschieden werden. Beide Ereignisse führen zu einer Zunahme der gemessenen Signale über einem bestimmten Grenzwert. Ein sehr großes Aggregat kann sich z.B., auf Grund der längeren Diffusionszeit, länger im Fokus aufhalten und somit mehrfach angeregt werden. Dies führt dazu, dass von einem großen Aggregat mehrere Signale oberhalb des „cut off“ verzeichnet werden können. In der Kontrollmessung mit PrP^{Sc} (schwarze Datenpunkte) liegt die Anzahl der gewerteten Signale insgesamt über der der entsprechenden Negativkontrolle (grüne Datenpunkte), da die PrP^{Sc}-Aggregate ebenfalls, wie erwartet, von den Sonden markiert werden. In beiden Kontrollen ist aber keine Zunahme der Aggregatanzahl oder -größe über die Zeit zu detektieren. Mittels CD-spektroskopischer Analyse (B) konnte gezeigt werden, dass rek PrP (90-231) unter den eingestellten Bedingungen zunächst eine teildenaturierte/ α -helikale Struktur aufweist (grüne Kurve). Direkt nach Zugabe von PrP^{Sc} (rote Kurve) lässt sich die Sekundärstruktur aufgrund der Unlöslichkeit der gebildeten Aggregate bereits nicht mehr genau erfassen. Dies deutet aber auf eine Verschiebung zur β -faltblattreichen Struktur hin. Die weitere CD-Signalabnahme nach einer Stunde Inkubation (blaue Kurve) zeigt, dass die Aggregation von rek PrP (90-231) noch weiter fortgeschritten ist. Die in diesem Experiment eingesetzte Menge an PrP^{Sc} ohne Zugabe von Monomeren lieferte kein CD-Signal (Daten nicht gezeigt).

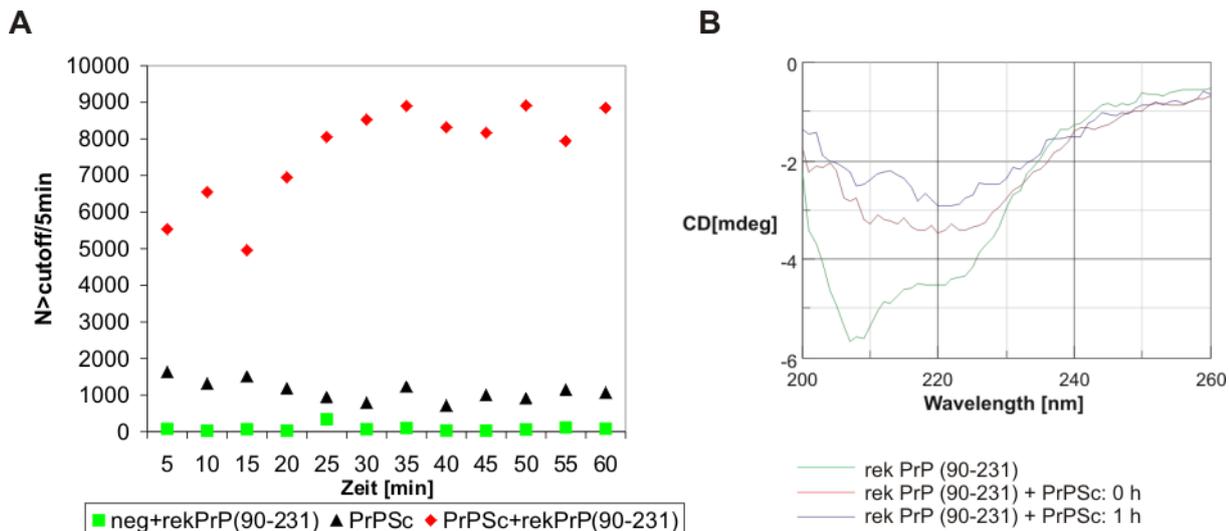


Abb. 3.16: Charakterisierung der Aggregate und der Sekundärstruktur von rek PrP in der 1. Stunde nach PrP^{Sc}-Zugabe

A 2D-FIDA: Die Proben wurden in 10 mM NaPi, pH 7,2 mit 0,025 % SDS und 250 mM NaCl angesetzt und enthielten 80 ng/ μ l rek PrP (90-231) mit $1,2 \times 10^{-4}$ HÄ/ μ l PrP^{Sc} oder der entsprechenden Negativkontrolle (neg). Als Kontrolle wurde zusätzlich PrP^{Sc} ($1,2 \times 10^{-4}$ HÄ/ μ l) gemessen. Als Sonden wurde den Proben mit Alexa-488 fluoreszenzmarkiertes sowie mit Alexa-633 fluoreszenzmarkiertes rek PrP (90-231) zugefügt. Diese wurden in einer Verdünnung eingesetzt, dass jeweils eine Countrate von ca. 30 kHz erreicht wurde. Alle Proben wurden direkt nach dem Ansetzen 120mal 30 s gemessen. Zur Auswertung wurden zunächst für jede Messung alle Fluoreszenzsignale über einem bestimmten Grenzwert aufsummiert und im Anschluss die gewerteten Signale von jeweils 10 Messungen (5 min) addiert und gegen die Zeit aufgetragen.

B CD-spektroskopische Analyse: Zunächst wurden 100 ng/ μ l rek PrP (90-231) bei 0,025 % SDS in 10 mM NaPi pH 7,2 mit 250 mM NaCl gemessen (grüne Kurve). Im Anschluss wurde eine entsprechende Probe direkt (rote Kurve) nach Zugabe von PrP^{Sc} ($6,25 \times 10^{-5}$ HÄ/ μ l) und nach einer Stunde (blaue Kurve) Inkubation gemessen.

Sowohl die 2D-FIDA als auch die durchgeführten CD-Messungen weisen darauf hin, dass es in einer Zeitspanne von einer Stunde nach der Zugabe von PrP^{Sc} zu rek PrP (90-231) zur Ausbildung von Aggregaten kommt. Da in diesem Zeitbereich mittels ThT-Assay keine Fluoreszenzerhöhung zu verzeichnen war, kann geschlossen werden, dass diese früh gebildeten Aggregate einen amorphen Charakter aufweisen.

3.2.4. Untersuchung der Ultrastruktur der in Anwesenheit von PrP^{Sc} gebildeten rek PrP-Aggregate

Es konnte gezeigt werden, dass die in Anwesenheit von PrP^{Sc} gebildeten Aggregate aus rek PrP (90-231) den amyloidspezifischen Farbstoff ThT binden (Kap. 3.2.2). Um diese Aggregate noch genauer definieren zu können, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Es sollte die fibrilläre Struktur der in Anwesenheit von PrP^{Sc} gebildeten rek PrP-Aggregate durch eine zweite Nachweismethode bestätigt werden. Hierzu wurden Proben, die PrP^{Sc} und

rek PrP (90-231) enthielten, zunächst 60 h inkubiert und mittels ThT-Assay analysiert. Im Anschluss wurden mittels differentieller Ultrazentrifugation Überstand und Pellet voneinander getrennt, das Pellet in 100 μ l H₂O aufgenommen und ein Aliquot für die EM-Aufnahmen entnommen. Außerdem wurde ein Aliquot des aus der NaPTA-Fällung resultierenden Pellets (PrP^{Sc}) betrachtet. Die weitere Probenvorbereitung sowie die Aufnahmen wurden freundlicher Weise von Jan Stöhr wie in Kapitel 2.14 beschrieben, durchgeführt. Abbildung 3.17 A zeigt eine Übersichtsaufnahme (Vergrößerung: 11.500) der PrP^{Sc}-Präparation mit vielen verstreut liegenden Aggregaten. In Abb. 3.17 B ist eine Detailaufnahme (Vergrößerung: 50.000) einer typischen, vorherrschenden Aggregatstruktur der Präparation dargestellt. Hierbei handelt es sich um ein PrP^{Sc}-Aggregat, welches keine sichtbaren fibrillären Strukturen ausweist.

In den Ansätzen zur keiminduzierten Fibrillogenese von rek PrP (90-231) durch PrP^{Sc} (Abb. 3.18) herrschen zwei unterschiedliche Strukturen vor. Zum einen konnten wiederum Aggregatstrukturen identifiziert werden, die keine sichtbaren fibrillären Strukturen ausweisen. Diese Aggregate sind in Abbildung 3.18 C und D jeweils in der Bildmitte zu sehen. Auf Grund der Ähnlichkeit zu den, in der PrP^{Sc}-Präparation entdeckten Aggregaten, ist mit hoher Wahrscheinlichkeit anzunehmen, dass es sich auch hierbei um PrP^{Sc} handelt. Zum anderen wurden in diesen Ansätzen lange, faserartige Strukturen detektiert (Abb. 3.18 A und B). Das Auftreten dieser Strukturen korreliert mit dem gemessenen Anstieg der Fluoreszenz im ThT-Assay nach Zugabe von rek PrP (90-231) zu PrP^{Sc}. Da zudem diese fibrillären Strukturen in der PrP^{Sc}-

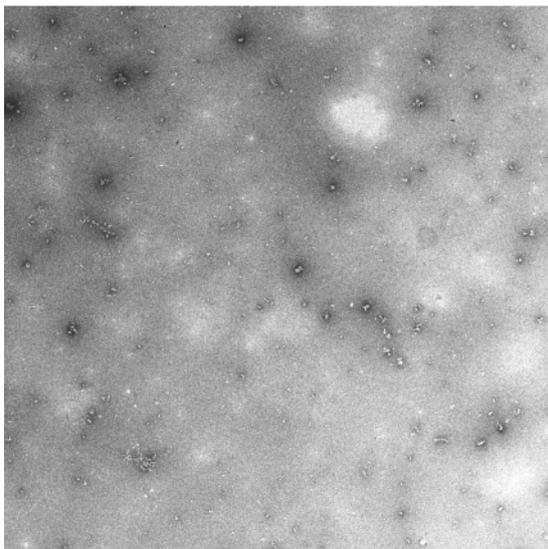
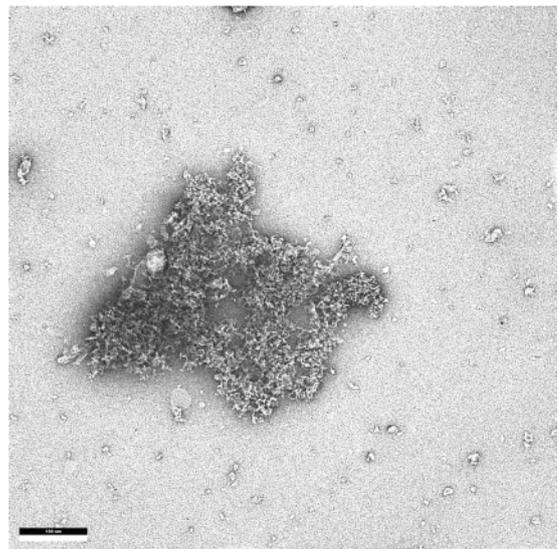
A**B**

Abb. 3.17: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer PrP^{Sc}-Präparation

A Übersicht (Vergrößerung: 11.500)

B Detailaufnahme (Vergrößerung: 50000)

(Größenstandard: 100 nm)

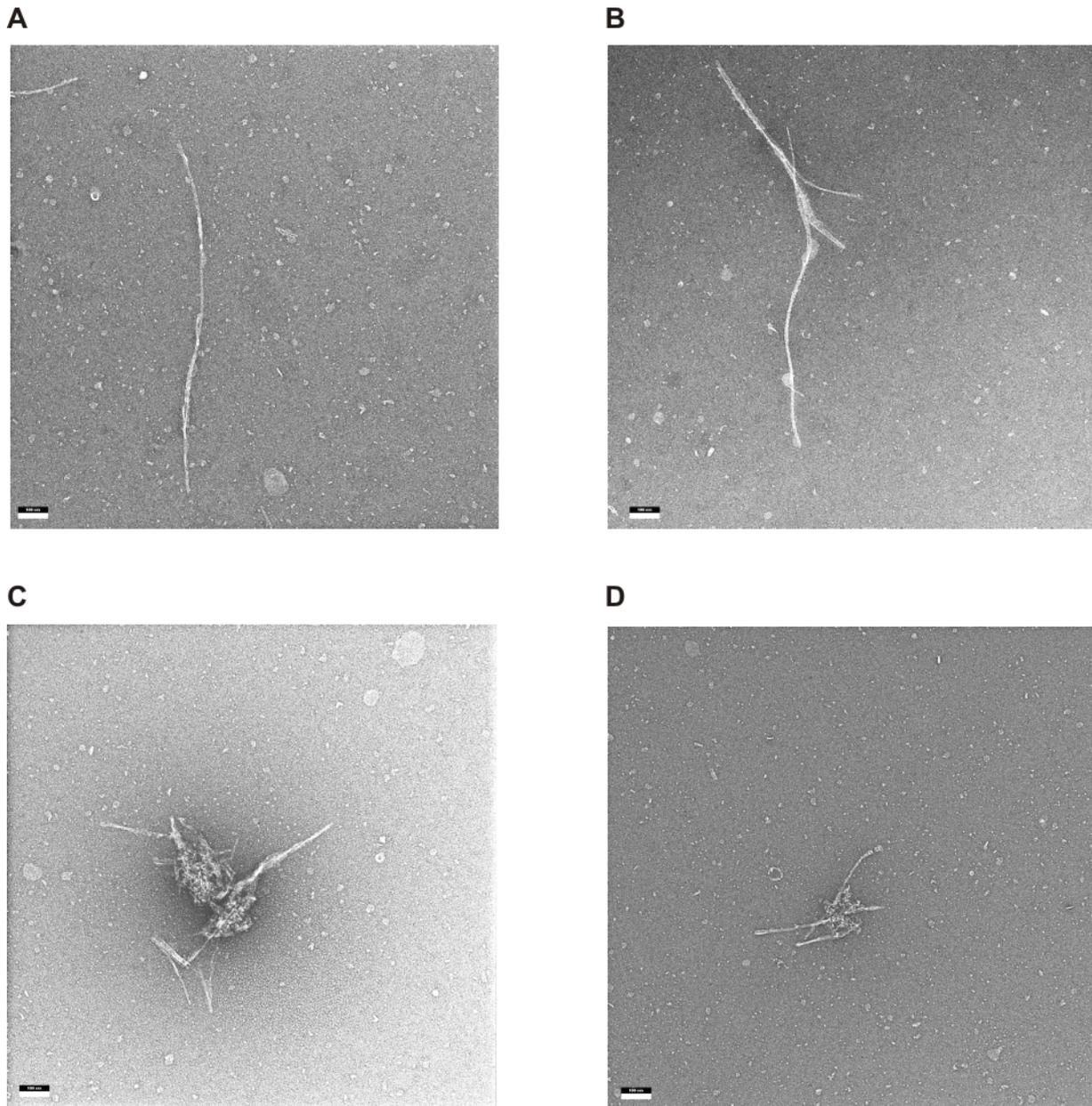


Abb. 3.18: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der in Anwesenheit von PrP^{Sc} gebildeten rek PrP-Fasern

Ansätze mit PrP^{Sc} ($1,25 \times 10^{-4}$ HÄ/ μ l) und rek PrP (90-231) (80 ng/ μ l) wurden zunächst 60 h im ThT-Assay analysiert. Im Anschluss wurden mittels differentieller Ultrazentrifugation Überstand und Pellet voneinander getrennt, das Pellet in 100 μ l H₂O aufgenommen und ein Aliquot für die EM-Aufnahmen entnommen.

A und **B** Fasern aus rek PrP (90-231)

C und **D** Aggregatstruktur umgeben von rek PrP (90-231)-Fasern

(Größenstandard: 100 nm; Vergrößerung: 25.000)

Präparation nicht auftraten, handelt es sich hierbei höchstwahrscheinlich um Fasern, die aus rek PrP (90-231) gebildet worden sind. In gewisser Weise spektakulärer für diese Arbeit sind die Abbildungen 3.18 C und D; zeigen sie doch, wie die Fibrillen (wahrscheinlich rek PrP (90-231)) aus den PrP^{Sc}-Keimen herauswachsen.

Somit wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden, ThT-Assay und Elektronenmikroskopie, bestätigt, dass rek PrP (90-231) in Anwesenheit von PrP^{Sc} unter den gewählten Bedingungen innerhalb einiger Stunden fibrilläre Strukturen ausbildet.

3.2.5. Induktion der Fibrillenbildung bei CHO-PrP^C

Nachdem es gelungen war, mit rek PrP eine Fibrillenbildung durch spezifische Keime zu induzieren, wurde zunächst versucht, dieses System auf CHO-PrP^C zu übertragen. CHO-PrP^C entspricht im Gegensatz zu rek PrP nicht nur der vollen Länge des Prionproteins, sondern ist auch vollständig modifiziert, d.h. es trägt sowohl beide N-Glykosylierungen als auch den GPI-Anker. Durch die Verwendung von CHO-PrP^C kann der Einfluss dieser Modifikationen auf die Fibrillenbildung durch spezifische Keime analysiert werden. Außerdem besteht die gewünschte Möglichkeit, dass die neugebildeten Fibrillen den PrP^{Sc}-Keimen ähnlicher sind als mit rek PrP, sodass die Voraussetzung für ein amplifizierendes System besser wäre. Für die spontane Fibrillogenese von PrP^C, die innerhalb von 3 Wochen abläuft, ist es notwendig, die SDS-Konzentration auf 0,0075 % gegenüber den Bedingungen für rek PrP zu erniedrigen (persönliche Mitteilung von J. Stöhr). Für die Übertragung des Systems der keiminduzierten Fibrillenbildung auf CHO-PrP^C wurde daher auch hier die niedrigere SDS-Konzentration gewählt. Für Ansätze mit rek PrP (90-231) wurde die SDS-Konzentration von 0,025 % SDS aber beibehalten. Abbildung 3.19 zeigt die Kinetik der keiminduzierten Fibrillenbildung von CHO-PrP^C und rek PrP (90-231) im Vergleich. Bei gleichen eingesetzten molaren Mengen an CHO-PrP^C und rek PrP ist bei CHO-PrP^C eine deutlich beschleunigte Fibrillenbildung zu beobachten. Bei rek PrP tritt in dieser niedrigen Konzentration eine deutliche Verzögerung auf, bis es schließlich auch hier zu einem Anstieg der Fluoreszenz kommt. Auch der erreichte Signalendwert liegt bei CHO-PrP^C etwa doppelt so hoch wie bei rek PrP.

Mit CHO-PrP^C als Monomer kann also bereits in geringen Konzentrationen eine deutliche Zunahme des Signals in den Proben mit PrP^{Sc} registriert werden. Zum Erreichen einer vergleichbaren Signalstärke werden mit rek PrP deutlich höhere Konzentrationen benötigt. Trotz dieser Tatsache wurden die weiteren detaillierten Untersuchungen zur keiminduzierten Fibrillogenese mit rek PrP (90-231) als Monomer durchgeführt, da dieses im Gegensatz zum CHO-PrP^C in ausreichender Menge zur Verfügung stand.

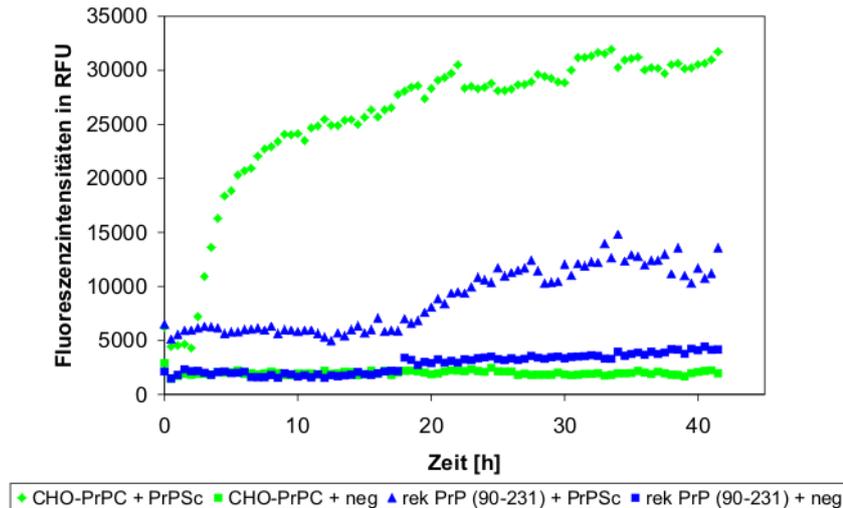


Abb. 3.19: Kinetik der Keiminduzierten Fibrillogenese: rek PrP und CHO-PrP^C im Vergleich

ThT-Assay: Die Messungen wurden in 10 mM NaPi, pH 7,2 mit 0,025 % SDS (rek PrP (90-231)), blaue Datenpunkte) oder 0,0075 % SDS (CHO-PrP^C, grüne Datenpunkte) und 250 mM NaCl in Anwesenheit von 5 μ M ThT durchgeführt. Das Probenvolumen betrug jeweils 150 μ l. Die verschiedenen Ansätze enthielten 860 nM Monomer (rek PrP (90-231): 14 ng/ μ l; CHO-PrP^C: 30 ng/ μ l) mit ggf. $1,6 \times 10^{-4}$ HÄ/ μ l PrP^{Sc} oder der entsprechenden Negativkontrolle (neg). Die Proben wurden über 42 h alle 15 min gemessen. Vor jeder Messung wurden die Proben 30 s geschüttelt. Die Temperatur betrug während der gesamten Laufzeit 37°C. (Gain: 180; Z-Position: 4992 μ m)

3.2.6. Einfluss der Monomerkonzentration auf die keiminduzierte Fibrillenbildung

Da nun Bedingungen etabliert waren, unter denen rek PrP (90-231) in Anwesenheit von PrP^{Sc} Fibrillen ausbildet, sowie mit dem ThT-Assay eine geeignete Messmethode zur Verfügung stand, um diese nachzuweisen, konnten im Folgenden mit dem hier etablierten System systematische Optimierungsuntersuchungen zur keiminduzierten Fibrillenbildung durchgeführt werden.

Zunächst wurde der Einfluss der Monomerkonzentration auf die Kinetik der Fibrillogenese genauer untersucht. Hierzu wurden Proben mit unterschiedlichen rek PrP-Konzentrationen, aber gleicher Menge PrP^{Sc} als Keim, für 24 h mittels ThT-Assay analysiert. Abbildung 3.20 zeigt die Zunahme der relativen Fluoreszenz dieser Proben über die Zeit. Bei einem Vergleich der Kurven der verschiedenen rek PrP-Konzentrationen fallen drei Tatsachen auf: 1. Je geringer die eingesetzte Monomerkonzentration ist, desto länger ist die Verzögerung oder auch Lag-Phase, also die Phase bevor ein deutlicher Anstieg in der Fluoreszenz auftritt. 2. Je höher die eingesetzte rek PrP-Konzentration ist, desto steiler fällt der Kurvenverlauf des

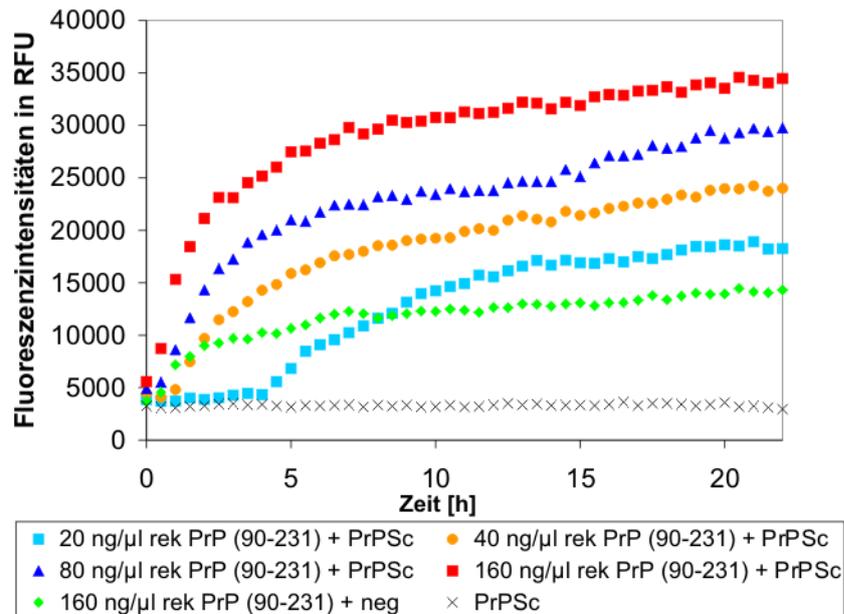


Abb. 3.20: Einfluss der Monomerkonzentration auf die Fibrillogenese von rek PrP

ThT-Assay: Die Messungen wurden in 10 mM NaPi, pH 7,2 mit 0,025 % SDS und 250 mM NaCl in Anwesenheit von 5 μ M ThT durchgeführt. Das Probenvolumen betrug jeweils 150 μ l. Die Ansätze enthielten verschiedene Konzentrationen rek PrP (90-231) (20, 40, 80 und 160 ng/ μ l) mit $1,6 \times 10^{-4}$ HÄ/ μ l PrP^{Sc}. Als Kontrollen dienten $1,6 \times 10^{-4}$ HÄ/ μ l PrP^{Sc} sowie eine Negativkontrolle (neg) mit 160 ng/ μ l rek PrP (90-231). Die Proben wurden direkt nach dem Ansetzen über 24 h alle 30 min gemessen. Vor jeder Messung wurden die Proben 30 s geschüttelt. Die Temperatur betrug während der gesamten Laufzeit 37°C. (Gain: 170; Z-Position: 4992 μ m)

Fluoreszenzanstiegs aus. 3. Je höher die eingesetzte rek PrP-Konzentration ist, desto höher ist außerdem der nach 24 h erreichte Endwert in der Fluoreszenz. Auch in der Negativkontrolle (grüne Kurve) ist ein Fluoreszenzanstieg zu verzeichnen. Dieser fällt allerdings deutlich geringer aus als in allen anderen Ansätzen. Zudem wurde hier die höchste rek PrP-Konzentration von 160 ng/ μ l eingesetzt. Bei den bislang durchgeführten Experimenten lag die rek PrP-Konzentration in den Negativkontrollen bei 80 ng/ μ l. In diesen Fällen war keine Fluoreszenzzunahme zu verzeichnen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass bei einer zu hohen Konzentration an rek PrP eine spontane Aggregation einsetzt. Aus diesem Grund wurde bei den nachfolgenden Experimenten wieder für alle Ansätze eine rek PrP-Konzentration von 80 ng/ μ l gewählt.

Zusammenfassend kann die Aussage getroffen werden, dass ein Einfluss der Monomerkonzentration sowohl auf den Startpunkt der Fibrillogenese als auch auf deren Verlauf nachgewiesen werden konnte.

3.2.7. Einfluss der Keimkonzentration auf die keiminduzierte Fibrillenbildung

Die folgenden Experimente wurden aus zwei unterschiedlichen Gründen durchgeführt. Zum einen sollte der Einfluss der Keimmenge auf die Kinetik der Fibrillogenese genauer untersucht werden. Zum anderen sollte evaluiert werden, bei welcher minimalen PrP^{Sc}-Menge noch ein Anstieg in der Fluoreszenz bzw. ein Unterschied in den Proben mit PrP^{Sc} und den Negativkontrollen nachgewiesen werden kann. Um frühe Krankheitsstadien bei Tieren *in vitro* nachzustellen, wurde hierfür Hirnhomogenat von gesunden Tieren mit unterschiedlichen Mengen an Hirnhomogenat Scrapie-infizierter Tiere versetzt, so dass in den Proben verschiedene Mengen PrP^{Sc} bereits vor der Präparation vorlagen und dadurch ein frühes Stadium der Infektion simuliert werden sollte. Diese Proben wurden danach einer NaPTA-Fällung unterzogen und die resultierenden Pellets nach Einstellung der Pufferbedingungen und Zugabe von rek PrP in den ThT-Assay eingesetzt. Bei der höchsten

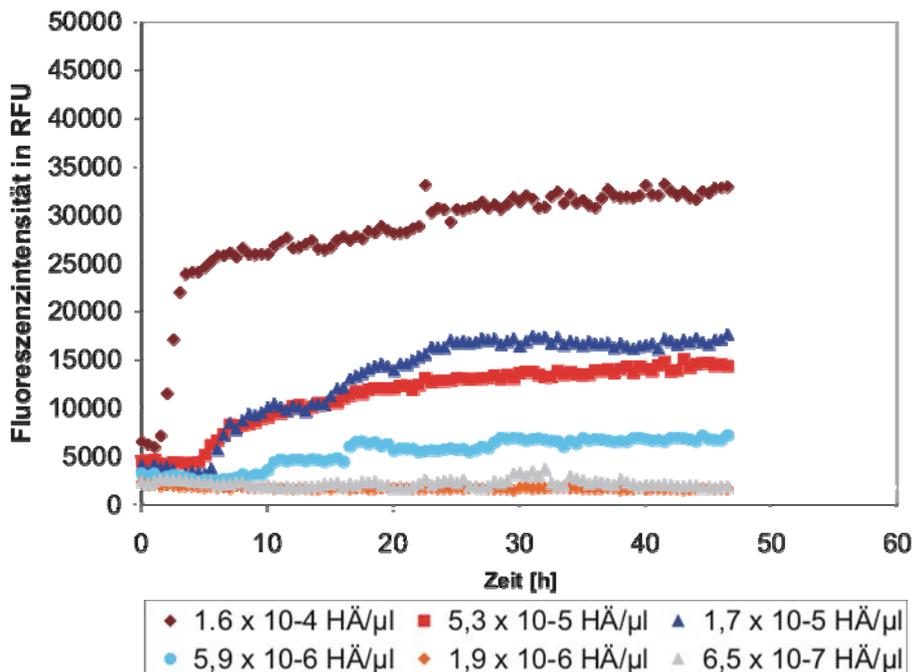


Abb. 3.21: Einfluss der PrP^{Sc}-Menge auf die Fibrillogenese von rek PrP

ThT-Assay: Hirnhomogenat von gesunden Tieren wurde mit unterschiedlichen Mengen an Hirnhomogenat Scrapie-infizierter Tiere versetzt. Diese Proben wurden danach einer NaPTA-Fällung unterzogen und die resultierenden Pellets nach Einstellung der Pufferbedingungen (10 mM NaPi, pH 7,2 mit 0,025 % SDS und 250 mM NaCl in Anwesenheit von 5 μM ThT) und Zugabe von rek PrP (80 ng/μl) in den ThT-Assay eingesetzt und über 46 h alle 30 min gemessen. Die in den Ansätzen jeweils enthaltenen PrP^{Sc}-Mengen sind in der Legende beschrieben (bezogen auf 150 μl Probenvolumen). Vor jeder Messung wurden die Proben 30 s geschüttelt. Die Temperatur betrug während der gesamten Laufzeit 37°C. (Gain: 180; Z-Position: 4992 μm)

PrP^{Sc}-Konzentration (1.6×10^{-4} HÄ/ μ l) (Abbildung 3.21) ist ein sehr steil verlaufender Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten. In dieser Probe ist mit über 30000 RFU auch der höchste Endwert zu verzeichnen. Die beiden Kurven mit den nächst geringeren Keimkonzentrationen ($5,3 \times 10^{-5}$ und $1,7 \times 10^{-5}$ HÄ/ μ l) unterscheiden sich nur minimal voneinander. Im Vergleich zu der Probe mit der höchsten Keimmenge beginnt bei ihnen der Fluoreszenzanstieg deutlich verzögert, verläuft nicht so steil und es wird mit etwa 15000 RFU ein geringerer Endwert erreicht. Bei der Probe mit $5,9 \times 10^{-6}$ HÄ/ μ l PrP^{Sc} kann ebenfalls noch eine Fluoreszenzsteigerung detektiert werden, jedoch ist der Anstieg der Fluoreszenz hier noch flacher und beginnt noch später. Erst bei Keimkonzentrationen von $1,9 \times 10^{-6}$ bzw. $6,5 \times 10^{-7}$ HÄ/ μ l PrP^{Sc} ist kein Anstieg in der Fluoreszenz mehr zu beobachten.

Ebenso wie für die Monomerkonzentration konnte auch für die PrP^{Sc}-Menge ein Einfluss sowohl auf den Startzeitpunkt der Fibrillogenese als auch auf deren Verlauf nachgewiesen werden.

3.2.8. Einfluss von Ultraschallbehandlung auf die keiminduzierte Fibrillenbildung

Wie in Kapitel 1.9 ausführlich beschrieben, nutzen bestehende Systeme zur Amplifizierung von Prionprotein-Aggregaten in Hirnhomogenat die Wirkung von Ultraschall aus, um gebildete Aggregate wieder zu fragmentieren und damit die Anzahl der Keime zu erhöhen. Der Einfluss einer Vorbehandlung der Proben mit Ultraschall auf das hier etablierte System zur keiminduzierten Fibrillenbildung wurde untersucht. Es wurde erwartet, dass durch die Ultraschallbehandlung PrP^{Sc} in den Ansätzen homogener verteilt wird, und somit eine beschleunigte Ausbildung von Fibrillen stattfindet. Besonders bei nur geringen Mengen an PrP^{Sc} in den Proben sollte sich dieser Effekt verstärkt auswirken.

Aus diesem Grund wurde parallel zu dem zuvor beschriebenen Experiment eine zweite Messreihe durchgeführt. Es wurden die gleichen Proben angesetzt, nur wurden diese zunächst eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert und im Anschluss einer Ultraschallbehandlung (10 Pulse á 0,1 s bei 30 % Leistung) unterzogen. Diese Inkubations-/Ultraschallbehandlung wurde insgesamt sechsmal wiederholt. Danach wurde ThT in die Proben gegeben und diese über 46 h alle 30 min gemessen. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 3.22 A dargestellt. Bei einem direkten Vergleich der Diagramme aus Abbildung 3.21 und 3.22 A fällt auf, dass in den Proben, die einer Ultraschallbehandlung ausgesetzt waren, ein Anstieg in der Fluoreszenz direkt nach dem Start der Messung einsetzt. Lediglich in den beiden Proben mit den geringsten Mengen an PrP^{Sc} ($1,9 \times 10^{-6}$ bzw. $6,5 \times 10^{-7}$ HÄ/ μ l PrP^{Sc}) ist noch eine Verzögerung zu erkennen, bevor ein Fluoreszenzanstieg zu verzeichnen

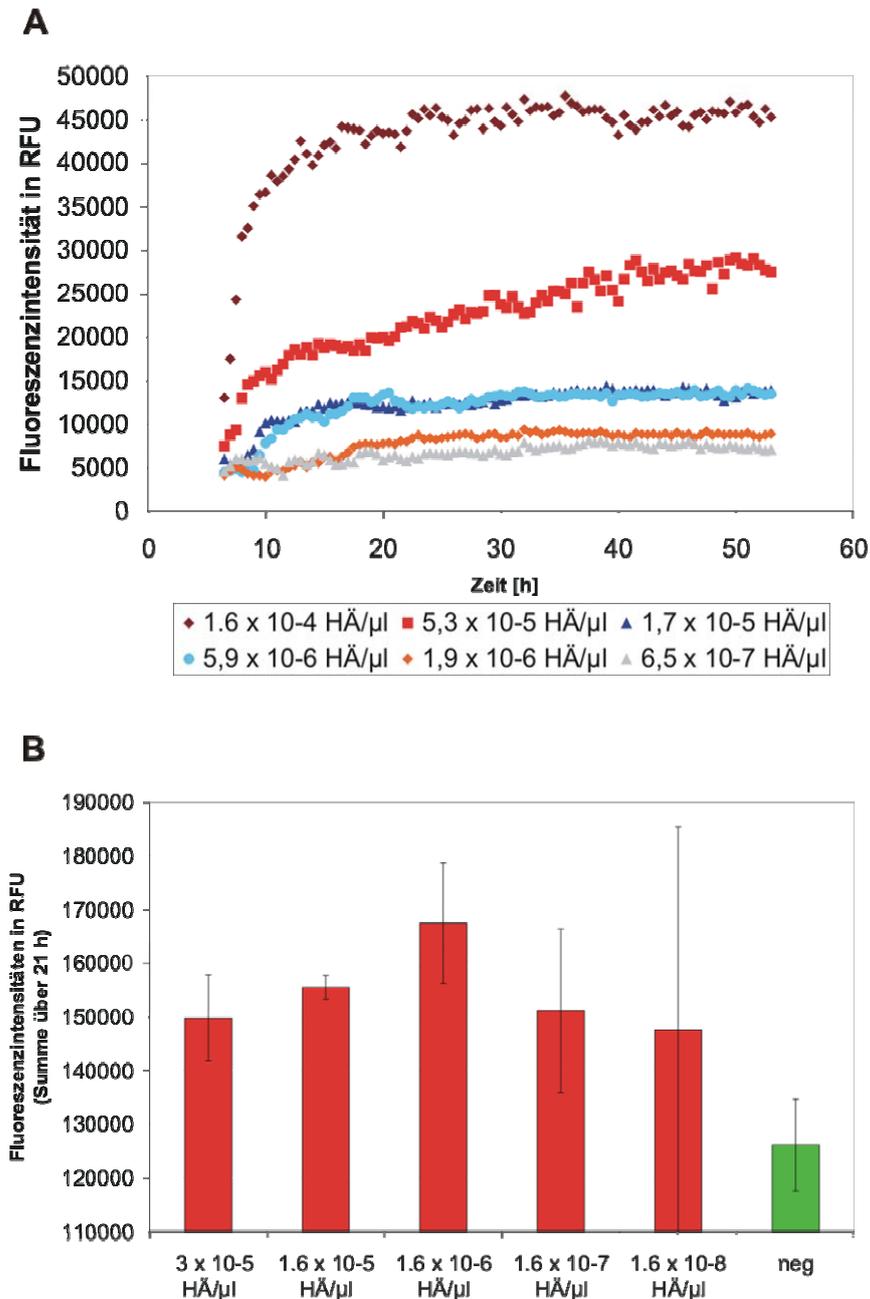


Abb. 3.22: Einfluss einer Ultraschallbehandlung auf die Fibrillognese

ThT-Assay: Hirnhomogenat von gesunden Tieren wurde mit unterschiedlichen Mengen an Hirnhomogenat Scrapie-infizierter Tiere versetzt. Diese Proben wurden danach mit NaPTA gefällt. Die resultierenden Pellets wurden nach Einstellung der Pufferbedingungen (10 mM NaPi pH 7,2 mit 0,025 % SDS und 250 mM NaCl) und Zugabe von rek PrP (80 ng/µl) sechs Inkubations- (1 h bei 37°C)/Ultraschall- (10 x 0.1 s bei 30 % Leistung) Zyklen unterzogen. Im Anschluss wurde ThT (5 µM) zu den Ansätzen gegeben und über 46 h alle 30 min gemessen. Die in den Ansätzen jeweils enthaltenen PrP^{Sc}-Mengen sind in der Legende beschrieben (bezogen auf 150 µl Probenvolumen). Vor jeder Messung wurden die Proben 30 s geschüttelt. Die Temperatur betrug während der gesamten Laufzeit 37°C. (Gain: 180; Z-Position: 4992 µm)

A PrP^{Sc}-Verdünnungsreihe von $1,6 \times 10^{-4}$ – $6,5 \times 10^{-7}$ HÄ/µl.

B PrP^{Sc}-Verdünnungsreihe von 3×10^{-5} – $1,6 \times 10^{-8}$ HÄ/µl (Doppelansätze) und Negativkontrolle. Zur Auswertung wurden jeweils alle Messungen der ersten 21 h aufsummiert und der Mittelwert der beiden Messreihen gebildet.

ist. Bei diesen geringen Keimmengen konnte zuvor, also ohne Ultraschallbehandlung, keine Signalerhöhung mehr detektiert werden. Ein zweiter wichtiger Effekt der Ultraschallbehandlung der Proben ist die Tatsache, dass in fast allen Proben höhere Fluoreszenzwerte erreicht werden als zuvor. Einzig die Probe mit $1,7 \times 10^{-5}$ HÄ/ μ l stellt hier eine Ausnahme dar. Die Ultraschallbehandlung der Proben hat das hier etablierte System zum Nachweis geringer Mengen an PrP^{Sc} somit deutlich verbessert. Im Folgenden wurde die Nachweisgrenze des Systems bestimmt. Hierfür wurde erneut Hirnhomogenat Scrapie-infizierter Tiere in Hirnhomogenat von gesunden Tieren verdünnt. Auf diese Weise wurden Verdünnungen des Hirnhomogenats Scrapie-infizierter Tiere von bis zu 1/10.000 hergestellt. Von jeder Verdünnung wurden Doppelansätze hergestellt. Anschließend wurden die Proben einer NaPTA-Fällung unterzogen und die resultierenden Pellets nach Einstellung der Pufferbedingungen und Zugabe von rek PrP den oben beschriebenen Inkubations-/Ultraschallzyklen für 6 h ausgesetzt. Danach wurde die ThT-Messung gestartet. Zur Darstellung (Abb. 3.22 B) wurden jeweils alle Daten der Messungen der ersten 21 h aufsummiert und der Mittelwert der beiden Messreihen gebildet. Zunächst fällt auf, dass kein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Keimmenge und dem detektierten Signal besteht. Das Signal in den Proben mit 3×10^{-5} und $1,6 \times 10^{-5}$ HÄ/ μ l ist geringer als in der folgenden Verdünnung ($1,6 \times 10^{-6}$ HÄ / μ). Danach fällt das Signal wie erwartet mit steigender Verdünnung ab. In der Probe mit der geringsten PrP^{Sc}-Menge ($1,6 \times 10^{-8}$ HÄ / μ) wurden, wie an der Standardabweichung zu erkennen ist, große Unterschiede zwischen den Proben der beiden Messreihen detektiert. Nur in diesem Fall ist eine signifikante Unterscheidung zwischen den Proben infizierter Tiere und den Negativkontrollen nicht mehr möglich.

Mittels des hier etablierten Systems konnten PrP^{Sc}-Mengen bis zu einer Verdünnung von $1,6 \times 10^{-7}$ HÄ/ μ l in einer Probe nachgewiesen und eindeutig von Proben aus dem Hirnhomogenat gesunder Tiere unterschieden werden.

4 Diskussion

Bis heute ist der Mechanismus der Replikation von Prionen nicht endgültig geklärt. Sicher ist, dass das Prionprotein der Hauptbestandteil des infektiösen Agens ist. Das wichtigste Ereignis während der Replikation des Erregers ist der strukturelle Übergang von der zellulären, hauptsächlich α -helikalen, löslichen Isoform PrP^C in die pathogene Form, PrP^{Sc}, die einen hohen Anteil an β -Faltblattstruktur aufweist und während des Krankheitsverlaufs zu Ablagerungen akkumuliert. Diese Proteinablagerungen können diffuser oder fibrillärer Natur sein und weisen eine partielle proteolytische Resistenz auf. Die Akkumulation von PrP^{Sc} ist zur Zeit der einzige bekannte spezifische Marker für alle Prionkrankheiten und die PK-Resistenz wird bei allen zugelassenen BSE-Tests zur Diagnose ausgenutzt. Die bisher erhältlichen Testverfahren diagnostizieren die Krankheit erst mit dem Einsetzen der klinischen Symptome oder im günstigsten Fall einige Monate vorher. Es werden aber dringend Testverfahren benötigt, die die Krankheit schon sehr viel früher diagnostizieren können, um Ausbreitungen effektiv zu verhindern. Übertragungspotentiale bestehen z.B. bei vCJD in der Medizin über Bluttransfusionen oder Transplantate, bezüglich BSE in der Nahrungsmittelindustrie, sowie in der Herstellung von Pharmazeutika. Ein möglichst empfindlicher Nachweis der PrP^{Sc}-Aggregate ist also dringend erforderlich.

Ziel dieser Arbeit war es, ein *in vitro*-System zur Vermehrung von PrP^{Sc}-Aggregaten mit aufgereinigten Komponenten zu entwickeln. Die Etablierung eines solchen Systems sollte in zweifacher Hinsicht einen Fortschritt für die Prionforschung bedeuten: Erstens sollte es durch die Vervielfältigung der PrP^{Sc}-Einheiten möglich sein, geringste Mengen an PrP^{Sc} nachzuweisen. Die Verwendung aufgereinigter Komponenten gewährleistet in dieser Hinsicht eine sichere Verfügbarkeit der Substanzen für die Diagnose. Zweitens kann der Einsatz von wohl definierten, aufgereinigten Komponenten in diesem *in vitro*-System einen Einblick in den Mechanismus der Fibrillogenese ermöglichen.

Zur Realisierung des Projekts wurde zuerst das Prinzip der Anlagerung von PrP^C an PrP^{Sc} und die anschließende Konformationsänderung von PrP^C etabliert und nachfolgend optimiert. Hierbei sollte die spontane von der keiminduzierten Konversion unterschieden werden können. Die Konformationsänderung beinhaltet die Ausbildung von Eigenschaften wie Unlöslichkeit, β -Faltblatt-Struktur, Proteinase K- (PK-) Resistenz und Fibrillenbildung. Zum Nachweis dieser Eigenschaften standen die

Tab. 4.1: Methoden zum Nachweis spezifischer Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}

Nachweismethode	Eigenschaft	PrP ^C	PrP ^{Sc}
differentielle Ultrazentrifugation	Löslichkeit	löslich (in milden Detergenzien)	unlöslich
Circular Dichroismus	Sekundärstruktur	α -helikal dominierte Struktur	β -Faltblatt-dominierte Struktur
PK-Verdauung	Protease K-Sensitivität	vollständig abbaubar	teilweise C-terminal resistent
Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	Aggregationszustand	monomer	hochmolekulare Aggregate
ThioflavinT-Test/ Elektronenmikroskopie	Ultrastruktur	α -helikale Monomer (nicht detektierbar)	fibrilläre und/oder amorphe Aggregate

Methoden der differentiellen Ultrazentrifugation, Circular Dichroismus (CD), Verdauung mit PK, Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), sowie der ThioflavinT- (ThT-) Test zur Verfügung (s. Tab. 4.1). Für die Entwicklung des Systems war es hinreichend, eine der neu ausgebildeten Eigenschaften spezifisch nachzuweisen. Als Schwierigkeit erwies sich hierbei die Unterdrückung der spontanen Konversion von PrP^C unter gleichen Lösungsmittelbedingungen in Abwesenheit von Nukleationskeimen.

Sowohl auf Seiten der Monomere als auch auf Seiten der Keime standen verschiedene Formen von PrP zur Auswahl. Durch systematische Kombination dieser PrP-Formen und mehrmaliger Variation der Lösungsmittelbedingungen gelang es schließlich, die am Besten geeigneten Ausgangsmaterialien, sowie optimale Lösungsmittelbedingungen für eine keiminduzierte Anlagerung zu finden.

4.1 Etablierung eines *in vitro*-Systems zur keiminduzierten Aggregation

Wie bereits erwähnt beschäftigte sich ein Großteil dieser Arbeit mit der Wahl der optimalen PrP-Formen, was sowohl für die Wahl der Keime, als auch für anzulagerndes PrP gilt, und der Optimierung der Lösungsmittelbedingungen für eine erfolgreiche Anlagerung und Konformationsumwandlung der monomeren PrP-Formen in Anwesenheit der Keime. Diese Aspekte werden in den nächsten Abschnitten diskutiert.

4.1.1 Verschiedene Prionproteine als Nukleationskeim

Als Nukleationskeime standen drei verschiedene PrP-Formen zur Verfügung: 1. Aus rekombinantem PrP (rek PrP) hergestellte Aggregate als Modellsystem, 2. die durch

PK-Verdauung N-terminal verkürzte Form natürlicher Prionen, PrP (27-30), sowie 3. mittels NaPTA-Fällung aus Hamsterhirnhomogenat isoliertes PrP^{Sc}.

Zunächst wurden als Modellsystem synthetische Keime aus rek PrP (29-231) gewählt, da dieses in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Anhand dieses Modellsystems sollten die Bedingungen für eine keiminduzierte Aggregation optimiert und später auf die Verwendung von natürlichen Keimen (PrP (27-30), PrP^{Sc}) übertragen werden. Die synthetischen Keime weisen die PrP^{Sc}-spezifischen Eigenschaften der Aggregatbildung und damit einhergehender Unlöslichkeit, sowie einen erhöhten β -Faltblattanteil auf (Post *et al.*, 1998). Es zeigte sich jedoch, dass diese Eigenschaften nicht ausreichen, um bei monomerem PrP eine deutliche Konformationsänderung hervorzurufen (vgl. Kap. 3.1.1). Idealerweise sollte nahezu alles vorhandene Monomer in Anwesenheit der Keime in einen unlöslichen Zustand übergehen. Bei den durchgeführten Experimenten blieb allerdings der größte Anteil an rek PrP (90-231), welches als Monomer eingesetzt wurde, löslich. Zudem tauchte das Problem auf, dass bei Lösungsmittelbedingungen, unter denen die unerwünschte spontane Aggregation der Monomere unterdrückt werden konnte, die vorgebildeten, synthetischen Aggregate wieder aufgelöst wurden. Aus diesen Gründen und der Intention, ein für diagnostische Zwecke anwendbares System zu etablieren, wurden folgende Experimente mit natürlichen Keimen durchgeführt.

Nachfolgend wurde PrP (27-30) eingesetzt, da zu diesem Zeitpunkt die Präparationsmethoden für dieses Material in unserem Institut bereits etabliert waren (Post, 1998; Schäfer, 2002). Die Aufreinigungsprotokolle beinhalten eine Verdauung mit PK. Somit erfolgt die Isolierung der N-terminal verkürzten Form von PrP^{Sc}. In diesen Keimen konnte eine PK-Restaktivität nachgewiesen werden (vgl. Kap. 3.1.2.1), die ausreichte, um vorhandenes rek PrP zu verdauen. Auch durch mehrmaliges Waschen des Aufreinigungsproduktes konnte diese PK-Restaktivität nicht entfernt werden. Durch die Verwendung von Substanzen zur Inaktivierung von PK, wie z.B. Phenylmethylsulfonyl Fluorid (PMSF), konnte die PK-Restaktivität zwar eliminiert werden, gleichzeitig wirken diese Substanzen aber als eine Art unspezifischer Nukleationskeim für monomeres PrP, was zu einer Aggregation desselben führt (s. Abb. 3.4). Eine Verstärkung der Aggregation der Monomere durch Zugabe von PMSF behandeltem PrP (27-30) konnte nicht nachgewiesen werden. Bei der Verwendung von PrP (27-30) trat noch ein weiteres Problem auf. PrP (27-30) bildet zwar unlösliche Aggregate aus, wurde aber dennoch nach differentieller Ultrazentrifugation unter den gewählten Lösungsmittelbedingungen (10 mM NaPi mit SDS) in einigen Fällen im Überstand detektiert (s. Abb. 3.5). Dieser Effekt wurde nicht auf ein Auflösen der PrP (27-30)-Aggregate zurückgeführt, vielmehr kann er als eine Art Flotieren der Aggregate beschrieben werden. Dieses Verhalten könnte durch die Anwesenheit von Lipiden in den PrP (27-30)-Präparationen hervorgerufen werden (Riesner *et al.*,

1996). Aber auch dann sollte eine Abhängigkeit dieses Effekts von der SDS-Konzentration zu verzeichnen sein, was in dieser Arbeit nicht der Fall war. Es konnte nicht genau geklärt werden, warum das Verhalten dieser PrP (27-30)-Präparation nicht mit Literaturdaten übereinstimmt. Aus den verschiedenen beschriebenen Gründen erwies sich PrP (27-30) als ungeeignet für die Etablierung der Anlagerung von monomerem PrP an Keime.

Im Verlauf dieser Arbeit wurde das ursprünglich von Safar *et al.* (1998) publizierte Protokoll der NaPTA-Fällung zur Aufreinigung von PrP^{Sc} in unserer Arbeitsgruppe in modifizierter Weise etabliert (Birkmann, 2005). Mittels NaPTA-Fällung wird PrP^{Sc} selektiv aufgereinigt und von PrP^C getrennt. Auf einen Aufreinigungsschritt mit PK kann hierbei gänzlich verzichtet werden. Eine PK-Restaktivität in den Präparationen, wie sie bei PrP (27-30) zu verzeichnen war, ist somit ausgeschlossen. Mit der Aufreinigung von PrP^{Sc} stand für weitere Untersuchungen nun ein natürlicher Keim zur Verfügung, der in dieser Form auch im erkrankten Organismus vorzufinden ist. Im Folgenden wurde nach den optimalen Lösungsmittelbedingungen gesucht, unter denen eine Anlagerung von monomerem PrP an PrP^{Sc} stattfindet.

4.1.2 Optimierung der Lösungsmittelbedingungen

Die ersten Experimente zur Anlagerung von monomerem PrP an Keime wurden in Anlehnung an das von Post *et al.* (1998) in unserer Arbeitsgruppe etablierte *in vitro*-Konversionssystem (10 mM NaPi, pH 7,2, geringe Konzentrationen des Detergenz SDS) durchgeführt (vgl. Kap. 1.7). Dieses Konversionssystem stellt die lösungsmittelbedingte Umwandlung von rek PrP (90-231) in Abwesenheit von Keimen nach. Die Umwandlung findet im Stundenbereich statt und impliziert in diesem System eine Zunahme der β -Faltblattstruktur einhergehend mit Unlöslichkeit und Aggregation. PK-Resistenz und Infektiosität konnte in den neu gebildeten Aggregaten nicht nachgewiesen werden. Es sollte zunächst untersucht werden, ob innerhalb dieses Systems Bedingungen definiert werden können, unter denen die Konversion nach Zugabe von Keimen induziert wird, wohingegen die Konversion in Abwesenheit der Keime noch nicht einsetzt.

Die Problematik, die bei der Verwendung synthetischer Keime aus rek PrP (29-231), sowie bei PrP (27-30) unter diesen Bedingungen auftrat, wurde bereits im vorherigen Abschnitt diskutiert. Diese beiden Keimspezies wurden aus den genannten Gründen auch bei folgenden Untersuchungen unter anderen Lösungsmittelbedingungen nicht mehr eingesetzt.

Erste Untersuchungen mittels 2D-Fluoreszenz-Intensitäts-Distributions-Analyse (FIDA) mit PrP^{Sc} als Keim, in NaPi unter Zugabe von SDS, sahen viel versprechend aus (vgl. Kap. 3.1.2.2). In den Proben mit Monomeren in Anwesenheit von PrP^{Sc} sind

viele große Aggregate vorhanden, was in einer hohen Signalstärke resultierte. Diese Proben sind anhand der Signalhöhe deutlich von den Negativkontrollen zu unterscheiden. Die Negativkontrollen weisen allerdings auch ein geringes Signal auf, so dass angenommen werden kann, dass auch hier wieder zu einem geringen Anteil spontane Aggregation stattgefunden hat. Analysen mittels differentieller Ultrazentrifugation zeigten diesen Effekt noch deutlicher (vgl. Abb. 3.8). Beim Versuch der Optimierung der Anlagerung von rek PrP an PrP^{Sc} musste leider festgestellt werden, dass das Ergebnis der 2D-FIDA nicht einheitlich reproduzierbar war.

Im Folgenden wurde der Versuch unternommen, die Anlagerung von rek PrP an PrP^{Sc} unter anderen Lösungsmittelbedingungen zu etablieren. Da mittlerweile in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass rek PrP (90-231) bei saurem pH-Wert ebenfalls löslich ist (Leffers *et al.*, 2004), wurden die nächsten Untersuchungen bei pH 4 in 1 mM NaAc ohne Zugabe von SDS durchgeführt (vgl. Kap. 3.1.2.2). Unter diesen Bedingungen konnte Aggregation von rek PrP durch Zugabe von PrP^{Sc} induziert werden, jedoch fand auch hier wieder spontane Aggregation von rek PrP statt, was zu einem Hintergrundsignal nach differentieller Ultrazentrifugation im Pellet führte (s. Abb. 3.10).

Durch einen erneuten Wechsel der Pufferbedingungen (10 mM NaAc, pH 4,5) gelang es, die keiminduzierte Aggregation von rek PrP zu verstärken, sowie das beschriebene Hintergrundsignal zu minimieren (s. Abb. 3.11 A). Vollständig konnte die spontane Aggregation aber nicht unterdrückt werden. FCS-Messungen gleicher Proben unter gleichen Bedingungen zeigten ein kaum messbares Hintergrundsignal in der Probe mit rek PrP (s. Abb. 3.11 B), gegenüber einem deutlichen Signal nach Keimzugabe. Für PrP^{Sc} ohne Zugabe eines Überschusses an rek PrP wurde allerdings ein noch höheres Signal detektiert. Bei dieser Messreihe wurden zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Antikörper als Sonden verwendet. Die Ergebnisse können dahin gehend interpretiert werden, dass die Antikörper mit rek PrP um Bindeplätze an den PrP^{Sc}-Aggregaten konkurrieren. Daneben besteht die Möglichkeit, dass die Antikörper auch an lösliches rek PrP, das im Überschuss vorhanden ist, binden und dadurch eine Anlagerung von rek PrP an die Keime oder die anschließende Konversion inhibieren. Dadurch wäre der Signalverlust in der Probe mit PrP^{Sc} und rek PrP gegenüber der Probe mit PrP^{Sc} ohne Zusatz von Monomeren zu erklären. Ähnliche Effekte sind bereits in der Literatur beschrieben (Peretz *et al.*, 2001; Miyamoto *et al.*, 2005). Dort wurden Antikörper bei der Suche nach Therapeutika gegen Prionerkrankungen gezielt eingesetzt, um die Konversion von PrP^C und somit den Wachstum vorhandener PrP^{Sc}-Aggregate zu unterbinden.

Mittlerweile verdichteten sich in der Literatur die Hinweise, dass Pufferbedingungen bei saurem pH-Wert wahrscheinlich nicht die optimalen Bedingungen für eine

erfolgreiche Konversion von PrP^C in eine PrP^{Sc}-ähnliche Konformation darstellen. So publizierten Supattapone und Mitarbeiter ein System zur Amplifikation von PK-resistentem PrP (Lucassen *et al.*, 2003). Dieses System lehnt sich stark an das von Soto etablierte System an (vgl. Kap. 1.9) und verwendet Hirnhomogenate als PrP^C und PrP^{Sc}-Quelle. Das pH-Optimum dieses Systems liegt im neutralen Bereich. Auch von Baskakov wurde ein *in vitro*-Konversionssystem vorgestellt, mittels dessen die Ausbildung fibrillärer Aggregate von rek PrP (90-231) mit der Sequenz des Hamsters induziert werden kann (Baskakov *et al.*, 2002). Er konnte nachweisen, dass bei saurem pH-Wert β -faltblattreiche Oligomere ausgebildet werden. Eine weitere Aggregation zu fibrillären Strukturen findet unter diesen Bedingungen allerdings nicht statt. Zur Aggregation, einhergehend mit der Ausbildung fibrillärer Strukturen kommt es nur unter Bedingungen bei neutralem pH-Wert.

Unter den bisher untersuchten Bedingungen gelang es nicht, eine deutlich messbare keimabhängige Aggregation der Monomere nachzuweisen. Dies mag darin begründet liegen, dass die Lösungsmittelbedingungen für spontane und keiminduzierte Aggregatbildung zu nahe beieinander liegen. Unter den gewählten Bedingungen liegen die Monomere nur knapp oberhalb ihrer Löslichkeitsgrenze. Mit den bislang angewendeten Nachweismethoden, differentielle Ultrazentrifugation und FCS, wurden nur die Eigenschaften der Löslichkeit und der Aggregatbildung untersucht. Mit diesen Methoden lassen sich spontan und keiminduziert gebildete Aggregate nicht unterscheiden. Zu diesem Zeitpunkt erschien es notwendig, auch die Qualität der gebildeten Aggregate auswerten zu können.

Aus den bis zu diesem Zeitpunkt erzielten Ergebnissen musste fast geschlossen werden, dass das Ziel dieser Arbeit überhaupt nicht zu erreichen ist. Glücklicherweise konnte aufgrund neuer Erkenntnisse aus unserer und anderen Arbeitsgruppen über die Fibrillenbildung von rek PrP eine völlig neue Strategie entwickelt werden, die im nächsten Kapitel ausführlich dargestellt wird.

4.2 Induktion von Fibrillenbildung

Wie in Kapitel 4.1.2 bereits erwähnt, wurden die ersten Experimente dieser Arbeit in Anlehnung an das von Post *et al.* etablierte *in vitro*-Konversionssystem durchgeführt. Leffers *et al.* (2005) erweiterte etwa zeitgleich mit dieser Arbeit das beschriebene System dahingehend, dass bei 0,03 % SDS in Anwesenheit von NaCl Aggregate mit fibrilläre Strukturen generiert werden (s. Abb. 1.4, Kap. 1.7). Allerdings sind hierfür sehr hohe Proteinkonzentrationen, sowie eine sehr lange Inkubationszeit von etwa 5 Wochen notwendig. Dies deutet darauf hin, dass das relativ schnelle Ausfallen von rek PrP (90-231) in Form amorpher Aggregate in Anwesenheit von NaCl verhindert

werden kann, und Aggregation verbunden mit ultrastruktureller Umformung zu Fibrillen in diesem System wesentlich langsamer abläuft.

Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Studien zur Fibrillogenese einen ganz anderen Hintergrund hatten als diese Arbeit. *In vitro*-Konversionssysteme zur Fibrillenbildung wurden etabliert, um *de novo*-Infektiosität *in vitro* zu generieren und damit den letztendlichen Beweis der Prionhypothese zu erbringen.

Einzig Prusiner und Mitarbeitern gelang es bis jetzt, in einem Konversionssystem, *in vitro* Infektiosität *de novo* zu erzeugen (Legname *et al.*, 2004). Mittels dieses Systems wurde verkürztes rek PrP (AS 89-230) der Sequenz der Maus in hohen Konzentrationen durch Inkubation in Anwesenheit von Harnstoff und Guanidiniumhydrochlorid ebenfalls in fibrilläre Strukturen überführt. Die auf diese Weise generierten rek PrP-Fibrillen wiesen eine geringe Infektiosität auf und wurden, zur Unterscheidung von natürlichen Prionen, als „synthetische Prionen“ bezeichnet. Die geringe Infektiosität der synthetischen Prionen konnte lediglich in transgenen Mäusen, welche ebenfalls eine verkürzte Form des Prionproteins überexprimieren, nachgewiesen werden. Nach einer zweiten Passage in Wildtyp-Mäuse, konnte allerdings nahezu kein Unterschied in der Inkubationszeit im Vergleich zur natürlichen Infektiosität festgestellt werden. Die erste Passage kann also als eine Art natürlicher Amplifikator der Infektiosität angesehen werden. Hierbei ist anzumerken, dass das in den transgenen Mäusen exprimierte, verkürzte PrP^C (89-230), im Gegensatz zu rek PrP (89-230), sämtliche posttranslationalen Modifikationen des natürlichen PrP^C trägt. Dies führt zu der Annahme, dass die Konversion in Anwesenheit der Modifikationen spezifischer abläuft als die Konversion von unmodifiziertem rek PrP.

Alle anderen Systeme zur *in vitro*-Konversion scheiterten bislang beim Versuch der *de novo* Generierung von Infektiosität (vgl. Kap. 1.7). In den verschiedenen Systemen konnten lediglich verschiedene PrP^{Sc}-spezifische Eigenschaften wie Zunahme der β -Struktur, Unlöslichkeit oder PK-Resistenz erzeugt werden. Das von der Arbeitsgruppe Prusiner entwickelte System hingegen basiert zusätzlich auf der Ausbildung von fibrillären Strukturen, wie sie auch in den mit TSE einhergehenden Proteinablagerungen vorzufinden sind. Da mittels dieses Systems zum ersten Mal die Erzeugung von *de novo*-Infektiosität gezeigt werden konnte, ist anzunehmen, dass die „richtige Umfaltung“ mit der Bildung von Fibrillen einhergeht und somit eine wichtige Rolle bei der Prionpropagation spielt.

Mit dem von Leffers erweiterten Konversionssystem stand auch in unserer Arbeitsgruppe ein System zur Verfügung, mittels dessen bei rek PrP (90-231) die Ausbildung von Fibrillen induziert werden kann. *De novo* Infektiosität konnte mit diesem System zwar nicht erzeugt werden, aber dennoch wurden wichtige Erkenntnisse über den Mechanismus der Fibrillenbildung erhalten. Es konnte gezeigt

werden, dass durch die Zugabe von NaCl ein teildenaturierter Zwischenzustand zwischen dem α -helikalen Dimer und dem β -faltblattreichen Oligomer stabilisiert wird, der einerseits noch gut löslich ist, sich andererseits nach langer Inkubation aber in Fibrillen umlagern kann (Leffers *et al.*, 2005). Das bedeutet, dass jetzt genau die Bedingungen gefunden waren, nach denen für diese Arbeit lange gesucht wurde: Bei identischen Lösungsmittelbedingungen existieren zwei Zustände: ein löslicher Zustand mit hoher Metastabilität und ein fibrillärer Zustand mit hoher Endstabilität, getrennt durch eine lange Inkubationszeit, d.h. eine hohe Aktivierungsbarriere.

Auf diesen Erkenntnissen aufbauend, wurde die weitere Etablierung der keiminduzierten Anlagerung von Monomeren in NaPi bei pH 7,2 in Anwesenheit von SDS und NaCl durchgeführt, und hinsichtlich der Ausbildung von Fibrillen untersucht. Die SDS-Konzentration wurde hierbei gegenüber den Experimenten von Leffers (0,03 % SDS) leicht variiert. Für eine gesteigerte Fibrillenausbeute wurden die Untersuchungen in 0,025 % SDS durchgeführt (persönliche Mitteilung J. Stöhr). Die gebildeten Fibrillen können mittels ThT-Assay (s. Kap. 2.16) spezifisch nachgewiesen werden. Eventuell stattfindende spontane, amorphe Aggregation sollte demnach kein Problem mehr darstellen, da die amorphen Aggregate mit dieser Nachweismethode nicht detektiert werden können. Mit allen anderen zur Verfügung stehenden Nachweismethoden, können amorphe und fibrilläre Aggregate nicht unterschieden werden (s. Tab. 4.2), da sie sich nur in ihrer Ultrastruktur unterscheiden.

Unter diesen Bedingungen zur Induktion von Fibrillenbildung konnte mittels ThT-Test zunächst gezeigt werden, dass die keiminduzierte Fibrillenbildung bereits innerhalb eines Zeitraumes von einer Woche abgelaufen ist, wohingegen die spontane Fibrillenbildung erst nach drei Wochen einsetzte (vgl. Kap. 3.2.2, Abb. 3.13 A). Der zeitliche Unterschied ist damit ausreichend groß, um die keiminduzierte Bildung von Fibrillen getrennt, also ohne störenden Einfluss von spontaner Fibrillenbildung,,

Tab. 4.2: Eigenschaften von amorphen Aggregaten und Fibrillen

Nachweismethode	Eigenschaft	amorphe Aggregate	Fibrillen
differentielle Ultrazentrifugation	Löslichkeit	unlöslich	unlöslich
Circular Dichroismus	Sekundärstruktur	β -Faltblatt-dominierte Struktur	β -Faltblatt-dominierte Struktur
Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	Aggregationszustand	hochmolekulare Aggregate	hochmolekulare Aggregate
ThioflavinT-Test	Ultrastruktur	amorph (nicht detektierbar)	fibrillär (detektierbar)

untersuchen zu können. Nach drei Wochen dagegen wiesen die Ansätze mit rek PrP (90-231) in An- und Abwesenheit von PrP^{Sc} im ThT-Assay nach gleich starke Signale auf. In FCS-Messungen der gleichen Proben hingegen war zu diesem Zeitpunkt in der Probe mit rek PrP (90-231) in Abwesenheit von PrP^{Sc} das höchste Signal zu verzeichnen (s. Abb. 3.13 B). Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass bei der spontanen Aggregation, ohne Zugabe von Keimen, nicht ausschließlich Fibrillen gebildet wurden sondern zusätzlich amorphe Aggregate, die nur mittels FCS detektiert werden konnten.

Im Folgenden konnte, durch die Etablierung der keiminduzierten Fibrillenbildung in Anwesenheit von ThT, die Kinetik der Fibrillogenese direkt, also während der Inkubation, verfolgt werden. Zuvor wurden von den Fibrillogeneseansätzen zu definierten Zeiten Aliquots entnommen, mit ThT versetzt und im Anschluss gemessen. Mit den ersten Untersuchungen zur Kinetik der Fibrillogenese konnte gezeigt werden, dass die Fibrillogenese von rek PrP (90-231) in Anwesenheit von PrP^{Sc} bereits nach einer kurzen Anlaufphase im Bereich von wenigen Stunden einsetzt (s. Abb. 3.14). Dieser Lag-Phase folgt eine Phase der schnellen Fibrillenbildung, die durch einen steilen Anstieg in der gemessenen Fluoreszenz beschrieben wird. Im Anschluss kommt es zwar auch weiterhin noch zu einer Zunahme der Fluoreszenz, allerdings deutlich langsamer. In allen Kontrollexperimenten war keine messbare Ausbildung fibrillärer Strukturen zu verzeichnen. Durch die Zugabe von rek PrP konnte somit das Signal des eingesetzten Keimes etwa um den Faktor 10 verstärkt werden. Damit konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal bei rek PrP eine deutlich messbare Fibrillenbildung durch Zugabe spezifischer Keime induziert werden, was zu einer Amplifikation der PrP^{Sc}-Aggregate führte. Weiterhin war es zum ersten Mal möglich, zwischen spontaner und keiminduzierter Fibrillenbildung zu unterscheiden, da die spontane unter diesen Bedingungen erst nach einigen Wochen einsetzt.

Die erste Stunde der keiminduzierten Fibrillenbildung, also der Bereich, in welchem mittels ThT-Test noch keine Fibrillenbildung nachgewiesen werden konnte, wurde im Anschluss genauer analysiert. Untersuchungen mittels FCS und CD ergaben, dass in dieser Phase bereits eine Aggregation von rek PrP an die vorhandenen Keime stattfindet (vgl. Kap. 3.2.3, Abb. 3.16). Auf diesen Daten basierend konnte ein Zwei-Stufen-Modell zur keiminduzierten Fibrillogenese aufgestellt werden. Nach diesem Modell lagern sich die Monomere zunächst in amorpher Form an die PrP^{Sc}-Keime an. Diese Aggregation stellt einen schnellen Prozess dar, der im Minutenbereich abläuft. Erst im Anschluss daran kommt es in einem zweiten Schritt zur Ausbildung fibrillärer Strukturen (s. Abb. 4.1). Ob im schnellen Bereich bereits β -Faltblattstruktur gebildet wird, wurde nicht geprüft, ist aber aufgrund früherer Arbeiten (Post *et al.*, 1998) wahrscheinlich.

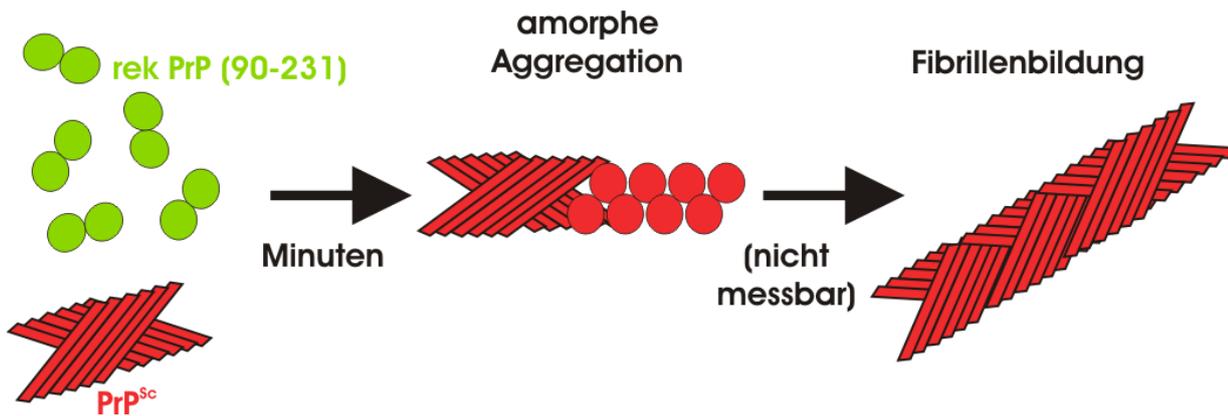


Abb. 4.1: Zwei-Stufen-Modell zur keiminduzierten Fibrillenbildung. Innerhalb von Minuten kommt es zur Ausbildung amorpher Aggregate. Erst im Anschluss daran findet Fibrillenbildung statt.

Um die im Stundenbereich gebildeten Aggregate aus rek PrP (90-231) noch genauer definieren zu können, wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt (vgl. Kap. 3.2.4). Die als Keime eingesetzten PrP^{Sc}-Aggregate weisen hierbei keine sichtbaren fibrillären Strukturen auf (s. Abb. 3.17). In den Ansätzen zur keiminduzierten Aggregation konnten diese Aggregate ebenfalls detektiert werden. Zusätzlich treten hier lange, faserartige Strukturen auf (s. Abb. 3.18 A, B), die in Abwesenheit von rek PrP nicht zu verzeichnen sind. Besonders beeindruckend sind die Aufnahmen zur keiminduzierten Aggregation, in denen Coaggregate aus den beiden beschriebenen Strukturen zu erkennen sind (s. Abb. 3.18 C, D): Die PrP^{Sc}-Aggregate sind von kurzen Fasern, die höchstwahrscheinlich aus rek PrP bestehen, umgeben. In diesen Aufnahmen scheint es fast so, als würden die Fibrillen aus den PrP^{Sc}-Keimen herauswachsen. Ob diese Fibrillen tatsächlich aus rek PrP (90-231) bestehen, könnte durch spezifische Antikörpermarkierung vor der Färbung der Präparate abschließend geklärt werden. Diese Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt.

Abschließend soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass mittels des hier angewendeten *in vitro*-Konversionssystems zur Bildung von Fibrillen aus rek PrP (90-231) ohne Keimzugabe bislang erst nach ca. 5 Wochen Fibrillen mittels EM nachgewiesen wurden (unpublizierte Daten). In dieser Arbeit konnte der Zeitraum bis zur Detektion von Fibrillen durch Zugabe von PrP^{Sc} auf einige Stunden verringert werden. Des Weiteren wurden in dieser Arbeit fünffach niedrigere rek PrP-Konzentrationen eingesetzt als in vergleichbaren Experimenten zur spontanen Fibrillenbildung.

4.3 Verschiedene Parameter beeinflussen die keiminduzierte Fibrillenbildung

Es stand nun ein stabiles Amplifikationssystem zur Verfügung, mittels dessen PrP^{Sc} im ThT-Test ohne Monomerzugabe nicht vom Hintergrund zu unterscheiden ist, während man in Gegenwart von rek PrP eine deutliche Verstärkung des Signal bei geringem Rauschen erhält. Dieses System sollte nun weiter systematisch untersucht und optimiert werden. Hauptsächlich sollte evaluiert werden, ob die Variation verschiedener Parameter, wie z.B. Monomer- und Keimkonzentration, einen Einfluss auf die Fibrillogenese ausübt.

4.3.1 Einfluss der Monomerkonzentration

Um den Einfluss der Monomerkonzentration auf die keiminduzierte Fibrillogenese zu untersuchen, wurde die rek PrP-Konzentration, bei gleich bleibender Keimkonzentration, von 20-160 ng/μl variiert (vgl. Kap. 3.2.6). Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Monomerkonzentration sowohl einen Einfluss auf den Startpunkt der Fibrillogenese, als auch auf deren Verlauf ausübt: Je geringer die eingesetzte Monomerkonzentration ist, desto länger dauert die Lag-Phase bis zum Einsetzen der Fibrillenbildung. Höhere Konzentrationen hingegen führen neben dem früheren Start der Fibrillogenese auch zu einer deutlich beschleunigten Bildung der fibrillären Strukturen, sowie zu einem höheren Fluoreszenzwert im ThT-Test (s. Abb. 3.20). Durch eine Erhöhung der Monomerkonzentration kann somit eine Beschleunigung der Fibrillenbildung erreicht werden.

Der gemessene Einfluss der Monomerkonzentration auf die Fibrillogenese kann mit dem Zwei-Stufen-Modell erklärt werden: Der erste Schritt, d.h. die Anlagerung ist ein Prozess pseudo 1. Ordnung, dessen Produktbildungsgeschwindigkeit von der im Überschuss vorliegenden Monomerkonzentration abhängig ist. Mit höherer Monomerkonzentration läuft dieser Prozess also in linearer Abhängigkeit schneller ab. Dieser Schritt konnte mittels FCS aufgelöst werden (s. Kap. 4.2; Abb. 4.1). Der zweite Schritt, das exponentielle Ansteigen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten im Anschluss an die Lag-Phase, kann durch zwei verschiedene Prozesse, die vermutlich parallel ablaufen, erklärt werden: 1. Der kooperativen Umwandlung der angelagerten Monomere innerhalb eines Aggregats und, für ein exponentielles Wachstum eindeutig wichtiger, 2. dem Zerschneiden der gewachsenen Keime, so dass mehr Keime gebildet werden und für weitere Anlagerung von Monomeren zur Verfügung stehen (Eigen, 2001). Der zweite Schritt setzt hierbei allerdings erst ein, wenn ein bestimmter Schwellenwert, z.B. eine bestimmte Fibrillengröße, erreicht ist. Bei höheren Monomerkonzentrationen wird dieser Schwellenwert früher erreicht als bei niedrigen, was zu den verschiedenen Lag-Phasen in Abhängigkeit von der eingesetzten

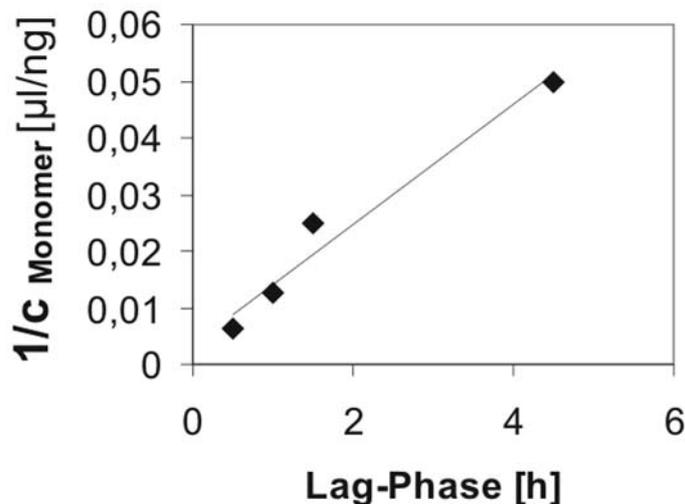


Abb. 4.2: Lineare Abhängigkeit der Lag-Phase von der Monomerkonzentration. Einfach reziproke Darstellung: Der Kehrwert der Monomerkonzentration ist gegen die gemessenen Lag-Phase, die aus den Daten grob abgeschätzt wurde, aufgetragen.

Monomerkonzentration führt. Abbildung 4.2 zeigt, dass ein linearer Zusammenhang zwischen der gemessenen Lag-Phase und der eingesetzten Monomerkonzentration besteht. Erst das Einsetzen des exponentiellen Wachstums konnte mittels ThT-Test erfasst werden.

Bei der Optimierung der keiminduzierten Fibrillogenese durch Erhöhung der Monomerkonzentration muss allerdings beachtet werden, dass auch die spontane Fibrillenbildung von rek PrP von höheren Konzentrationen (160 ng/µl) positiv beeinflusst wird, was zu einer Fibrillenbildung in den Negativkontrollen führt. Für die Negativkontrollen wird Hirnhomogenat gesunder Tiere mittels NaPTA-Fällung aufgereinigt und das resultierende Pellet den Fibrillogeneseansätzen zugeführt. Nach SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung dieser Pelletfraktion können einige, wenig prominente Proteinbanden detektiert werden (Birkmann, 2005). Es ist also nicht auszuschließen, dass mit der Negativkontrolle unspezifische Keime zugeführt werden, die bei hoher Monomerkonzentration hier die Fibrillogenese induzieren. Da ein wichtiger Aspekt dieser Arbeit die Etablierung eines für diagnostische Zwecke nutzbaren Systems war, muss hier deutlich zwischen positiven Proben, mit PrP^{Sc}, und den negativen Proben unterschieden werden können. Eine einsetzende Fibrillenbildung in den Negativkontrollen ist somit unerwünscht. Die Monomerkonzentration muss für die Ansätze also so gewählt werden, dass es in Anwesenheit spezifischer Keime zur Ausbildung von Fibrillen kommt, in den Negativkontrollen hingegen nicht. Aus diesem Grund wurde die ursprünglich eingesetzte rek PrP-Konzentration von 80 ng/µl für die folgenden Untersuchungen beibehalten und nicht erhöht. Unter diesen

Bedingungen konnte keine spontane Ausbildung fibrillärer Strukturen in den Kontrollansätzen nachgewiesen werden.

4.3.2 Einfluss der Keimkonzentration

Als nächstes wurde die Keimkonzentration in den Fibrillogenseansätzen variiert. Zum einem sollte damit der Einfluss der Keimmenge auf die Kinetik der Fibrillogense genauer untersucht werden, zum anderen sollte die minimale PrP^{Sc}-Menge, mit der noch ein Unterschied zu den Negativkontrollen nachgewiesen werden kann, bestimmt werden. Hierfür wurde Hirnhomogenat Scrapie-infizierter Tiere mit unterschiedlichen Mengen an Hirnhomogenat von gesunden Tieren versetzt, so dass in den Proben verschiedene Mengen PrP^{Sc} bereits vor der Präparation vorlagen. Damit sollte ein frühes Stadium der Infektion simuliert werden. Diese Proben wurden danach einer NaPTA-Fällung unterzogen und die resultierenden Pellets nach Einstellung der Pufferbedingungen und Zugabe von rek PrP in den ThT-Assay eingesetzt (vgl. Kap. 3.2.7). Es stellte sich heraus, dass die PrP^{Sc}-Menge ebenfalls einen Einfluss sowohl auf den Startzeitpunkt als auch auf den Verlauf der Fibrillogense ausübt: Mit Verringerung der eingesetzten Keimmenge verlängert sich die Lag-Phase, die folgende Fibrillenbildung ist verlangsamt und die erreichten Endwerte sind geringer (s. Abb. 3.21).

Auch in diesem Fall liegt zunächst wieder ein Prozess pseudo 1. Ordnung vor. In Abhängigkeit von der eingesetzten Keimkonzentration wird ein Schwellenwert, ab dem das Fibrillenwachstum als Fluoreszenzanstieg im ThT-Test verfolgt werden kann, zu unterschiedlichen Zeiten erreicht. In Abbildung 4.3 ist gezeigt, dass ein exponentieller Zusammenhang zwischen der eingesetzten Keimkonzentration und der gemessenen Lag-Phase besteht. Damit kann angenommen werden, dass die Fibrillenbildung einem exponentiellen Verlauf folgt. Dieses wurde bereits von Eigen (2001) theoretisch berechnet, unter der Annahme, dass es nach den Anlagerungsphasen und der kooperativen Umwandlung immer wieder z.B. durch Scherkräfte, zu Brüchen in den Fibrillen kommt, wodurch die Anzahl der Keime erhöht wird. Betrachtet man nur den Wachstumsterm aus Eigens Berechnungen, so kann das Fibrillenwachstum mit folgender Exponentialfunktion beschrieben werden:

$$I_l = c_0 \cdot e^{kt_l}$$

$$\Leftrightarrow t_l = -\frac{\ln c_0}{k} + \frac{\ln I_l}{k}$$

mit: I_l : Intensität über Detektionslimit
 c_0 : Keimkonzentration
 k : Geschwindigkeitskonstante
 t_l : Dauer der Lag-Phase

Gleichung 4.1

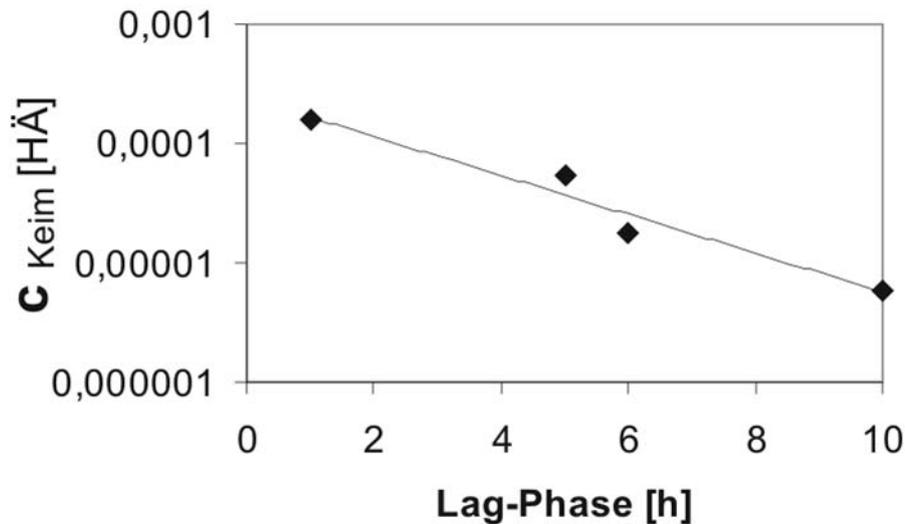


Abb. 4.3: Exponentielle Abhängigkeit der Lag-Phase von der Keimkonzentration. Halblogarithmische Darstellung: Die Keimkonzentration in Hirnäquivalenten (HÄ) ist gegen die gemessene Lag-Phase, die aus den Daten grob abgeschätzt wurde, aufgetragen.

Mit den neuen Erkenntnissen zur keiminduzierten Fibrillenbildung muss das Zwei-Stufen-Modell erweitert werden. Der Anlagerung und der kooperativen Fibrillenbildung muss ein Bruch der Fibrillen folgen, um dem exponentiellen Wachstum gerecht zu werden. Das modifizierte Modell ist in Abbildung 4.4 dargestellt.

Die Abhängigkeit der erreichten Fluoreszenzendwerte von der eingesetzten Keimkonzentration, lässt sich durch die Annahme einer Konkurrenzreaktion erklären: Der amorphen Aggregation der Monomere, die unter diesen Bedingungen (NaPi in Anwesenheit von SDS und NaCl) allerdings deutlich langsamer ablaufen muss, als in dem ursprünglichen *in vitro*-Konversionsmodell ohne Zugabe von NaCl beschrieben. Sind viele Keime und somit viele spezifische Bindeplätze vorhanden, so werden diese bevorzugt besetzt und die Monomere der Konkurrenzreaktion entzogen. Bei einer Verringerung der Keimmenge fließen die Monomeren z.T. in die Konkurrenzreaktion ein, bilden amorphe Aggregate aus und stehen für die Fibrillenbildung nicht mehr zu Verfügung. So können bei geringerer Keimkonzentration auch nur niedrigere Endwerte der Fibrillenbildung erreicht werden.

Mit dem hier etablierten System konnte eine Fibrillenbildung in den Proben bis zu einer Keimkonzentration von 6×10^{-6} HÄ/ μl , was in diesem Fall einer absoluten Keimmenge von 9×10^{-4} HÄ entspricht, nachgewiesen werden.

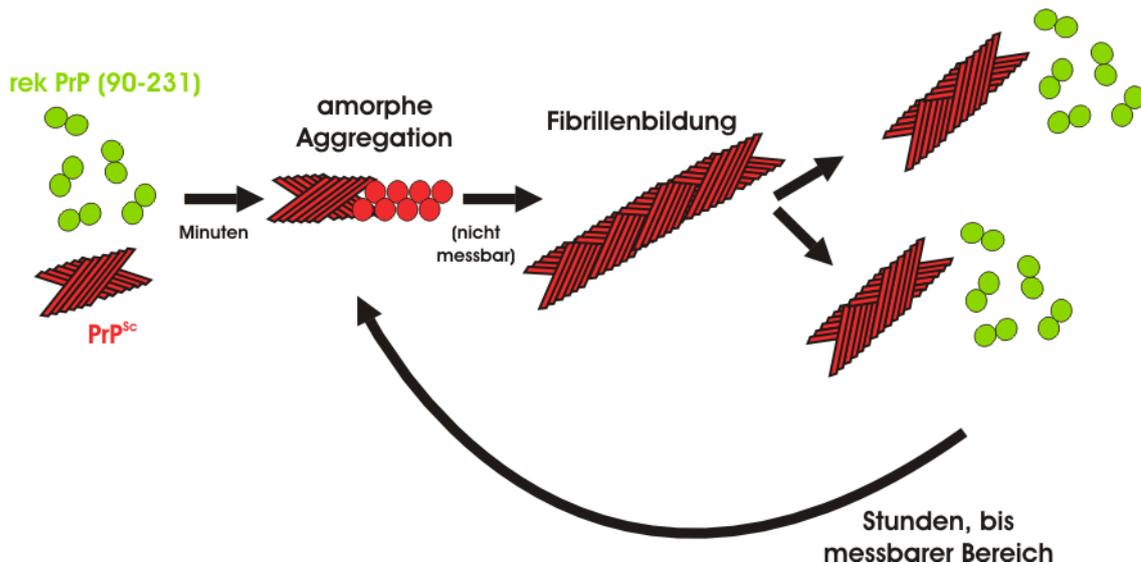


Abb. 4.4: Modell zur keiminduzierten Fibrillenbildung. Innerhalb von Minuten kommt es zur Ausbildung amorpher Aggregate. Im Anschluss daran findet kooperative Fibrillenbildung innerhalb eines Aggregats statt. Durch Zerbrechen der Fibrillen stehen mehr Keime zur Verfügung. Es kommt zum exponentiellen Wachstum.

Die Verlängerung der Lag-Phase bei Reduzierung der eingesetzten Keimmenge ist ein bereits in der Literatur beschriebener Effekt bei der keiminduzierten Fibrillogenese (Baskakov, 2004). Baskakov stellte mittels seines Konversionssystems Fibrillen aus rek PrP (human) her und induzierte anschließend mit diesen erneut eine Fibrillenbildung von rek PrP. Durch die Zugabe der Fibrillen als Keim zu dem System, konnte die Fibrillogenese beschleunigt werden, d.h. die Lag-Phase wurde verkürzt. Die Länge der Lag-Phase wies ebenfalls eine Abhängigkeit von der eingesetzten Keimmenge auf. Unabhängig von der eingesetzten Keimmenge wurde, anders als in dieser Arbeit, allerdings immer ein ähnlicher Endwert erreicht. Dieser Unterschied könnte darauf zurückzuführen sein, dass Baskakov ein homogenes System mit nur einer PrP-Spezies verwendet. Die Ausbildung von Fibrillen könnte dadurch der zuvor beschriebenen Konkurrenzreaktion gegenüber deutlich bevorzugt werden. In dem in dieser Arbeit etablierten System sind zwei unterschiedliche PrP-Spezies vorhanden: PrP^{Sc} als Keim und rek PrP (90-231), eine N-terminal verkürzte Form ohne die posttranslationalen Modifikationen, als Anlagerungssubstrat. Keim und Monomer sind also nicht vollständig identisch, was eventuell ein Nachteil bezüglich der Effektivität der keiminduzierten Fibrillogenese bedeuten könnte.

4.3.3 Einfluss von Ultraschall

In Anlehnung an das von Soto etablierte System zur Amplifikation von PK-resistentem PrP (Saborio *et al.*, 2001; vgl. Kap. 1.9) wurde im Folgenden der Einfluss von Ultraschall auf die keimabhängige Fibrillogenese von rek PrP untersucht. Sotos System nutzt die Wirkung von Ultraschall aus, um gebildete Aggregate wieder zu

fragmentieren und damit die Anzahl der Keime, die wieder für eine Anlagerung von PrP^C zur Verfügung stehen, zu erhöhen. In dieser Arbeit wurden die Fibrillogenseansätze mit variierenden Keimmengen, vor der Zugabe von ThT und dem Start der Messung, 6 Stunden lang unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Dabei wurden die Proben stündlich einer Ultraschallbehandlung mit einer Nadelsonde unterzogen (10 Pulse á 0,1 s bei 30 % Leistung). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Ultraschallbehandlung der Proben die Lag-Phase bis zum Start der Fibrillogense bei allen eingesetzten Keimkonzentration, im Vergleich zum gleichen Experiment ohne diese Vorbehandlung, verkürzt wurde (vgl. Kap. 3.2.8; Abb. 3.22 A). Auch die erreichten Endwerte lagen diesmal deutlich höher. Außerdem konnte jetzt auch bei noch geringeren Keimkonzentrationen eine Fibrillenbildung nachgewiesen werden. Bis zu einer Verdünnung von $1,6 \times 10^{-7}$ HÄ/ μ l, was einer absoluten PrP^{Sc}-Menge von $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ entspricht, konnte deutlich zwischen positiven Proben und den Negativkontrollen unterschieden werden (s. Abb. 3.22 B). Bei einer weiteren Verdünnung um den Faktor 10 traten große Schwankungen bei den durchgeführten Messungen auf. Bei solch geringen Keimmengen sind in Zukunft weitere Untersuchungen notwendig, um eine statistisch relevante Aussage über die Nachweisgrenze treffen zu können. Insgesamt fällt bei einer Betrachtung der gemessenen Signale auf (vgl. Abb. 3.22 B), dass diese, gerade bei höheren Keimkonzentrationen, nicht, wie man es erwarten würde, mit steigender PrP^{Sc}-Verdünnung abnehmen. Es wird angenommen, dass es sich bei diesem Effekt um ein Absinken der gebildeten, großen Aggregate handelt, die damit nicht mehr für die Messung zugänglich sind. Bei diesen Experimenten wurden die Proben vor jeder Messung für 30 s geschüttelt. Eventuell könnte ein permanentes Schütteln zwischen den einzelnen Messungen diesen Absinkeffekt verhindern.

Die Ultraschallbehandlung übt also einen positiven Effekt auf die keimabhängige Fibrillogense von rek PrP aus. Wie bereits erwähnt, wird für die hier etablierte keiminduzierte Fibrillogense angenommen, dass es nach dem Wachstum der Fibrillen immer wieder auch zum Zerbrechen der gewachsenen Fibrillen kommt, was zu einem exponentiellen Wachstum führt. Durch die Ultraschallbehandlung werden solche Brüche zusätzlich künstlich herbeigeführt. Dadurch wird die Fibrillenbildung stark beschleunigt. Die Sensitivität des hier etablierten Systems zum Nachweis geringer Mengen an PrP^{Sc} wurde durch die Einführung der Ultraschallbehandlung deutlich verbessert. Es ist damit festzuhalten, dass eigentlich eine zyklische Amplifikation durchgeführt wurde, da Wachstum und Keimvermehrung sich abwechselten. Allerdings wurde hier nur der prinzipielle Effekt untersucht, und die zyklische Aufeinanderfolge nicht weiter optimiert. Lediglich bei der geringsten hier eingesetzten PrP^{Sc}-Konzentration scheint die Ultraschallbehandlung der Proben nicht ausreichend gewesen zu sein. Es bleibt zu testen, ob durch eine Verlängerung der

Inkubationszeit mit stündlicher Ultraschallbehandlung, die Sensitivität des Systems noch gesteigert werden kann. Im Fall der geringsten eingesetzten Keimmenge kann weiterhin spekuliert werden, dass die geringe Menge an PrP^{Sc}, nach der Verdünnung in Hirnhomogenat gesunder Tiere, nicht homogen verteilt vorlag. Bei der Entnahme der Aliquots für die NaPTA-Fällung könnte somit in einer Probe eventuell gar kein PrP^{Sc} enthalten gewesen sein. Es ist zu überlegen, ob an dieser Stelle, also nach der Verdünnung und vor der Fällung, eine weitere Ultraschallbehandlung der Proben angebracht wäre.

Bei der Verwendung von Ultraschall in einem System zur Vermehrung von PrP^{Sc}-Einheiten ist allerdings zu beachten, dass die Ultraschallbehandlung nicht beliebig gesteigert werden kann. In der Literatur ist mehrfach beschrieben, dass Ultraschall bei verschiedenen, α -helikalen Proteinen zur einer fibrillären Aggregation unter Ausbildung eines erhöhten β -Faltblattanteils führen kann (Stathopoulos *et al.*, 2004; Ohhashi *et al.*, 2005). Diese, durch Ultraschall gebildeten Aggregate, sind wiederum in der Lage, erneute Aggregation zu induzieren. Mit dem Auftreten solcher Effekte könnte die eigentliche keiminduzierte Fibrillenbildung nicht mehr von der ultraschallinduzierten Fibrillenbildung unterschieden werden. Eine Unterscheidung zwischen Proben mit PrP^{Sc} und den Negativkontrollen wäre damit unmöglich. Auch muss beachtet werden, dass die als Aggregationskeim dienenden Aggregate eine kritische Größe nicht unterschreiten dürfen (Eigen, 1996; Masel *et al.*, 1999), da sie ansonsten ihre Fähigkeit, bei monomerem PrP eine Konformationsänderung zu induzieren, verlieren könnte. Durch eine zu starke Ultraschallbehandlung könnten die Aggregate also zu stark fragmentiert werden. Die Auswahl der optimalen Ultraschallbedingungen ist nicht trivial: Zu geringe Beschallung übt keinen positiven Effekt auf die keimabhängige Fibrillenbildung aus. Zu harsche Beschallung hingegen birgt die Gefahr, dass auch in Abwesenheit von Keimen Fibrillen gebildet werden, oder dass die Keime ihre kritische Größe, bei der sie als Nukleationskeim wirken können unterschreiten.

4.3.4 Verwendung von CHO-PrP^C als Anlagerungssubstrat

CHO-PrP^C bietet im Gegensatz zu rek PrP nicht nur den Vorteil, dass es der vollen Länge des Prionproteins entspricht, sondern es liegt auch in vollständig modifizierter Form vor, d.h. es trägt sowohl beide N-Glykosylierungen als auch den GPI-Anker. Bei einer erfolgreichen Übertragung des in dieser Arbeit etablierten *in vitro*-Systems zur Vermehrung von PrP^{Sc}-Aggregaten auf CHO-PrP^C besteht die Möglichkeit, dass die neugebildeten Fibrillen den PrP^{Sc}-Keimen ähnlicher sind als bei der Verwendung von rek PrP. Durch ein so geschaffenes homogenes System mit nur einer PrP-Spezies, wäre die Voraussetzung für ein amplifizierendes System deutlich besser (vgl. Kap. 4.3.2). Vergleichende Untersuchungen zur keimabhängigen Fibrillogenese mit rek PrP

und CHO-PrP^C, zeigen eine deutlich beschleunigte Fibrillenbildung bei der Verwendung von CHO-PrP^C (vgl. Kap. 3.2.5; Abb. 3.19). Zum Erreichen einer vergleichbaren Signalstärke werden mit rek PrP erheblich höhere Konzentrationen benötigt. Die Modifikationen von CHO-PrP^C wirken sich demnach positiv auf die Fibrillogenese aus. Diese Tatsache wurde bereits im Zusammenhang mit den „synthetischen“ Prionen (vgl. Kap. 4.2) diskutiert. Durch die Verwendung von CHO-PrP^C als Anlagerungssubstrat kann die Sensitivität des in dieser Arbeit etablierten *in vitro*-Systems noch gesteigert werden. Weiterführende detaillierte Untersuchungen mit CHO-PrP^C sind im Rahmen dieser Arbeit aus Materialmangel nicht durchgeführt worden.

4.4 Sensitivität im Vergleich zu anderen Methoden zum Nachweis von PrP^{Sc}

In dieser Arbeit wurde eine Nachweisgrenze von $2,5 \times 10^{-5}$ HÄ PrP^{Sc} des entwickelten Systems bestimmt. Die Nachweisgrenze der Testsysteme von den Firmen Prionics, Biorad und Enfer, die alle die PK-resistente Form von PrP^{Sc}, also PrP (27-30) nachweisen, liegt im Bereich von 10^{-4} HÄ (Oesch *et al.*, 2000; Deslys *et al.*, 2001; Winklhofer *et al.*, 2001) und damit etwa in der gleichen Größenordnung. Bei den bestehenden Testsystemen ist nicht davon auszugehen, dass die Sensitivität noch gesteigert werden kann, da sie im Gewebe vorhandenes PK-resistentes PrP (resPrP^{Sc}) nachweisen. Von Safar und Kollegen (1998) konnte jedoch gezeigt werden, dass es pathologisches Prionprotein gibt, welches nicht Proteinase K resistent ist (senPrP^{Sc}). Dadurch tritt bei sämtlichen Testsystemen, die PrP (27-30) mittels PK-Verdauung nachweisen, ein Verlust an pathologischem Prionprotein auf, was zu einer Erniedrigung der Sensitivität dieser Methoden führt. Im Gegensatz dazu ist in dieser Arbeit ein System entwickelt worden, dass erstens sowohl bei der Aufreinigung der Keime als auch zum Nachweis auf eine Verdauung mit PK verzichtet. Damit ist ein Verlust an pathologischem Prionprotein ausgeschlossen. ResPrP^{Sc} und senPrP^{Sc} werden durch die NaPTA-Fällung beide aufgereinigt und in das System eingesetzt. Zweitens beruht das hier etablierte System auf der Vermehrung der vorhandenen PrP^{Sc}-Aggregate. Eine Sensitivitätssteigerung ist somit durch eine weitere Optimierung der Bedingungen möglich (s. Kap. 4.5). Eine deutliche Verbesserung der Nachweisgrenze ist in Zukunft durch Verlängerung der Inkubations-/Ultraschallzyklen vor Beginn der Messung, sowie der Verwendung von CHO-PrP^C zu erwarten.

Ebenfalls auf einer Amplifikation von PrP^{Sc} beruht das von Soto und Mitarbeitern entwickelte System (PMCA), welches in Kapitel 1.9 ausführlich beschrieben wurde. In diesem System werden Hirnhomogenate als PrP^C bzw. PrP^{Sc}-Quelle verwendet und auch die eigentliche Amplifikation von PK-resistentem PrP^{Sc} findet in Hirnhomogenat

statt. Erst zum Nachweis der gebildeten PK-resistenten PrP-Menge findet eine Aufreinigung mittels PK-Verdauung statt. Die Sensitivität dieses Systems wird im Allgemeinen in einer Amplifikationsrate angegeben, was einen Vergleich erschwert. Da in der vorliegenden Arbeit das Ausgangssignal des eingesetzten PrP^{Sc} mittels ThT-Test nicht bestimmt werden kann, es liegt im Rauschen des Puffers, kann hier keine Amplifikationsrate bestimmt werden. In der ersten Publikation zum Soto-System (Saborio *et al.*, 2001) ist beschrieben, dass nach Durchführung von 10 Inkubations-/Ultraschallzyklen die minimal nachweisbare PrP (27-30)-Menge 6-12 pg beträgt. Unter der Annahme, dass 1 µg Hirngewebe (= 10⁻⁶ HÄ) ungefähr 10 pg PrP (27-30) enthält (Prusiner *et al.*, 1983), konnten also etwa 10⁻⁶ HÄ PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Das Amplifikationssystem nach Soto ist damit unter diesen Bedingungen ungefähr um den Faktor 10 sensitiver als das in dieser Arbeit entwickelte System. In der vorliegenden Arbeit wurden allerdings nur sechs solcher Inkubations-/Ultraschallzyklen durchgeführt. Da die Arbeitsgruppe Soto später zeigen konnte, dass durch eine Erhöhung der Anzahl dieser Zyklen auch die Amplifikationsrate erhöht werden kann, wird angenommen, dass ein gleicher Effekt auch bei dem hier etablierten System möglich ist. Bezüglich der Nachweisgrenze ist also ein großes Potential des Limits des Systems zu erwarten.

Soto und Mitarbeitern gelang es unter Verwendung ihres Systems, nach Optimierung der Inkubations-/Ultraschallzyklen, PK-resistentes PrP in Hirnmaterial präklinischer BSE-Rindern, sowie in Blut Scrapie-infizierter Hamster nachzuweisen (Soto *et al.*, 2005; Castilla *et al.*, 2005). Damit kann dieses System als weltweit führend auf dem Gebiet der TSE-Diagnostik bezeichnet werden. Ob es sich allerdings für eine Anwendung in der routinemäßigen Diagnostik eignet, ist auf Grund des Einsatzes von Hirnhomogenat als PrP^C-Quelle mehr als fraglich. Es stellt sich die Frage, wie das für die Amplifikation benötigte Hirnhomogenat gesunder Tiere getestet werden soll. Soll der Test mit dem eigenen System durchgeführt werden, so steht man vor einem unlöslichen Problem. Es müsste also eine „Herde“ isolierter, definitiv gesunder Tiere zur Verfügung stehen. Bei der Etablierung des Systems am Maus- oder Hamstermodell mag dies noch realisierbar sein, bei einer Routineanwendung an BSE-Rindern ist dieses jedoch nicht vorstellbar. Besonders kritisch wird die Situation bei einer möglichen Anwendung des Systems zur Diagnose von CJD beim Menschen. An dieser Stelle würde die Verwendung von Hirnhomogenaten nicht nur ethische Fragen aufwerfen, sondern die Durchführung erscheint schlichtweg unmöglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein System entwickelt, in dem das Amplifikationssubstrat in synthetischer und aufgereinigter Form zugeführt wird, was eine bessere Verfügbarkeit für die Diagnostik bedeutet. Aus diesem Grund ist das hier etablierte System dem Soto-System gegenüber für eine Anwendung im Bereich der Diagnostik deutlich überlegen.

4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro*-System zum sensitiven Nachweis von PrP^{Sc} durch Amplifikation der PrP^{Sc}-Aggregate grundlegend etabliert. Dieses System bietet ein großes Potential im Bereich der Diagnostik von TSE. In Zukunft besteht nun die Chance, durch eine weitere Optimierung des Systems, die in dieser Arbeit erreichte Nachweisgrenze zu verbessern. Wie bereits diskutiert, ist anzunehmen, dass eine Ausweitung der Inkubations-/Ultraschallzyklen die Sensitivität weiter steigert. Besonders die Verwendung von CHO-PrP^C anstelle von rek PrP als Anlagerungs-substrat wurde bereits diskutiert und verspricht eine weitere Verstärkung der Amplifikation. Hierzu müssen allerdings noch systematische Untersuchungen und Optimierungen, wie die Einführung der Ultraschallbehandlung, durchgeführt werden. CHO-PrP^C steht in unserem Institut aufgrund intensiver Arbeiten zur Verfügung. Die Präparation kann in Zukunft ausgeweitet werden, so dass diese Untersuchungen durchführbar sind. In diesem homogenen System mit nur einer PrP-Spezies ist sogar die Etablierung einer repetitiven Amplifikation vorstellbar. Die Amplifikation könnte durch erneute Zugabe von PrP^C, z.B. nach Ultraschallbehandlung, weiter gesteigert werden.

Auch der Einfluss von nicht proteinösen Sekundärkomponenten der Prionen auf die keimabhängige Fibrillogenese sollte als einer der nächsten Schritte untersucht werden. Neben dem Prionprotein konnten z.B. bestimmte Lipide sowie ein Polysaccharidgerüst als ein Bestandteil von Prionen identifiziert werden (Klein *et al.*, 1998; Dumpitak *et al.*, 2005). Es konnte bereits gezeigt werden, dass PrP^C in Anwesenheit dieser Lipide unter bestimmten Bedingungen Fibrillen ausbildet (Leffers *et al.*, 2005). Auch der Einfluss von Polysacchariden auf die *in vitro*-Konversion von PrP wurde bereits eingehend untersucht (Dumpitak, 2003). Durch die Zugabe dieser Cofaktoren könnte folglich die Amplifikation verstärkt und somit die Sensitivität verbessert werden.

Neben den verschiedenen Optimierungsmöglichkeiten innerhalb des Systems, besteht des Weiteren die Möglichkeit der Optimierung der Nachweismethode. Wünschenswert wäre eine Übertragung des ThT-Tests zum Nachweis fibrillärer Strukturen auf eine Anwendbarkeit in der FCS. Da es sich hierbei um eine Einzelpartikelmessung handelt, würde eine ThT-Messung mittels FCS eine generelle Steigerung der Sensitivität der Methode bedeuten. Bislang ist die Anregung von ThT mit den gerätespezifischen Lasern nicht gelungen. Sollte eine ThT-Messung mittels FCS in Zukunft realisierbar sein, so könnte das hier etablierte Systeme auch in Kombination mit anderen, in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Nachweismethoden, die auf dem Prinzip der FCS beruhen, angewendet werden. Hierbei sei besonders eine Methode zur Immobilisierung von PrP^{Sc}-Aggregaten hervorgehoben (Birkmann,

2005). Nach der Immobilisierung der Aggregate wird bei dieser Methode der Probenträger aktiv nach den Aggregaten abgesucht. Insbesondere die Möglichkeit des Nachweises einzelner Partikel ist hier nochmals besonders herauszustellen, da die Methodik dadurch eindeutig gegenüber handelsüblichen Diagnostikmethoden im Vorteil ist. Da diese Nachweismethode mittels Immobilisierung der Aggregate bereits auf BSE übertragen wurde, sollte auch das hier vorgestellte System, welches am Hamstermodell etabliert wurde, möglichst frühzeitig auf BSE übertragen werden.

Nach der weiteren Optimierung des Systems und der Nachweismethode bezüglich der Sensitivität anhand der vorgeschlagenen Punkte, müsste die Spezifität des Systems durch Versuchsreihen an Hirnhomogenaten gesunder und erkrankter Tiere evaluiert werden. Bei hoher Sensitivität und Spezifität des Systems sollte der Test an präklinischen Tieren folgen. Weiterhin ist eine Übertragung der Methode auf andere Gewebe oder Körperflüssigkeiten vorstellbar. Dabei wäre die Analyse von z.B. Cerebrospinalflüssigkeit naheliegend. Auch eine Fraktionierung von Vollblut erkrankter Tiere und Test der einzelnen Fraktionen auf PrP^{Sc}, wäre bei einer hohen Sensitivität der Methode denkbar und könnte zur Entwicklung eines Lebendtests führen.

Bislang wurde der diagnostische Nutzen des hier entwickelten Systems diskutiert. Des weiteren ist aber auch eine Anwendung in der Grundlagenforschung im Bereich der Therapie von TSE ist durchaus vorstellbar. Mit diesem System könnte nach Substanzen gesucht werden, die die Fibrillenbildung inhibieren. Dies könnten sowohl Substanzen sein, die die α -helikale Struktur der Monomere stabilisieren und dadurch die Aggregation verhindern, als auch Substanzen, welche die bereits gebildeten Aggregate wieder auflösen, so genannte β -Sheet-breaker.

5 Zusammenfassung

Prionen sind die Erreger neurodegenerativer Erkrankungen, die nicht nur infektiöser, sondern auch sporadischer oder genetischer Natur sein können. Sie besitzen keine codierende Nukleinsäure, und ihr Hauptbestandteil ist das wirtseigene Prionprotein (PrP), das in zwei chemisch identischen Isoformen auftritt, der zellulären Form, PrP^C, und der krankheitsassoziierten Form, PrP^{Sc}. Die physikalisch-chemischen Eigenschaften sind jedoch unterschiedlich. PrP^C weist eine überwiegend α -helikale Sekundärstruktur auf, ist in milden Detergenzien löslich und sensitiv gegenüber Proteinase K- (PK-) Verdauung. PrP^{Sc} hingegen weist einen erhöhten Anteil an β -Faltblattstruktur auf, bildet unlösliche Aggregate, die amorpher oder fibrillärer Struktur sein können, und besitzt eine partielle Resistenz gegenüber PK-Verdauung. Als bestes Replikationsmodell gilt, dass die Ausbildung von Prionkrankheiten durch die Konversion von PrP^C in die infektiöse Isoform PrP^{Sc} hervorgerufen wird. Alle bisher zugelassenen Diagnoseverfahren für Prionkrankheiten beruhen auf dem Nachweis des PK-resistenten Anteils von PrP^{Sc}. Dadurch kann die Krankheit jedoch erst diagnostiziert werden, wenn PrP^{Sc} in großer Menge im erkrankten Organismus vorliegt.

Ziel dieser Arbeit war es, ein System zu entwickeln, welches den natürlichen Replikationsmechanismus *in vitro* nachstellt. Damit sollten die im Fall einer Erkrankung vorhandenen PrP^{Sc}-Aggregate *in vitro* vermehrt, und dadurch der Nachweis geringster Mengen an PrP^{Sc} ermöglicht werden. Gleichzeitig sollte ein Einblick in den Replikationsmechanismus erhalten werden. Der Amplifikationsprozess sollte als keiminduzierte Anlagerung von PrP^C an vorhandene PrP^{Sc}-Aggregate, gefolgt von der Konversion von PrP^C in die pathogene Isoform, etabliert und systematisch untersucht werden. Durch die Verwendung aufgereinigter Komponenten zur Etablierung dieses Systems wäre ein Diagnoseverfahren im Routinestil möglich.

Es wurde ein in unserer Arbeitsgruppe bereits entwickeltes *in vitro*-Konversionssystem zur Bildung fibrillärer Aggregate aus PrP^C verwendet. Durch die Zugabe von PrP^{Sc} als Keim konnte jedoch die Ausbildung der Fibrillen von einem Zeitraum von einigen Wochen auf einige Stunden beschleunigt werden. Fibrillogenseansätze in Anwesenheit von PrP^{Sc} konnten eindeutig von entsprechenden Negativkontrollen unterschieden werden. Als Nachweismethoden wurden differentielle Ultrazentrifugation, Thioflavin T (ThT)-Test, Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), Circular Dichroismus (CD) und Elektronenmikroskopie (EM) benutzt. Der ThT-Test

erwies sich quantitativ als besonders geeignet, während EM und FCS zum Verständnis des Mechanismus beitragen. Anhand des etablierten Systems wurde des Weiteren der Einfluss der Monomer-, sowie der Keimkonzentration auf die keiminduzierte Fibrillogenese detailliert untersucht. Eine zusätzliche Sensitivitätssteigerung des etablierten Systems zur Vermehrung von PrP^{Sc}-Aggregaten gelang durch die Einführung einer Ultraschallbehandlung der Proben. Das ursprüngliche Modell der zyklischen Aufeinanderfolge von Keimbildung und Wachstum konnte vollständig bestätigt werden. Das etablierte System bildet die Grundlage zum Aufbau eines sensitiven Diagnoseverfahrens.

6 Literaturverzeichnis

- Anderson, R. M., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E., Watt, C. J., Udy, H. J., MaWhinney, S., Dunstan, S. P., Southwood, T. R., Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., Hoinville, L. J., Hillerton, J. E., Austin, A. R. and Wells, G. A. (1996). Transmission dynamics and epidemiology of bse in british cattle. *Nature*, 382(6594), 779–88.
- Baskakov, I. V., Legname, G., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B., Cohen, F. E. (2002). Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J Biol Chem.*, 14, 277(24), 21140-8.
- Baskakov, I. V. (2004). Autokatalytic conversion of recombinant prion proteins displays a species barrier. *J. Biol. Chem.*, 279(9), 7671-7677.
- Baskakov, I. V., Bocharova, O. V. (2005). In vitro conversion of mammalian prion protein into amyloid fibrils displays unusual features. *Biochemistry*, 22, 44(7), 2339-48.
- Beekes, M., Baldauf, E., Cassens, S., Diringer, H., Keyes, P., Scott, A. C., Wells, G. A., Brown, P., Gibbs, C. J., Jr. and Gajdusek, D. C. (1995). Western blot mapping of disease-specific amyloid in various animal species and humans with transmissible spongiform encephalopathies using a high-yield purification method. *J. Gen. Virol.*, 76(Pt 10), 2567–76.
- Bieschke, J., Giese, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Poser, S., Eigen, M., Kretzschmar, H. (2000). Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *PNAS USA*, 97, 5468-73.
- Bieschke, J. (2000). Aggregationsanalyse durch Fluoreszenz - Korrelations - Spektroskopie. *Dissertation Universität Carolo-Wilhelmina*.
- Biffiger, K., Zwald, D., Kaufmann, L., Briner, A., Nayki, I., Purro, M., Bottcher, S., Struckmeyer, T., Schaller, O., Meyer, R., Fatzner, R., Zurbriggen, A., Stack, M., Moser, M., Oesch, B., Kubler, E. (2002). Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrP(Sc) in brain homogenate. *J. Virol Methods*, 101, 79-84.
- Birkmann, E., Schäfer, O., Weinmann, N., Dumpitak, C., Beekes, M., Jackman, R., Thorne, T. & Riesner, D. (2005). Detection of Prion-Particles in samples of BSE and Scrapie by Fluorescence-Correlation-Spectroscopy without PK-digestion. *Biological Chemistry*, 387(1), 95-102.
- Birkmann, E. (2005). Nachweis einzelner pathologischer Proteinaggregate mit der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie als diagnostische Methode für BSE und Scrapie. *Dissertation; Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf*.
- 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(12), 1465-1473.

- Brahms, S., Brahms, J. (1980). Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.*, 138(2), 149-178.
- Brown, D. R., Wong, B. S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S. J. and Jones, I. M. (1999). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. J.*, 344 Pt 1, 1-5.
- Brown P., Cervenáková L., McShane L.M, Barber P, Rubenstein R, Drohan W.N. (1999b). Further studies of blood infectivity in an experimental model of transmissible spongiform encephalopathy, with an explanation of why blood components do not transmit Creutzfeldt–Jakob disease in humans. *Transfusion* 39, 1169–1178.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., Weisman, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, 356, 577-582.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73. 1339-1347.
- Cassirer, R. (1898). Über die Traberkrankheit der Schafe: pathologisch-anatomische und bakterielle Untersuchung. *Pathol. Anat. Physiol.*, 153, 89-110.
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., Soto, C. (2005). *In vitro* generation of infectious scrapie prions. *Cell*, 121(22), 195-206.
- Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced by oculation with scrapie brain material. *Lancet*, 1, 1378-1379.
- Cohen, A.S. (1967). Preliminary chemical analysis of partially purified amyloid fibrils. *Lab. Invest.*, 15, 66–83.
- Cohen, F. E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J., Prusiner, S. B. (1994). Structural clues to prion replication. *Science*, 264, 530-531.
- Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, 383(6602), 685-690.
- Come, J. H., Fraser, P. E., Lansbury, P. T. (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *PNAS USA*, 90(13), 5959-5963.
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, 227(258), 561–3.
- Cuille, J., Chelle, P. L.. (1936). La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C. R. Acad. Sci. Paris*, 203, 1552-1554.
- Dumpitak, C. (2003). Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Polysacchariden und alterungsassoziierten Proteinmodifikationen bei Prionen. *Dissertation; Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf*.
- Dumpitak, C., Beekes, M., Weinmann, N., Metzger, S., Winklhofer, K.F., Tatzelt, J., Riesner, D. (2005). The polysaccharide scaffold of PrP 27-30 is a common compound of natural prions and consists of alpha-linked polyglucose. *Biol. Chem.*, 386(11), 1149-55. (2005).
- Dumpitak, C. & Riesner, D. (2005). Der Beweis der Prionenhypothese. *Biologie in unserer Zeit*, 6, 374-383.

- Deslys, J. P., Comoy, E., Hawkins, S., Simon, S., Schimmel, H., Wells, G., Grassi, J. and Moynagh, J. (2001). Screening slaughtered cattle for bse. *Nature*, 409(6819), 476–8.
- Ehrenberg, M. & Rigler, R. (1976). Fluorescence correlation spectroscopy applied to rotational diffusion of macromolecules. *Q. Rev. Biophys.*, 9.
- Eigen, M. (2001). BSE und das Prion-Problem. *Spektrum der Wissenschaft*, S. 40–49.
- Eigen, M. (1996). Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys. Chem.*, 63, A1-A18.
- Elfrink, K., Riesner, D. (2004). Purification of PrP^C. *Methods and tools in Biosciences and Medicine: Techniques in Prion Research*. ed. by S. Lehmann and J. Grassi (Birkhäuser Verlag Basel) 4-15.
- Friedreich, N. & Kékulé, A. (1859). Zur Amyloidfrage Virchow's. *Arch. pathol. Anat.*, 16, 50.
- Glenner, G.G. (1980). Amyloid deposits and amyloidoses: The β -fibrilloses. *New Engl. J. Med.*, 302, 1283–1291;1333–1343.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B., Cohen, F. E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed β -helices into trimers. *PNAS USA*, 101(22), 8342-8347.
- Grassi J., Creminon C., Frobert Y., Fretier P., Turbica I., Rezaei H., Hunsmann G., Comoy E., Deslys J.P. (2000). Specific determination of the proteinase K-resistant form of the prion protein using two-site immunometric assays. Application to the post-mortem diagnosis of BSE. *Arch Virol Suppl.*, (16), 197-205.
- Harris, D. A. (1999). Cell biological studies of the prion protein. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 1(1-2), 65–75.
- Hjelmeland, L. M., Chrambach, A. (1984). Solubilization of functional membrane proteins. *Meth. Enzym.*, 104, 305-318.
- Horiuchi, M., Caughey, B. (1999). Prion protein interconversions and the transmissible spongiform encephalopathies. *Structure*, 7, R231-R240.
- Hornemann, S., Schorn, C., Wüthrich, K. (2004). NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO rep.*, 5, 1159-1164.
- Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H.(Hrsg., 2001). *Prionen und Prionkrankheiten*. De Gruyter, Berlin.
- Houston, F., Foster, J.D., Chong, A., Hunter, N., Bostock, C.J. (2000). Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet*, 356, 999.
- Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C, Houston F (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J. Gen. Virol.*, 83, 2897-905.
- Ironside, J. W. (1998). Neuropathological findings in new variant CJD and experimental transmission of BSE. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 21, 91-95.
- Jansen, K., Schafer O., Birkmann E., Post K., Serban H., Prusiner S. B., Riesner D. (2001). Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. *Biol Chem.*, 382(4), 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*.
- Jarret, J. T., Lansbury, P. T. (1993). Seeding "one-dimensional crystallisation" of amyloid: A pathogenic mechanism in alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, 73, 1055-1058.
- Jeffrey, M., Goodsir, C. M., Bruce, M. E., McBride, P. A., Fraser, J. R. (1997). *In vivo* toxicity of prion protein in murine scrapie: ultrastructural and immunogold studies. *Neuropathol-Appl-Neurobiol.*, 23(2), 93-101.
- Kask, P., Palo, K., Ullmann, D. and Gall, K. (1999). Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *PNAS USA*, 96(24), 13756–61.
- 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 refocussing gel electrophoresis (RGGE). *J. Gen. Virol.*, 73, 1025-1029.
- 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 spectrometry. *Biol. Chem.*, 379, 655-666.
- Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. H., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T., Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, 370(6489), 471-474.
- Krebs, M. R., Bromley, E. H. & Donald, A. M. (2005). The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct. Biol.*, 149(1), 30–37.
- Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E. and DeArmond, S. J. (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am. J. Pathol.*, 122, 1–5.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(259), 680–5.
- Lasmezas, C. I., Desley, J. P., Demaimay, R. (1996). BSE transmission to macaques. *Nature*, 381, 743-744.
- Leffers, K. W., Schell, J., Jansen, K., Lucassen, R., Kaimann, T., Nagel-Steger, L., Tatzelt, J., Riesner, D. (2004). The structural transition of the prion protein into its pathogenic conformation is induced by unmasking hydrophobic sites. *J Mol Biol.*, 26, 344(3), 839-53.
- Leffers, K. W., Wille, H., Stöhr, J., Junger, E., Prusiner, S. B., Riesner D. (2005). Assembly of natural and recombinant prion protein into fibrils. *Biol. Chem.*, 386(6), 569-80.
- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H-O. B., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. (2004). Synthetic wild-type mammalian prions. *Science*, 30, 305(5684), 673-676.
- LeVine, H. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.*, 2(3), 404–410.
- LeVine, H. (1999). Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.*, 309, 274–284.

- 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 structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90-231). *Biochem.*, 38, 5362-5377.
- Llewelyn, C.A., Hewitt, P.E., Knight, R.S., Amar, K., Cousens, S., Mackenzie, J. & Will, R.G. (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*, 363(9407), 417–421.
- Lucassen, R., Nishina K, Supattapone S. (2003). In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl groups. *Biochem.*, 42(14), 4127-4135.
- Marsh, R. F., Kimberlin, R. H. (1975). Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology and pathogenesis. *J. Inf. Dis.*, 131, 104-110.
- Masel, J., Jansen, V. A. and Nowak, M. A. (1999). Quantifying the kinetic parameters of prion replication. *Biophys. Chem.*, 77(2-3), 139–52.
- McKinley, M. P., Bolton, D. C. and Prusiner, S. B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, 35(1), 57–62.
- 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. *Biochem.*, 35, 5528-5537.
- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M. and Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol.*, 54(1), 63–74.
- Miura, T., Hori-i, A., Mototani, H. and Takeuchi, H. (1999). Raman spectroscopic study on the copper(ii) binding mode of prion octapeptide and its ph dependence. *Biochemistry*, 38(35), 11560–9.
- Miyamoto, K., Nakamura, N., Aosasa, M., Nishida, N., Yokoyama, T., Horiuchi, H., Furusawa, S., Matsuda, H. (2005). Inhibition of prion propagation in scrapie-infected mouse neuroblastoma cell lines using mouse monoclonal antibodies against prion protein. *Biochem Biophys Res Commun.*, 16, 335(1), 197-204.
- Moynagh, J. and Schimmel, H. (1999). Tests for bse evaluated. bovine spongiform encephalopathy. *Nature*, 400(6740), 105.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M. & Takeda, T. (1989). Fluorometric determination of Amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal. Biochem.*, 177(2), 244–249.
- Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M. A (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40, 735-746.
- Oesch, B., Doherr, M., Heim, D., Fischer, K., Egli, S., Bolliger, S., Biffiger, K., Schaller, O., Vandeveld, M. and Moser, M. (2000). Application of prionics western blotting procedure to screen for bse in cattle regularly slaughtered at swiss abattoirs. *Arch. Virol. Suppl.*, 16, 189–95.
- Ohhashi, Y., Kihara, M., Naiki, H., Goto, Y. (2005). Ultrasonication-induced amyloid fibril formation of beta2-microglobulin. *J. Biol. Chem.*, 23, 280(38), 32843-8.

- 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 alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *PNAS USA*, 90(23), 10962–6.
- Pauling, L. & Corey, R.B. (1998). Configurations of polypeptide chains with favoured orientations around single bonds: two new pleated sheets. *PNAS USA*, 37, 729–740.
- Peretz, D., Williamson, R. A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I. R., Legname, G., Wormald, M. R., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Burton, D. R., Prusiner, S. B. (2001). Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*, 16, 412(6848), 739-43.
- Petersen, N. O. (1986). Scanning fluorescence correlation spectroscopy. i. theory and simulation of aggregation measurements. *Biophys. J.*, 49(4), 809–15.
- Pitschke, M. (1999). Mechanismus der Multimerisierung von Prion-Proteinen als Basis eines biophysikalischen Diagnoseverfahrens von spongiformen Encephalopathien und der Alzheimer Erkrankung. *Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*.
- Post, K., Pitschke, M., Schaefer, 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(11). 1307-1317.
- Post, K. (1998). Induktion und Charakterisierung verschiedener Aggregationszustände von natürlichem und rekombinantem Prion-Protein. *Dissertation Heinrich-Heine Universität Düsseldorf*.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216, 136-144.
- Prusiner, S. B., Bolton, D. C., Groth, D. F. (1982a). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochem.*, 21, 6942-6950.
- 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(1), 349-358.
- Prusiner, S. B. (1983b). Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *PNAS USA*, 78, 6675–6679.
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, 63, 673-686.
- Prusiner, S. B. (1997). Prion Diseases and the BSE crisis. *Science*, 278, 245-251.
- Puchtler H, Sweat F, Levine M. (1962). On the binding of Congo red by amyloid. *J. Histochem. Cytochem.*, H. 13, S. 693.
- Qian, H. (1990). On the statistics of fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. Chem.*, 38, 49–57.
- Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, H., Groth, D., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B. (1996). Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *J. Virol.*, 70(3), 1714-1722.

- Rigler, R., Mets, U., Widengren, J. and Kask, P. (1993). Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.*, 22, 169–175.
- Roos, R., Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. Jr. (1973). The clinical characteristics of transmissible Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*, 96, 1-20.
- Saborio, G. P., Permanne, B., Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, 411(14), 810-813.
- Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C. and Gibbs, C. J., Jr. (1993). Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J. Biol. Chem.*, 268(27), 20276–84.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med.*, 4(10), 1157-1165.
- Safar, J.G., Scott, M., Monaghan, J., Deering, C., Didorenko, S., Vergara, J., Ball, H., Legname, G., Leclerc, E., Solfrosi, L., Serban, H., Groth, D., Burton, D.R., Prusiner, S.B., Williamson, R.A. (2002). Measuring prions causing bovine spongiform encephalopathy or chronic wasting disease by immunoassays and transgenic mice. *Nat Biotechnol.*, 20, 1147-50.
- Safar, J.G., Kellings, K., Serban, A., Groth, D., Cleaver, J.E., Prusiner, S.B., Riesner, D. (2005). Search for a prion-specific nucleic acid. *J. Virol.*, 79(16), 10796-806.
- Salemme, F.R. (1983). Structural properties of protein beta-sheets. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 42(2-3), 95–133.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual; Band second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Schäfer, O. (2002). Nachweis von Prionen als Prionprotein-Aggregate im Hirngewebe TSE-erkrankter Tiere mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie.
- Schaller, O., Fatzer, R., Stack, M., Clark, J., Cooley, W., Biffiger, K., Egli, S., Doherr, M., Vandeveld, M., Heim, D., Oesch, B., Moser, M. (1999). Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE) *Acta Neuropathol.*, 98, 437-43.
- Schwille, P., Meyer-Almes, F.J. and Rigler, R. (1997). Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys. J.*, 72(4), 1878–86.
- Soto, C., Anderes, L., Suardi, S., Cardone, F., Castilla, J., Frossard, M. J., Peano, S., Saa, P., Limido, L., Carbonatto, M., Ironside, J., Torres, J. M., Pocchiari, M., Tagliavini, F. (2005). Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett.*, 31, 579(3), 638-42.
- Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L. & Prusiner, S.B. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*, 32(8), 1991–2002.

- Stathopoulos, P. B., Scholz, G. A., Hwang, Y. M., Rumfeldt, J. A., Lepock, J. R., Meiering, E. M. (2004). Sonication of proteins causes formation of aggregates that resemble amyloid. *Protein Sci.*, 13(11), 3017-27.
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *PNAS USA*, 93, 14945-14949.
- 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.
- Waggoner, D. J., Drisaldi, B., Bartnikas, T. B. (2000). Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J. Biol. Chem.*, 275, 7455-7458.
- Weissmann, C. (1994). Molecular biology of prion diseases. *Trends Cell Biol.* 4, 10 – 14.
- Wells, G. (1996). Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy. In *Bovine spongiform encephalopathy - the BSE dilemma*. (Gibbs, C., Hrsg.), S. 28. Springer New York.
- Wilesmith, J. W. & Wells, G. A. (1991). Bovine spongiform encephalopathy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 172, 21-38.
- 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 Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, 347, 921-925.
- Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, 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. *PNAS USA*, 99(6), 3563-3568.
- Winklhofer, K. F., Hartl, F. U. and Tatzelt, J. (2001). A sensitive filter retention assay for the detection of prp(sc) and the screening of anti-prion compounds. *FEBS Lett.* 503(1), 41–5.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 29.05.2006

Nicole Weinmann