

Aus dem Institut für Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Herr Prof. Dr. med. H. A. Kretzschmar

**Biophysikalische Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des
Prionproteins als Metalloprotein**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Alexander Hopt

aus

Bad Hersfeld

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. A. Kretschmar
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. S. Werner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. K. Beyer Priv. Doz. Dr. P. Lohse
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. J. Herms
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	08.07.2004

INHALT

1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung	11
2.1 Prionkrankheiten	11
2.2 Struktur des Prionproteins	15
2.2.1 Struktur des PrP ^C	15
2.2.2 Strukturenvergleich von PrP ^C und PrP ^{Sc}	16
2.3 Theorie der Umwandlung des Prionproteins	16
2.4 Lokalisation des Prionproteins	18
2.5 Funktion des Prionproteins	20
2.5.1 PrP, ein synaptisches Protein	20
2.5.2 Andere Befunde zur Funktion des PrP	22
2.5.3 PrP als Regulator der Kupferhomöostase.....	24
2.6 Aufgabenstellung, Motivation	28
3. Theorie	32
3.1 Fluoreszenz der Farbstoffe	32
3.1.1 Lambert-Beer-Gesetz	32
3.1.2 Korrektur der Eigenabsorption.....	34
3.1.3 Self-quenching	34
3.2 Berechnung der Dissoziationskonstanten	35
3.3 Messung der Konzentrationen von Kupfer und Zink mit dem Farbstoff TSPP. ..	36
3.4 Bindung von Kupfer an Proteine	37
3.5 Ratiometrische Messung der Konzentration von Kalzium mit Fura-2	38

3.6	Abschätzung des Kupfergehalts der synaptischen Vesikel	39
4.	Methoden.....	42
4.1	Messung der Extinktion von TSPP und Phen Green.....	42
4.2	Messung der Fluoreszenzspektren im Photometer	43
	Allgemeine Verfahrensweise bei den Fluoreszenzmessungen	43
4.2.1	Messung der Spektren und der Dissoziationskonstanten	44
4.2.2	Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die K_D von TSPP mit Kupfer	45
4.2.3	Zeitverhalten der Kupferbindung an TSPP	46
4.3	Präparation von Synaptosomen.....	47
4.4	Vitalitätsnachweis durch Messung der Glutamatausschüttung	48
4.5	Messung depolarisationsbedingter Kalziumveränderungen mit Fura-2-AM	49
4.6	Nachweis der Ungiftigkeit von TSPP auf Synaptosomen.....	50
4.7	Nachweis der Impermeabilität und Adhärenz von TSPP an Zellen	51
4.8	Quantitative Messung der Exozytose mit FM 1-43.....	51
4.9	Fluorimetrischer Nachweis der Kupfer- und Zink-Ausschüttung	53
4.10	Massenspektrometrische Messung der Schwermetallausschüttung.....	54
5.	Ergebnisse	55
5.1	Hohe Extinktion von TSPP.....	55
5.2	Die Fluoreszenzmessungen	58
5.2.1	Hochspezifische Kupferbindung von TSPP.....	58
5.2.2	Unabhängigkeit der TSPP-Kupferbindung von pH und Temperatur.....	65
5.2.3	Geschwindigkeit der Komplexbildung von TSPP mit Kupfer.....	67
5.3	Biologische Anwendung	67

5.3.1	Alle Maustypen zeigen ähnliche intrazelluläre Kalziumkonzentrationen.....	67
5.3.2	TSPP hat auf Chromaffinzellen und Synaptosomen keine toxischen Effekte	70
5.3.3	TSPP ist membranimpermeabel an Chromaffinzellen und Synaptosomen	71
5.3.4	Alle Maustypen zeigen ähnliche exozytotische Aktivität	72
5.3.5	Nachweis von depolarisationsbedingten und PrP-abhängigen Kupfer-, sowie Zink-Ausschüttungen.....	75
5.3.6	Massenspektroskopischer Nachweis der Ausschüttung von Zink, Nickel und Eisen und Bestätigung des vom Maustypen abhängigen Kupfer-Releases	78
6.	<i>Diskussion</i>	79
6.1	Analyse der Farbstoffe	80
6.2	Fluorimetrische Methode zur Messung der Konzentration von Kupfer in vivo..	85
6.3	Massenspektrometrische Überprüfung der Ausschüttung von Metallionen	90
6.4	Messung der Exozytose	91
6.5	Berechnung der Kupfer- und Zinkfreisetzung bei der Depolarisation	93
6.6	Analyse der gemessenen Kupferwerte	101
7.	<i>Literatur</i>	106
8.	<i>Danksagung</i>	137
9.	<i>Lebenslauf</i>	138

1.

Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Rolle des Prionproteins (PrP) als metallbindendes Protein an der synaptischen Plasmamembran analysiert. Hierzu werden i.w. drei Probleme bearbeitet:

- 1) Es werden Methoden entwickelt, welche es erlauben, Konzentrationen im Bereich einiger μM von verschiedenen Metallen (Cu, Zn, Fe, Mn, Co, Ni) in vivo in der Synapse zu bestimmen. Geeignete Methoden dieser Art sind bisher nicht verfügbar gewesen und werden hier erstmals beschrieben.
- 2) Diese Methoden werden auf ein biologisches System angewandt, um die ausgeschüttete Menge der Metallionen bei Depolarisation und deren Konzentration in den synaptischen Vesikeln zu bestimmen. Dazu müssen zusätzliche Techniken verwendet werden, um die Anzahl an ausgeschütteten Vesikeln pro Synapse zu ermitteln.
- 3) Schließlich werden die ausgeschütteten Mengen zwischen normalen Wildtyp- (WT), Prionprotein-Knockout- ($\text{Prnp}^{0/0}$) und verschiedenen anderen transgenen Mäusen verglichen. Bei letzteren ist auf dem Hintergrund der $\text{Prnp}^{0/0}$ -Maus das gesamte Prionproteingen wieder eingebracht worden (Tg20) bzw. ein um die kupferbindende Domäne verkürztes Prionproteingen eingebracht worden (C4). Anhand dieser Ergebnisse wird eine Theorie zur Funktion des Prionproteins als Metalloprotein an der Synapse diskutiert.

Von den aufgeführten Metallionen sind insbesondere Kupferionen interessant, da sie mit der Pathogenese von verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten in Zusammenhang gebracht werden, wie dem M. Menke, M. Wilson (DiDonato und Sarkar, 1997), M. Alzheimer (Waggoner et al., 1999; Lovell et al., 1998), M. Parkinson und der amyotrophen Lateralsklerose (Waggoner et al., 1999), sowie der Erkrankungsgruppe der spongiformen Enzephalopathien,

z.B. der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Brown et al., 1997a). Bisher bestand allerdings keine Möglichkeit, im Hirn physiologische Kupferausschüttungen in vivo und quantitativ zu bestimmen.

Methodisch wird folgendermaßen vorgegangen:

- 1) Zum einen wird hier erstmalig ein Fluoreszenzfarbstoff zur In-vivo-Messung der Ausschüttung von Cu eingesetzt:

Durch Bestimmung der Dissoziationskonstanten von sieben Fluoreszenzfarbstoffen (Ca-Green-1, Calcium Crimson, Fluo-3, Fura Red, Phen Green, TCPP, TSPP) mit zehn Metallionen (Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , K^+) ist TSPP (Tetrakis-4-Sulfophenyl-Porphyrin) als ein Farbstoff identifiziert worden, dessen Fluoreszenz sich spektroskopisch bei 645 nm Wellenlänge spezifisch und sensibel (Dissoziationskonstante $K_D = 0,43 \pm 0,07 \mu\text{M}$ bei pH 7,4) in Anwesenheit von Kupfer verändert und weder neurotoxisch noch zellpermeabel ist. Parallel dazu erlaubt es TSPP, auf einer zweiten Emissionslinie (605 nm) die Konzentration von Zink ($K_D = 50 \pm 2,5 \mu\text{M}$ bei pH = 7,0) zu messen.

Zum anderen kommt als weiteres Verfahren die Massenspektrometrie (*inductively-coupled-plasma mass-spectrometry*, ICP-MS) zur Anwendung, um in vivo die Ausschüttungen der Metalle Cu, Zn, Fe, Mn, Co und Ni zu bestimmen.

- 2) Als biologisches System werden Synaptosomen gewählt, welche aus Mäusehirnen durch ein spezielles Verfahren präpariert werden. Deren Depolarisation wird zum einen direkt im Fluoreszenzphotometer mit TSPP untersucht. Zum anderen werden sie depolarisiert, die Lösung zentrifugiert und der Überstand mit ICP-MS analysiert.

Zur Quantifizierung der Anzahl ausgeschütteter Vesikel pro Synaptosom werden Messungen der Glutamatausschüttung im Photometer und Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2-AM durchgeführt. Erst-

mals werden hier auch Messungen der Membranvergrößerung durch Exozytose mit dem Fluoreszenzfarbstoff FM 1-43 bei Synaptosomen angewendet.

- 3) Für die Präparation der Synaptosomen werden die Maustypen WT, Prnp^{0/0} (keine Expression von Prionprotein), Tg20 (Überexpression von Prionprotein) und C4 (Expression eines um die kupferbindende Domäne des Prionproteins verkürzten Proteins) verwendet. Die Ergebnisse werden verglichen.

Man erhält folgende Ergebnisse:

- 1) Mit TSPP wird hier erstmals festgestellt, dass WT-Synaptosomen bei Depolarisation physiologisch vorhandenes Cu ausschütten.
Für die gleichzeitig gemessene Menge der Zn-Ausschüttung finden sich ähnliche Werte in der Literatur.
- 2) Bei der Analyse mit ICP-MS beobachtet man bei WT-Mäusen statistisch signifikante, depolarisationsbedingte Ausschüttungen von Cu, Fe und Zn, während sich die Werte von Mn, Ni und Co nicht wesentlich verändern. Die Ergebnisse für Cu liegen dabei etwas höher als die mit TSPP gemessenen Konzentrationen.
- 3) Die Glutamatausschüttung, die intrazelluläre Kalziumkonzentration, sowie die Anzahl der ausgeschütteten Vesikel unterscheidet sich bei keinem der genannten transgenen Maustypen. Weder die basale Kalziumkonzentrationen, noch deren Veränderung durch Kalzium-Einstrom bei der Depolarisation zeigen signifikante Unterschiede.
- 4) Nur die Ausschüttungsmenge von Kupfer, nicht jedoch die der anderen Metalle, ist abhängig von den gewählten transgenen Maustypen: Sie ist in Prnp^{0/0}-Mäusen verglichen mit der von WT-Mäusen bei beiden Messmethoden (TSPP und ICP-MS) um die Hälfte reduziert. Bei der transgenen Linie, welche ein um die kupferbindende Domäne verkürztes Prionprotein überexprimiert (C4), werden Werte gemessen, die der Prnp^{0/0}-

Maus entsprechen. Demgegenüber zeigt die transgene Linie, die das gesamte Prionprotein überexprimiert (Tg20), Werte, die den Wildtypkontrollen entsprechen .

Die vorliegenden Ergebnisse erlauben es, die Konzentration von Kupfer in den synaptischen Vesikeln abzuschätzen. Sie beträgt z.B. für WT-Mäuse ungefähr $67 \pm 7 \mu\text{M}$ bei Messung mit TSPP und $291 \pm 75 \mu\text{M}$ bei Messung mit ICP-MS.

Die bei der Ausschüttung entstehende Kupferkonzentration in der Synapse ist demgegenüber wesentlich niedriger. Hier liegen die Werte unter den neurotoxischen Konzentrationen aus Brown et al. (1998d).

Die bei den beiden Methoden festgestellten, unterschiedlichen Messwerte für die Ausschüttungsmenge an Kupfer lassen sich damit erklären, dass man mit TSPP nur freie, mit ICP-MS aber zusätzlich auch gebundene Kupferionen messen kann. Ferner unterscheidet die ICP-MS nicht zwischen der Valenz des Kupfers, während die Fluoreszenz von TSPP nur durch Cu^{2+} wesentlich beeinflusst wird.

Aus den Ergebnissen lässt sich folgendes schließen:

- 1) Da die Konzentration des Kupfers in den synaptischen Vesikeln bei allen Maustypen über der durchschnittlichen Kupferkonzentration im Synaptosom liegt (Herms et al., 1999), scheint es einen Transport in die synaptischen Vesikel gegen den Konzentrationsgradienten zu geben.
- 2) Die PrP-Expression scheint über eine Beeinflussung der Kupferkonzentration in den synaptischen Endungen bzw. Vesikeln, nicht jedoch über eine Veränderung der Anzahl ausgeschütteter Vesikel die Kupferausschüttung von Synapsen zu verändern.

Denkbar ist, dass PrP in diesem Zusammenhang als Puffer für Kupferionen an der synaptischen Plasmamembran dient, wo Kupfer bei der synaptischen Vesikelfreisetzung in hohen Konzentrationen anfällt. Das Prionprotein würde damit der Diffusion der Kupferio-

nen in den synaptischen Spalt entgegenwirken und dessen Wiederaufnahme in das präsynaptische Zytosol ermöglichen. Ob PrP in Anwesenheit von Kupfer verstärkt endozytiert wird (Brown et al., 1997a; Pauly und Harris, 1998) oder ob das an PrP gebundenen Kupfer über andere Transportwege wieder in das präsynaptische Zytosol gelangt, ist nicht geklärt. Offensichtlich jedoch moduliert die Expression des Prionproteins die synaptische Kupferhomöostase.

2.

Einleitung

2.1 Prionkrankheiten

Prionen (PrP, von *proteinaceous infectious particle*) werden als kleine proteinhaltige Partikel angesehen und als Auslöser für eine Reihe von erblichen und übertragbaren Enzephalopathien verantwortlich gemacht, wie etwa der bovinen spongiosen Enzephalopathie (BSE) beim Rind, der Traberkrankheit (*Scrapie*) beim Schaf oder der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (*Creutzfeldt-Jakob-Disease* CJD), dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und der tödlichen familiären Schlaflosigkeit (*Fatal Familial Insomnia* FFI) beim Menschen (Hsiao et al., 1989; Kretzschmar et al., 1998a-b; Kretzschmar, 1993a-b; Kretzschmar et al., 1992; Owen et al., 1989).

Humane spongiforme Enzephalopathien wurden zuerst von Hans Gerhard Creutzfeldt und Alfons Jakob um 1920 beschrieben (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921). Einer der frühen Fälle der damals noch als „spastische Pseudosklerose“ bezeichneten Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) trat familiär gehäuft auf. Wie man später feststellen konnte, wies dieser Fall eine D178N-Mutation des Prionproteingens Prnp auf (Jakob, 1923; Kretzschmar et al., 1995; Meggendorfer, 1930). Demzufolge wurden spongiforme Enzephalopathien von früh an und ungefähr 40 Jahre lang als neurodegenerative und erbliche Störungen angesehen.

Erst sehr viel später bemerkte William Hadlow (1959) als erster Ähnlichkeiten zwischen Scrapie und Kuru, einer tödlichen neurologischen Krankheit beim Menschen übertragen durch

idiopathisch:

- sporadische CJD (sCJD)
- sporadic fatal insomnia (SFI, „sporadische tödliche Insomnie“)

erworben:

- iatrogene CJD (iCJD)
- neue Variante der CJD (nvCJD)
- Kuru

hereditär:

- familiäre CJD (fCJD)
- Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)
- Fatal Familial Insomnia (FFI, „tödliche familiäre Insomnie“)

ABBILDUNG 2.1

DIE HUMANEN PRIONKRANKHEITEN

rituellen Kannibalismus in Neu Guinea. In der Folge gelang erstmals Gajdusek et al. (1966) der experimentelle Nachweis der Übertragbarkeit von Kuru auf Primaten. Auch für andere Prionkrankheiten ist die Übertragbarkeit bereits nachgewiesen worden, so z.B. für die der Kuru-Krankheit in wesentlichen pathologischen Eigenschaften ähnelnden sporadischen Form der CJD (sCJD) oder dem GSS (Masters et al., 1981).

Das Aufkommen einer neuen spongiformen Enzephalopathie im Rind (BSE) in Großbritannien hat seit Anfang der 90er Jahre des letzten Jahrhunderts für große öffentliche Unruhe gesorgt (Anderson et al., 1996; Donnelly et al., 1997). Während man bis zu diesem Zeitpunkt nur 3 Formen der CJD kannte, nämlich die sporadische, die familiäre und die iatrogene¹ Form, wurde ungefähr zeitgleich mit der BSE-Seuche eine neue Variante beschrieben, die nvCJD (*new variant*). Diese neue Krankheitsform erfasst die Patienten schon mit durchschnittlich 29 Jahren, wohingegen die klassischen Varianten in der Regel erst im 7. Lebensjahrzehnt ausbrechen. Ferner schreitet sie wesentlich langsamer voran als ihr klassisches Pendant (z.B. Collinge, 1999). Im Mittel führt die nvCJD erst nach 14 Monaten statt klassischerweise nach weniger als 6 Monaten zum Tod. Insgesamt wurden von der neuen Variante im Zeitraum Oktober 1996 bis November 2002 in Großbritannien 129 Fälle, in Frankreich 6 und in Irland, Kanada, USA und Italien je ein Einzelfall aufgedeckt (WHO, 2002). Da die nvCJD also nicht nur zeitlich, sondern auch örtlich in ähnlichen Bereichen wie denjenigen der BSE-Erkrankung auftrat, vermutete man bald einen Zusammenhang. Wie außerdem gezeigt werden konnte, ist BSE auf eine große Anzahl von Säugetieren übertragbar (Will et al., 1996; Bruce et al., 1997).

Die Natur des Überträgers der spongiformen Enzephalopathien war für lange Jahre Mittelpunkt intensiver Diskussion. Die natürlich erscheinende Annahme aus den 1970ern, es handle sich bei dem Überträger um ein „langsameres Virus“ (slow virus), wurde verworfen, da bis

¹ Die iatrogene Form wird in Einzelfällen durch Cornea- oder Dura-Mater-Transplantate, Therapie mit Wachstumshormon, welches aus Hypophysen von an CJD erkrankten Spendern stammt, oder durch kontaminierte chirurgische Instrumente hervorgerufen.

heute keine viralen Nukleinsäuren in dem befallenen Gewebe gefunden wurden. Ferner wurde gezeigt, dass die infektiöse Einheit höchstens aus 50 Nukleotiden bestehen kann und somit ein Virus als Erreger ausgeschlossen ist. Daher wurde der Begriff „Prion“ vorgeschlagen, um den Überträger von den Viren und Viroiden zu unterscheiden.

Schon früh fand man, dass die von einer der obengenannten Enzephalopathien befallenen Hirne mit einem Protein namens PrP^{Sc} (*Scrapie*), z.T. als unlösliches Amyloid, angereichert sind. Es handelt sich dabei lediglich um ein Konformationsisomer des sogenannten PrP^C (*cellular*), welches in gesunden Säugetieren und Vögeln (Wopfner et al., 1999; Gabriel et al., 1992) exprimiert wird. Diese Entdeckung führte 1982 zur Formulierung der Prusiner-Griffith-oder „protein-only“-Hypothese:

Durch Infektion mit dem krankhaften PrP^{Sc} wird das natürlich vorhandene Protein PrP^C in die krankhafte Form umgewandelt, was zur spongiformen Enzephalopathie führt. Die Überträger und Auslöser der Krankheit sind demnach „nur Proteine“ (Prusiner, 1982; Griffith, 1967; Alper et al., 1967) und basieren nicht wie andere Infektionserreger auf Nukleinsäuren.

Diese Hypothese vermag den Entstehungsmechanismus erworbener („infektiöser“), hereditärer und auch spontan entstehender Prionkrankheiten durch Konformationsänderung des physiologischen PrP^C in die infektiöse Form PrP^{Sc} zu erklären (Prusiner, 1982; Prusiner, 2001).

Die Prusiner-Griffith-Hypothese wird durch Untersuchungen an Prnp-Knockout-Mäusen (Prnp^{0/0}) gestützt, welche das PrP^C nicht exprimieren (Sailer et al., 1994; Weissmann et al., 1994). Diese Tiere erkrankten nicht an Scrapie, während das Wiedereinführen des Prionprotein-Gens dazu führt, dass die Anfälligkeit für die Krankheit wiederkehrt bzw. sich PrP^{Sc} vermehren kann. Bei Tieren, welche ein um 60 Aminosäuren gekürztes PrP exprimieren (da-

runter 5 sogenannte *Octarepeats*), bleibt die Anfälligkeit für Scrapie interessanterweise erhalten (Fischer et al., 1996; Flechsig et al., 2000). Trotzdem ist die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} in vitro noch nicht gelungen und deshalb die Hypothese noch nicht bewiesen.

Während die Bedeutung des Prionproteins PrP^C und dessen konformationell veränderter Isoform PrP^{Sc} für die Ätiologie spongiformer Enzephalopathien durch vielfältige Untersuchungen belegt ist (Aguzzi, Weissmann, 1997; Prusiner, 1998a/c; Prusiner et al., 1998b; Riesner, 1997; Weissmann et al., 1996a), wirft die Pathogenese jedoch trotzdem noch viele Fragen auf (Aguzzi und Heikenwalder, 2003; Weissmann et al., 2002a-b; Weissmann et al., 2002d; Aguzzi und Heppner, 2000; Weissmann und Aguzzi, 1999a; Aguzzi und Weissmann, 1998a).

2.2

Struktur des Prionproteins

2.2.1 Struktur des PrP^C

Die Primärstruktur des PrP^C besteht aus 253 Aminosäureresten (Billeter et al., 1997; Kretzschmar et al., 1986b) mit einer N-terminalen, sowie einer C-terminalen Signalsequenz, welche 22 bzw. 23 Aminosäuren umfasst und vom Translationsprodukt abgespalten wird. Im reifen Zustand besitzt das PrP^C eine weitere zelluläre Spaltstelle, die durch Epitope-Mapping zwischen den Aminosäuren 112 und 138 lokalisiert wurde (Pan et al., 1992).

Das Protein ist an der Zelloberfläche

verankert und wird dort über ein Glykosylphosphatidylinositol-Anteil (GPI) am Serin-Rest 230 gehalten (Stahl et al., 1997). Es besitzt mit den Aminosäureresten 181 und 197 zwei Möglichkeiten der N-Glykosylierung. Die entsprechenden Produkte sind bei der in 2.1 erwähnten neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit nicht identisch mit denen der klassischen Variante (Parchi et al., 1997).

Die Sekundärstruktur erweist sich aufgrund von NMR-Untersuchungen der C-terminalen Hälfte des Proteins als eine doppelsträngige, antiparallele β -Faltblattstruktur mit drei α -Helices (H1, H2 und H3) zwischen den Aminosäuren 121 und 231 (Riek et al., 1996).

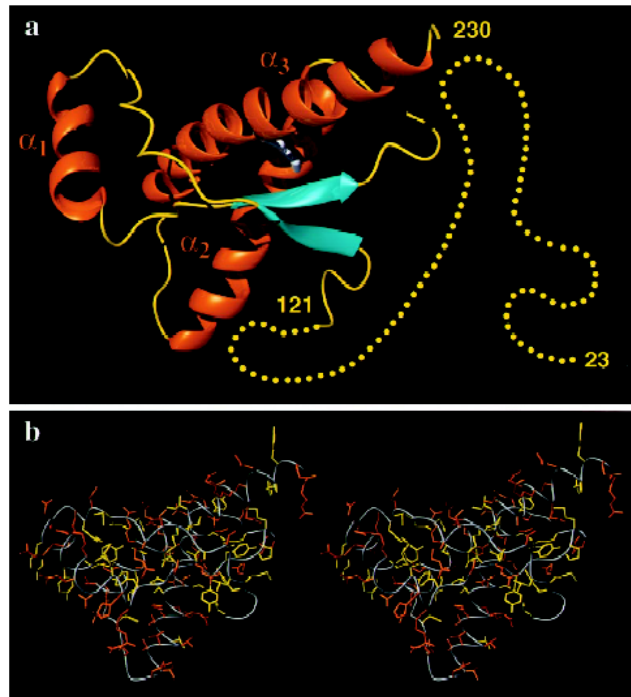


ABBILDUNG 2.2

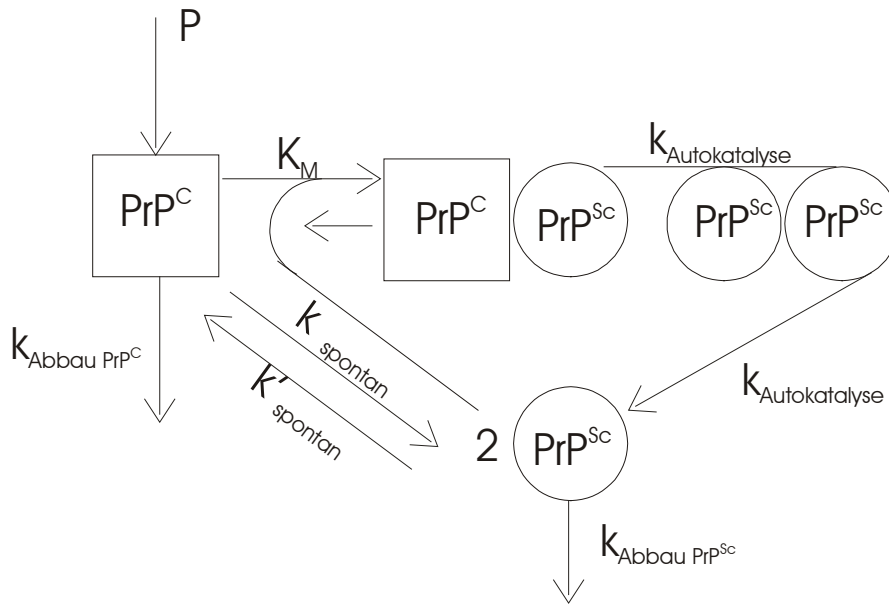
DIE STRUKTUR VON HUMANEM PRP^C, ALS MODELL (A) UND ALS STEREOBILD (B). MAN SIEHT DREI HELIXBEREICHE (ROT) UND EINE DOPPELSTRÄNGIGE, ANTIPARALLELE β -FALTBLATT-STRUKTUR (ZYAN). AUS: ZAHN ET AL. (2000)

2.2.2 Strukturenvergleich von PrP^C und PrP^{Sc}

Das Konformationsisomer PrP^{Sc} zeigt im Gegensatz zu PrP^C längere Abschnitte mit β -Faltblatt-Struktureigenschaften (Caughey et al., 1991; Pan et al., 1993; Riek et al., 1996; Riesner et al., 1997; Safar et al., 1993a-b; Stöckel et al., 1998). Dieser Unterschied äußert sich chemisch neben einem verschiedenen Löslichkeitsverhalten in der Tatsache, dass PrP^{Sc} durch Proteinase-K-Verdauung (nach Behandlung mit Detergentien) nicht vollständig zersetzt wird: Nach Abspaltung von ca. 67 Aminosäuren am N-Terminus durch limitierte Proteolyse bleibt ein Protein von 27-30 kDa übrig. Bei sporadischen CJD-Fällen sind mindestens zwei Proteinase K-sensitive Spaltstellen im Bereich der Aminosäuren 82 bis 97 vorhanden, die mit ganz charakteristischen klinischen und pathologischen Merkmalen der Krankheit assoziiert sind (Parchi et al., 1997; Parchi et al., 1996; Collinge et al., 1994).

2.3 Theorie der Umwandlung des Prionproteins

Gemäß der Prusiner-Griffith-Hypothese erfolgt die Vermehrung krankhafter Prionen ohne Mitwirkung von DNA oder RNA, wie es bei üblichen Krankheitserregern der Fall ist. Theorien zur Erklärung des Vermehrungsprozesses beschreibt z.B. Eigen (1996): Prinzipiell geht man dabei davon aus, dass die Vermehrung auf der Basis einer autokatalytischen chemischen Reaktion stattfindet, die evt. durch Chaperone gefördert wird (Stöckel et al., 1998).



Auf dieser Grundlage erhält man die Prozessgleichungen

$$\frac{d[PrP^C]}{dt} = P - k_{\text{Abbau PrP}^C} \cdot [PrP^C] - k_{\text{spontan}} \cdot [PrP^C] - \frac{k_{\text{Autokatalyse}} \cdot [PrP^C]}{K_M + [PrP^C]} \cdot [PrP^{Sc}]$$

$$\frac{d[PrP^{Sc}]}{dt} = k_{\text{spontan}} \cdot [PrP^C] + \frac{k_{\text{Autokatalyse}} \cdot [PrP^C]}{K_M + [PrP^C]} \cdot [PrP^{Sc}] - (k'_{\text{spontan}} + k_{\text{Abbau PrP}^{Sc}}) \cdot [PrP^{Sc}]$$

Im Gleichgewicht sind die zeitlichen Ableitungen der Konzentrationen gleich Null. Man erhält:

$$[PrP^C] = \frac{P}{k_{\text{Abbau PrP}^C} + k_{\text{spontan}} + \frac{k_{\text{Autokatalyse}} \cdot [PrP^{Sc}]}{K_M + [PrP^C]}}$$

$$[PrP^{Sc}] = \frac{k_{\text{spontan}} \cdot [PrP^C]}{k'_{\text{spontan}} + k_{\text{Abbau PrP}^{Sc}} - \frac{k_{\text{Autokatalyse}} \cdot [PrP^C]}{K_M + [PrP^C]}}$$

Im gesunden Fall ist die spontane Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} sehr unwahrscheinlich, d.h.

$k_{\text{spontan}} \approx 0$. Ferner fehlt der autokatalytische Prozess und somit ist $\frac{k_{\text{Autokatalyse}}}{K_M + [PrP^C]} \approx 0$. Für die

Konzentrationen der beiden Konformationsisomere gilt dann:

$$[PrP^C] \approx \frac{P}{k_{\text{Abbau PrP}^C}}$$

$$[PrP^{Sc}] \approx \frac{k_{\text{spontan}} \cdot [PrP^C]}{k'_{\text{spontan}} + k_{\text{Abbau PrP}^{Sc}}} \approx 0$$

Ist jedoch der autokatalytische Prozess gestartet, z.B. durch Infektion mit PrP^{Sc} , so ergibt sich (Eigen, 1996):

$$[PrP^{Sc}] \approx \frac{P}{k_{\text{Abbau PrP}^{Sc}}} \cdot \left(1 - \frac{k_{\text{Abbau PrP}^{Sc}} \cdot k_{\text{Abbau PrP}^C}}{P \cdot \frac{k_{\text{Autokatalyse}}}{K_M}} \right) \approx \frac{P}{k_{\text{Abbau PrP}^{Sc}}} \gg \frac{k_{\text{Abbau PrP}^{Sc}} + k'_{\text{spontan}}}{\frac{k_{\text{Autokatalyse}}}{K_M}} \approx [PrP^C]$$

In diesem Falle vermehren sich die krankhaften Prionproteine so stark, dass sie im Gleichgewichtsstadium gegenüber dem normalen PrP^C eindeutig überwiegen.

2.4 Lokalisation des Prionproteins

PrP^C wird in größeren Mengen praktisch von allen Neuronen des ZNS exprimiert (Kretzschmar et al., 1986a). Darüber hinaus wird es, wenn auch in deutlich geringerem Umfang, in Astrozyten, Oligodendrozyten (Moser et al., 1995) und Mikroglia (Brown et al., 1998f) angetroffen. Außerhalb des Gehirns entsteht PrP^C in Leukozyten, Makrophagen (Cashman et al., 1990; Dodelet und Cashman, 1998; Farquhar et al., 1998), sowie während der Embryogenese auch in vielen anderen Organen (Manson et al., 1992).

Älteren Publikationen zufolge ist das neuronale PrP^C vor allem am Soma zu finden (Bendheim et al., 1992; DeArmond et al., 1987; Piccardo et al., 1990; Safar et al., 1990b), während neuere Arbeiten die bevorzugt synaptische Expression von PrP^C vermuten lassen (Borchelt et al., 1994; Fournier et al., 1995; Sales et al., 1998; Taraboulos et al., 1992).

Die Möglichkeit der synaptischen Lokalisation des Prionproteins folgt aus den immunhistochemischen Untersuchungen von Taraboulos et al. (1992), die an Schnitten aus dem Gehirn des Hamsters das zelluläre Prionprotein vor allem dem Neuropil, also einem im wesentlichen aus Dendritenbäumen, Axonterminalen und Synapsen bestehenden Gewebe, zuordnen. Die Befunde von Borchelt et al. (1994) erhärten diese Ergebnisse, indem sie mit Hilfe von radioaktiv markiertem Prionprotein beweisen, dass PrP^C dem schnellen axonalen Transport unterliegt. Weitere immunelektronenmikroskopische (Fournier et al., 2000; Fournier et al., 1995; Sales et al., 1998), sowie immunhistochemische Untersuchungen (Chishti et al., 1997; Herms et al., 1999) an PrP^C-überexprimierenden, transgenen Tieren bestätigen dies. Der elektronenmikroskopische Nachweis gelingt jedoch nicht eindeutig, da die angewandte und notwendige Methodik mit einem sehr schlechten Gewebeerhalt und der Zerstörung der Zellmembran verbunden ist. Insbesondere sind die Ergebnisse von Fournier et al. (1995) strittig, die das Prionprotein vor allem an synaptischen Vesikeln sehen. Biochemische Methoden, wie etwa die Western Blot Analyse der PrP^C-Expression nach Anreicherung von Synaptosomen bzw. synaptischen Vesikeln, unterstützen eher die Lokalisation der Proteine in der synaptischen Plasmamembran (Herms et al., 1999), weniger in der Vesikelfraktion.

PrP^C haftet über die oben erwähnte Glykosylphosphatidyl-Inositol-Verbindung an der Neurosenoberfläche (Borchelt et al., 1993). Es unterliegt einem ständigen Austausch, indem es endozytotisch aufgenommen und verarbeitet wird und danach wieder auf der Zelloberfläche erscheint (Collinge et al., 1994; Shyng et al., 1993). Bei Erkrankung wird das gesunde PrP^C dort entweder direkt, oder erst nach Endozytose in das pathologische PrP^{Sc} umgewandelt, wie Pulse-Chase-Experimente in Scrapie-infizierten Neuroblastomzellen zeigen (Caughey und Raymond, 1991).

2.5 Funktion des Prionproteins

Das physiologische PrP^C wurde bisher in allen Untersuchungen an Säugetieren nachgewiesen, so z.B. in Affen (Schätzl et al., 1997), Hamstern (Kretzschmar et al., 1986a), Mäusen (Fischer et al., 1996), Hasen (Loftus et al., 1997) und vielen anderen Säugetieren (Groschup et al., 1997), sowie bei Vögeln (Wopfner et al., 1999; Hornshaw et al., 1995a-b). Die Tatsache, dass sich das Protein im Laufe der Evolution nur unwesentlich verändert hat, d.h. dass das Prionprotein-Gen hoch konserviert ist (Westaway et al., 2002; Billeter et al., 1997; Kretzschmar et al., 1986b), verweist auf eine wichtige physiologische Funktion des PrP (Gabriel et al., 1992).

Die im letzten Abschnitt erwähnte präferentielle Lokalisation des Prionproteins an der Plasmamembran von Neuronen, genauer deren präsynaptischen Endigungen, deutet auf eine Funktion bei der synaptischen Transmission bzw. der Kontrolle neuronaler Erregbarkeit.

2.5.1 PrP, ein synaptisches Protein

Zur Klärung der Funktion des Prionproteins in Neuronen wurden bereits verschiedene elektrophysiologische Untersuchungen an der Prionprotein-Knockout-Maus (Prnp^{0/0}) durchgeführt.

Sie enthüllen im wesentlichen drei Veränderungen in den synaptischen Strömen bei der PrP^{0/0}- im Vergleich zur WT-Maus:

- Zum einen berichten Collinge et al. (1994) über eine veränderte synaptische Transmission nach repetitiver Stimulation, der sog. Langzeitpotenzierung (engl. *long-term potentiation*, LTP), bei der von Büeler et al. (1992) und auch bei der von Manson et al. (1994) generierten Prnp^{0/0}-Maus.

- Außerdem beobachteten Collinge et al. (1994) und Whittington et al. (1995) eine veränderte Kinetik der inhibitorischen postsynaptischen Ströme (engl. *inhibitory postsynaptic currents*, IPSCs) in Form einer Verlängerung der Aktivierungszeit GABA_A-Rezeptor vermittelter IPSCs an hippocampalen Neuronen der Prnp^{0/0}-Maus von Büeler et al. (1992).
- Unabhängig von den Beobachtungen an den inhibitorischen Synapsen wird von Colling et al. (1996) auch eine Störung des späten Nachhyperpolarisationsstroms (engl. *late afterhyperpolarisation current*, AHP) bei der Prnp^{0/0}-Maus beschrieben. Dieser Strom ist für die Kinetik der Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials nach einem Aktionspotential von großer Bedeutung und hat damit entscheidenden Einfluss auf die Aktionspotential-Häufigkeit.

Als Ursache für die verlängerten IPSCs wird eine Alteration des GABA_A-Rezeptors auf der postsynaptischen Membran diskutiert. Dafür spricht die gleichzeitig beobachtete Verminderung der Amplitude stimulierter inhibitorisch postsynaptischer Ströme und die Verschiebung des Umkehrpotentials GABA_A-Rezeptor vermittelter Chloridströme. Eine direkte Interaktion des Prionproteins mit dem GABA_A-Rezeptor konnte aber ausgeschlossen werden (Kannenberg et al., 1995).

Die gestörten AHPs bei der Prnp^{0/0}-Maus erklären Colling et al. (1996) mit einer verminderten Leitfähigkeit kalziumaktivierter Kaliumkanäle infolge einer gestörten intrazellulären Kalziumhomöostase (ebenso: Jefferys et al., 1994; Johnston et al., 1997; Kristensson et al., 1993; Wong et al., 1996).

Tatsächlich zeigt die Untersuchung kalziumaktivierter Kaliumströme in Purkinjezellen der Prnp^{0/0}-Maus eine reduzierte Amplitude dieser Ströme (Herms et al., 2001; Herms et al., 1998b). Bei der Tg35-Linie, die das Prionprotein in allen Neuronen überexprimiert, kann eine Wiederherstellung der Amplitude der kalziumaktivierten Kaliumleitfähigkeiten beobachtet werden, während die Tg20-Linie, welche in allen Neuronen mit Ausnahme der Purkinjezellen

das Prionprotein überexprimiert, keine Wiederherstellung der Amplituden zeigt (Tings et al., 1998).

Mikrofluorimetrische Untersuchungen der intrazellulären Kalziumhomöostase bei der Prnp^{0/0}-Maus bestätigen weiter, dass die Reduktion der kalziumaktivierten Kaliumströme am ehesten durch eine verminderte Kalziumfreisetzung aus intrazellulären kalziumsensitiven Kalziumspeichern zu erklären ist (Tings et al., 1998; Herms et al., 1998b). Whatley et al. (1995) beschreiben darüber hinaus sogar einen Effekt von rekombinant hergestelltem PrP^C auf die intrazelluläre Kalziumkonzentration von Synaptosomen.

Verschiedene Arbeiten (Herms et al., 2000, 2001; Thellung et al., 2000) zeigen schließlich, dass das Fehlen des PrP^C die Modulation der spannungsaktivierten L-Typ Kalziumkanäle (*L-type voltage-gated calcium channels*, VGCC) verändert und so die Kalziumhomöostase beeinflusst.

Infolge der obigen Ergebnisse kann man tatsächlich eine Funktion des PrP^C an der Synapse vermuten (Collinge et al., 1994; Whittington et al., 1995). Dieser Ort ist sowohl bei humanen Prionerkrankungen als auch bei Scrapie sehr früh im Krankheitsverlauf betroffen (Johnston et al., 1997; Kitamoto et al., 1992a-b).

2.5.2 Andere Befunde zur Funktion des PrP

Darüberhinaus können bei der Prnp^{0/0}-Maus von Büeler et al. (1992) bis auf eine Veränderung des Schlaf-Wach-Rhythmus (Tobler et al., 1997; Tobler et al., 1996) keinerlei Auffälligkeiten festgestellt werden. Weder in ihrer Entwicklung, noch in ihrem Verhalten zeigen sich signifikante Unterschiede zur WT-Maus (Büeler et al., 1992). Auch in einer weiteren von Manson et al. (1994) generierten Prnp^{0/0}-Linie zeigen sich keine Unterschiede.

Eine dritte durch Sakaguchi et al. (1996) generierte Prnp^{0/0}-Linie fällt allerdings in höherem Alter (> 70 Wochen) durch eine progrediente Ataxie und einen Verlust von Purkinjezellen auf. Weissmann et al. (1996a) erklärte diese Erscheinung zunächst mit einer zusätzlichen Deletion von Intronsequenzen des Prnp-Gens der Knockout-Linie. Eine andere Ursache könnte das in dieser Mauslinie verstärkt exprimierte Protein „Doppel“ (Dpl) liefern, dessen zugehöriges Gen (Prnd) zu 25 % mit allen bekannten Prnp-Genen identisch ist (Moore et al., 1999). Aufgrund ähnlicher Faltungseigenschaften wie PrP^C (Lührs et al., 2003; Riek und Lührs, 2003; Mo et al., 2001) könnte Dpl die Funktion von PrP in den Knockout-Mäusen übernehmen, ohne sich jedoch in eine dem PrP^{Sc} analoge Isoform umzuwandeln (Settanni et al., 2002; Moore et al., 1999).

Eine in der Unterschiedlichkeit der beiden Proteine begründete eingeschränkte Funktionsfähigkeit (Whyte et al., 2003; Shaked et al., 2002; Moore et al., 1999) könnte dann das bei der Prnp^{0/0}-Maus von Sakaguchi et al. (1996) gefundene Krankheitsbild erklären, allerdings mit einer komplett anderen Pathogenese (Weissmann und Agguzzi, 1999a).

Diese Hypothese stützen auch Peoc'h et al. (2003) und Behrens et al. (2001), indem sie zeigen, dass eine Infektion mit PrP^{Sc} sowohl in der Maus als auch beim Menschen nicht zu einer veränderten Dpl-Expression führt, und umgekehrt die Pathogenese von Prionerkrankungen bei fehlender Expression des Proteins Dpl nicht verändert ist. Dpl scheint daher keine Bedeutung bei der Entstehung der transmissiblen Prionerkrankungen zu haben.

Demgegenüber ist die neurotoxische Wirkung der Dpl-Überexpression, welche die Symptome der von Sakaguchi et al. (1996) generierten Prnp^{0/0}-Maus verursachen kann, durch Wiedereinführen von PrP^C neutralisierbar (Cui et al., 2003). Dies lässt vermuten, dass PrP^C nach der Wiedereinführung die eingeschränkte Funktionsfähigkeit des Dpl ausgleicht.

2.5.3 PrP als Regulator der Kupferhomöostase

Auf der Suche nach der physiologischen Funktion des PrP führten biochemische Untersuchungen zur Identifizierung einer Vielzahl von Bindungspartnern des PrP, deren biologische Relevanz jedoch bisher nicht belegt werden konnte. Unter ihnen sind GFAP (*glial fibrillary acidic protein*; Oesch et al., 1990), Bcl-2 (Kurschner und Morgan, 1995, 1996), molekulare Chaperone (Edenhofer et al., 1996), das APLP1 (*amyloid precursor like protein*; Yehiely et al., 1997), der 37-kDa Laminin-Rezeptor (Rieger et al., 1998) und ein nicht näher charakterisiertes 66-kDa Membranprotein (Martins et al., 1998) zu nennen.

Darüber hinaus bindet PrP über eine Octarepeat-Sequenz (PHGGGWGQ)_{x4} (s. Abbildung 2.3A) sehr selektiv Kupferionen (Jackson et al., 2001a; Kramer et al., 2001; Miura et al., 1999; Brown et al., 1997a; Miura et al., 1996; Hornshaw et al., 1995ab).

Brown et al. (1997a) beobachten diese Bindung sogar in vivo. Sie finden eine Abnahme des Kupfer-, nicht aber des Zink- oder Eisengehalts in Gehirnen von Wildtyp-Mäusen, wenn PrP^C von den Membranen durch *Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C* (PI-PLC) entfernt wird. In Prnp^{0/0}-Hirnen verändert sich dagegen der Kupfergehalt nach einer solchen Behandlung mit PI-PLC nicht.

In-vitro-Untersuchungen an einem größeren Bruchstück (PrP29-231) erhärten diese Feststellung (Stöckel et al., 1998).

Die Bindung zeigt ...

- ... eine Sättigung ab ca. 5 μM Cu^{2+} (Kramer et al., 2001).
- ... Kooperativität (Kramer et al., 2001). Dabei wird angenommen, dass die Octarepeat-Region 60-91 bis zu 4 Cu^{2+} bindet (Kramer et al., 2001; Viles et al., 1999; Miura et al., 1999; Brown et al., 1997a; Hornshaw et al., 1995ab).
- ... eine stark pH-Abhängigkeit: Die Dissoziationskonstante erreicht ein Minimum bei $\text{pH} \approx 7,4$ und steigt bei Erniedrigung des pH steil an. (Kramer et al., 2001; Viles et al., 1999; Miura et al., 1999).

- ... eine hohe Spezifität für Cu^{2+} im Vergleich zu Ca^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (Kramer et al., 2001; Viles et al., 1999; Miura et al., 1999; Brown et al., 1997a).
- ... eine Dissoziationskonstante K_D der Octarepeat-Region im μM -Bereich. So finden Miura et al. (1999) mit dem Rest 23-98 eine K_D von $5,9 \mu\text{M}$ und Hornshaw et al. (1995ab) mit dem Rest 60-91 eine K_D von $6,7 \mu\text{M}$. Da Glycin stark kompetitiv auf die Bindung wirkt, ist eine sehr viel niedrigere K_D nicht anzunehmen (Garnett und Viles, 2003).

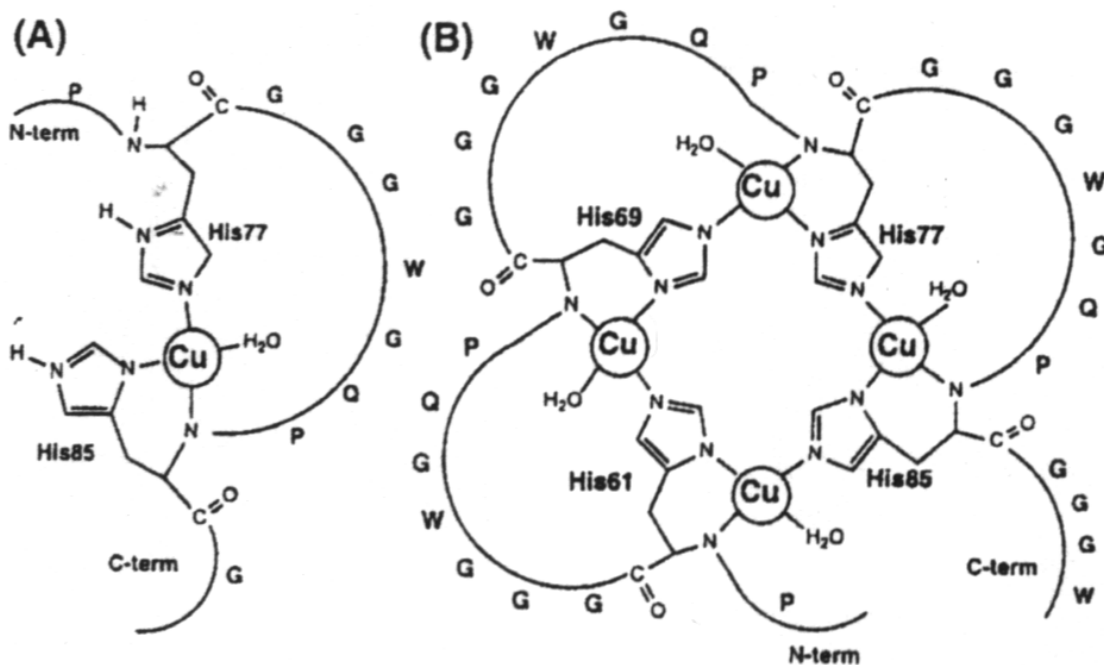


ABBILDUNG 2.3

BINDUNGSREGIONEN DES PRP FÜR KUPFER NACH VILES ET AL. (1999). DIE BINDUNG WIRD DORT IM BEREICH PRP76-86 (A) BZW. PRP58-91 (B) ANGEZEIGT.

Interessanterweise ist gerade diese kupferbindende Octarepeat-Region hochkonserviert unter den Säugetieren und Vögeln. Diese Tatsache bekräftigt die Annahme, dass die Kupferbindung mit der Funktion des PrP^C zu tun hat.

Die Auffälligkeiten bei den Prnp^{0/0}-Mäusen aus Abschnitt 2.5.1 und 2.5.2 lassen sich demgegenüber allesamt mit einer veränderten Kupferhomöostase erklären:

- Spontane, GABA_A-Rezeptor vermittelte IPSC's verringern sich in Purkinjezellen eines Hirnschnittpräparats von Prnp^{0/0}-Mäusen unter Zugabe von lediglich 2 µM Cu²⁺, ganz im Gegensatz zu ihren Wildtyp-Analoga (WT) (Brown, 1997a). Da der GABA_A-Rezeptor bekanntlich schon durch freie Kupferkonzentrationen im Bereich von 1 µM beeinträchtigt wird (Sharonova et al., 1998), ist anzunehmen, dass die Unterschiede zwischen Prnp^{0/0}- und Wildtyp-Maus durch die fehlende Pufferung des Kupfers am synaptischen Spalt durch das Prionprotein bedingt sind.
- Nam und Hockberger (1992), sowie Sharonova et al. (1998) berichten, dass Kupfer die synaptischen Kalziumströme über die oben erwähnten spannungsaktivierten Kalziumkanäle (VGCC) bereits in Konzentrationen von wenigen µM deutlich beeinflusst. Kupfer verringert dabei die Leitfähigkeit sowohl des GABA_A-Rezeptors, als auch die der VGCC, welche die intrazelluläre Kalziumhomöostase entscheidend modulieren. Eine fehlende Kupferpufferung durch PrP bei der Knockout-Maus könnte deshalb eine – wenn auch nur geringe – Erhöhung der extrazellulären Kupferkonzentration im synaptischen Spalt und somit eine verminderte Leitfähigkeit spannungsaktivierter Kalziumkanäle, sowie eine Veränderung der Kinetik des GABA_A-Rezeptors zur Folge haben. Die beobachtete Alteration der intrazellulären Kalziumhomöostase bei der Prnp^{0/0}-Maus, die Veränderungen der Leitfähigkeit kalziumabhängiger Ionenströme und ebenso die dokumentierten Veränderungen der durch den GABA_A-Rezeptor vermittelten, inhibitorisch postsynaptischen Ströme wären hiermit erklärbar.
- Nach Doreulee et al. (1997) werden die EPSPs in der CA1-region durch 10 µM und 100 µM Cu²⁺ auf ca. 85 % bzw. 50 % im Vergleich zur Kontrolle gesenkt. Die Langzeitpotenzierung wird bereits durch 1 µM freies Cu²⁺ blockiert.

- Die von Tobler et al. (1996, 1997) beschriebene Veränderung des Schlaf-Wach-Rhythmus bei der Prnp^{0/0}-Maus kann ebenfalls auf eine Störung des Kupferstoffwechsels zurückgeführt werden. Bei reduzierter Kupferaufnahme vermindert sich die Aktivität kupferabhängiger Enzyme, so z.B. die der kupferabhängigen Monoaminoxidase (Oxenkrug et al., 1998). Diese wiederum synthetisiert das für den Schlaf-Wach-Rhythmus verantwortliche Hormon Melatonin (McArthur et al., 1991).
- Schließlich bindet auch das Protein Dpl Kupfer (Qin et al., 2003), obwohl beim ihm die Octarepeat-Region des PrP^C fehlt. Wenn also die Funktion des PrP^C mit der Kupferbindung seiner Octarepeat-Region zu tun haben sollte, könnte Dpl diese Funktion zwar übernehmen, sie aber evt. nur eingeschränkt ausüben, was die oben erwähnten Beobachtungen zu Dpl erklären kann.

Als Folge der fehlenden Kupferbindung in Prnp^{0/0}-Kulturen und der damit erhöhten extrazellulären Konzentration an freien Cu²⁺ wird vermutet, dass durch die sog. Fenton-Reaktion verstärkt Sauerstoffradikale gebildet werden (Stöckel et al., 1998). Dies wird durch zellbiologischen Untersuchungen an primären neuronalen Kulturen der Prnp^{0/0}-Maus gestützt (Brown et al., 1997b/d), bei denen durch erhöhte Vulnerabilität gegen oxidativen Stress die Überlebenszeit reduziert ist (Brown et al., 1997b/d; Kretzschmar et al., 1997). Ebenso zeigen Brown et al. (1998d), dass Kleinhirnzellen von Prnp^{0/0}-Mäusen durch Cu²⁺ selektiv stärker geschädigt werden als ihre WT-Analoga. Die beschriebene Vulnerabilität wird bei Prnp^{0/0}-Neuronen, nicht jedoch bei WT-Neuronen durch Hinzugabe der oben erwähnten kupferbindenden Octarepeats aus der N-terminalen PrP^C-Sequenz kompensiert (Brown et al., 1998d).

Demgegenüber zeigen Hartmann und Evenson (1992), dass ein intrazellulärer Mangel an Kupfer in den Synapsen auch zu Neurodegeneration führt. Dies folgt aus der Bedeutung von Kupfer für die Aktivität von lebenswichtigen Enzymen, etwa die der Superoxid-Dismutase

(SOD), welche eine Bildung von schädlichen Radikalen verhindert, der Cytochrom-C-Oxidase, welche für den Elektronentransport in den Mitochondrien verantwortlich ist, oder der Dopamin- β -Hydroxylase und der Tyrosinase, welche die Katecholamin- bzw. die Melaninsynthese katalysieren. Die Aktivität der Superoxid-Dismutase wiederum hängt von der PrP-Expression ab und ist in Prn^{P^{0/0}}-Mäusen erniedrigt (Brown et al., 1999a; Brown und Besinger, 1998b; Brown, 1997b). So könnten sich auch die Scrapie-ähnlichen Symptome von Mäusen erklären, denen man den Kupferbinder Cuprison ins Futter gemischt hat (Kimberlin et al., 1974; Pattison et al., 1971).

Die in den letzten beiden Absätzen geschilderten Ergebnisse lassen eine hohe Reaktionsempfindlichkeit der Nervenzellen auf Störungen der Kupfer-Homöostase erkennen – sei es durch Erhöhung der extrazellulären, sei es durch Verringerung der intrazellulären Kupferkonzentration.

2.6 Aufgabenstellung, Motivation

Um die Funktion der Kupferbindung durch PrP zu erhellen, bedarf es genauer Messreihen über die In-vivo-Konzentration des Kupfers im Gehirn. Bislang fehlen dazu sowohl verlässliche Werte, wie auch geeignete Methoden. Ansätze liefern Colburn und Maas (1965), sowie Rajan et al. (1976), indem sie feststellen, dass ein großer Teil des Kupfers in den Mitochondrien und an den Membranen zu finden ist. Überdurchschnittliche Kupferkonzentrationen werden auch in den Nervenendigungen bzw. Synaptosomen gemessen. Kardos et al. (1990) schätzen die Menge an Kupfer, die bei Entladung freigesetzt wird, auf $7 \cdot 10^{-20}$ g pro Synaptosom und folgern so auf Konzentrationen von 6-15 $\mu\text{g/ml} = 100\text{-}250 \mu\text{M Cu}^{2+}$ im synaptischen Spalt (Zn^{2+} ca. 300 μM). Diese Werte erscheinen jedoch angesichts der oben genannten Empfindlichkeit der Neuronen auf Kupferionen als ziemlich überhöht. Weitere Wer-

te, die in der Fachliteratur auftauchen, sind in Tabelle 6.1 zusammengefasst. Sie basieren auf In-vitro-Experimenten und Schätzungen. Dynamische Messungen, welche die Ausschüttung von Kupfer bei der Depolarisation messen, fehlen gänzlich.

Die Intention dieser Arbeit bestand daher darin, ...

- 1) ... überhaupt erst einmal eine Methode zu entwickeln, die geeignet ist, Cu^{2+} - Konzentrationen in vivo, idealerweise im synaptischen Spalt zu bestimmen.

Die Erfolge der Ca^{2+} -Farbstoffe in den letzten Jahren ließen auf einen geeigneten Fluoreszenzfarbstoff hoffen, welcher spezifisch Kupferionen nachzuweisen vermag. Unweigerlich taucht dabei das Problem auf, dass die geschätzten Konzentrationen an Kupfer im Vergleich zu denen von Kalzium um einen Faktor der Größenordnung 100 niedriger liegen (Stöckel et al., 1998; Hartter und Barnea, 1988). Der Farbstoff muss also sowohl sehr spezifisch als auch sehr sensitiv auf Kupfer reagieren und darf dabei den physiologischen Status der Zellen nicht verändern.

Um dieses Ziel zu erreichen, werden bei einer Reihe von Fluoreszenzfarbstoffen die Dissoziationskonstanten mit den gängigsten Metallionen (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Fe^{3+} , Na^+ , K^+) bestimmt. Nach dem Test der Kalziumfarbstoffe Fura Red, Fluo 3, Ca Green 1 und Ca Crimson werden Repräsentanten der Phenanthroline (Phen Green) und auch der Porphyrine (TCPP, TSPP) in der Hoffnung auf eine starke Reaktion untersucht, unter denen sich schließlich ein geeigneter Farbstoff fand (TSPP = Tetrakis-(4-Sulfophenyl)-Porphyrin, s.u.). Letzterer wird bisher nur als Photosensitizer in der Therapie von Tumoren eingesetzt. Eine Anwendung als Fluoreszenzfarbstoff zur Messung von Metallionen-Konzentrationen in biologischen Proben ist dagegen in der Literatur nicht beschrieben.

Vor der Anwendung werden noch neben der Dissoziationskonstante K_D die Abhängigkeit der Fluoreszenz von pH und Temperatur, die Membranimpermeabilität und die Unschädlichkeit, sowie das Zeitverhalten bei Komplexbildung mit Kupferionen überprüft.

- 2) ... mit dem gefundenen Farbstoff zu prüfen, ob und in welcher Konzentration Kupfer bei der Depolarisation ausgeschüttet wird.

Da Synapsen im Lichtmikroskop schwer darstellbar sind, werden Synaptosomen verwendet, deren Verhalten sich leicht im Spektrometer beobachten lässt. Diese Vorgehensweise hat ferner den Vorteil, dass man die Ausschüttung einer Synapse um ein Vielfaches erhöht und so die Nachweisgrenze ausweitet.

Zusätzlich kann auf diese Weise mit TSPP auch die Ausschüttung von Zink nach Depolarisation in vivo und quantitativ beobachtet werden.

- 3) ... zu analysieren, ob die freigesetzten Mengen an Kupfer von der PrP-Expression abhängen. Dabei wird einerseits die *Menge an PrP-Expression* durch Vergleich überexprimierender Tg20- und nicht exprimierender Knockout-Mäuse ($Prnp^{0/0}$) mit den normalen Wildtyp-Äquivalenten betrachtet, andererseits die *Art des exprimierten PrP* durch Hinzuziehen der C4-Maus variiert, welche ein um die kupferbindende Domäne des Prionproteins verkürztes Protein exprimiert.

- 4) ... eine Kreuzprobe mit anderen Messverfahren zu erarbeiten, da Fluoreszenzfarbstoffe bekanntlich sehr unspezifisch sind und auf eine Reihe von äußeren Bedingungen reagieren können.

Hierbei wird eine physikalische Methode, die Massenspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS), zur Überprüfung benutzt, die aber für In-vivo-Messungen nicht uneingeschränkt anwendbar und für die Laborroutine zu aufwendig im Vergleich zur Fluoreszenzmessung ist. Mit dieser Methode wird gleichzeitig auch die Ausschüttung anderer Metalle (Eisen, Zink, Kobalt, Mangan und Nickel) untersucht.

- 5) ... herauszufinden, ob die veränderte Kupferausschüttung durch eine verminderte Exozytose synaptischer Vesikel entsteht.

Dazu wird das Verhalten von Synaptosomen der verschiedenen transgenen Maustypen bei der Depolarisation eingehend untersucht und die Glutamatausschüttung, die basale Kalzi-

umkonzentration und der Kalziueinstrom, sowie die Anzahl der verschmolzenen Vesikel pro Synptosom, gemessen als Membranvergrößerung, verglichen.

3.

Theorie

3.1 Fluoreszenz der Farbstoffe

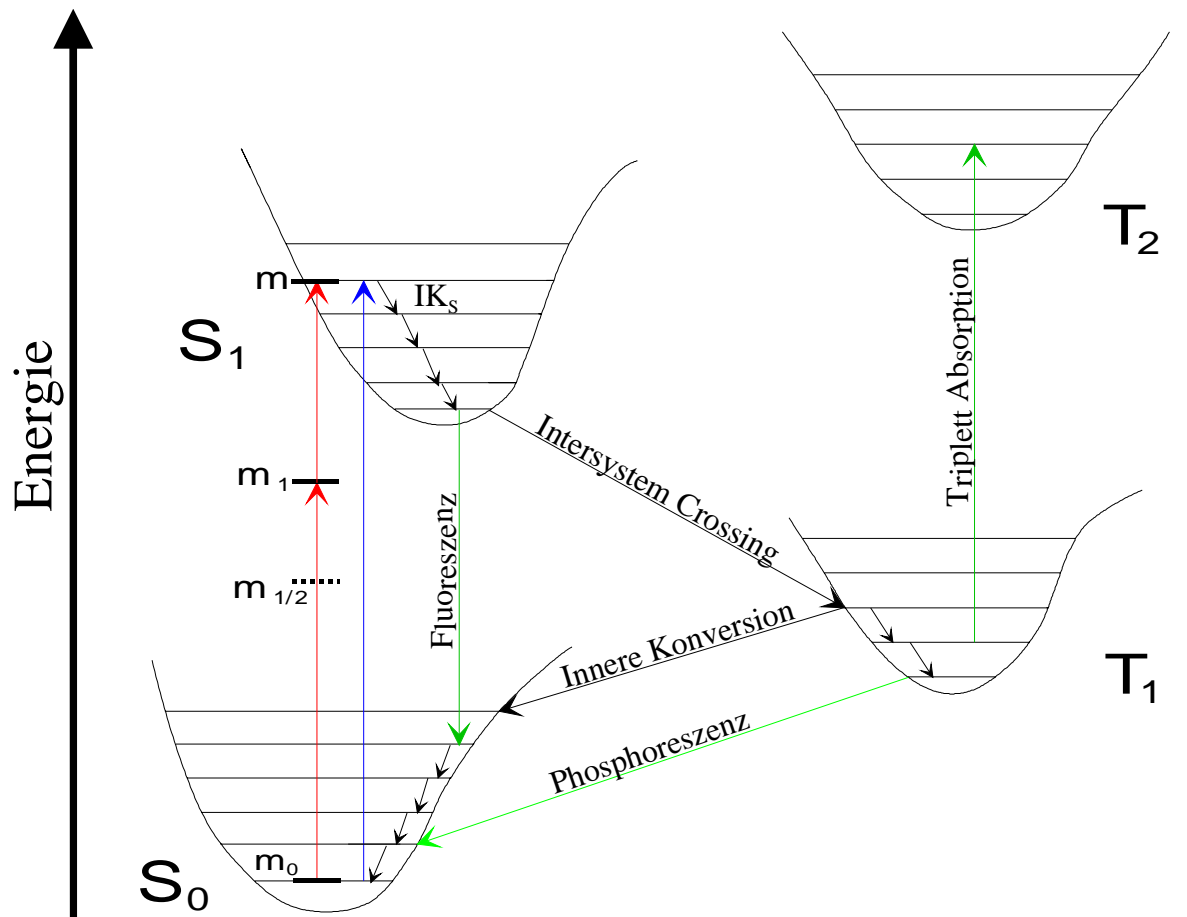


ABBILDUNG 3.1

ATOMARE MECHANISMEN DER ABGABE / AUFNAHME VON ENERGIE IN FORM VON LICHT. DER ÜBERGANG DES ELEKTRONS VOM GRUNDZUSTAND S_0 ZUM ANGEREGTEN ZUSTAND S_1 KANN ALS EIN-PHOTONEN-ABSORPTION ($m_0 \rightarrow m$) ODER ÜBER m_1 BZW. $m_{1/2}$ ALS ZWEI-PHOTONEN-ABSORPTION ERREICHT WERDEN.

3.1.1 Lambert-Beer-Gesetz

Nach Anregung eines Fluoreszenzfarbstoffes aus dem Grundzustand S_0 (s. Abbildung 3.1) in den Zustand S_1 hat das angeregte Elektron neben der Fluoreszenz noch verschiedene andere Möglichkeiten, um wieder in den Grundzustand zurückzukehren. Den Anteil der Anregungsenergie, welcher in die Fluoreszenz umgewandelt wird, nennt man *Quanteneffizienz*

η . Bezeichnet man die Intensitäten des transmittierten und des eingestrahnten Lichtes mit I_0 und I , so erhält man für die Intensität F des Fluoreszenzlichtes:

$$F = \eta \cdot (I_0 - I) \quad (\text{Gleichung 1})$$

Die Quanteneffizienz ist im wesentlichen unabhängig von der Anregungswellenlänge und der Konzentration des Farbstoffs. Der Anteil an absorbiertem Licht berechnet sich nach dem *Lambert-Beerschen Gesetz*:

$$I = I_0 \cdot e^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad (\text{Gleichung 2})$$

ε ist der Extinktionskoeffizient, c die Konzentration des Farbstoffes und l die Länge der Küvette, die den Farbstoff enthält. Das Produkt $A = \varepsilon \cdot c \cdot l$ nennt man Absorption.

Verbindet man die letzten beiden Gleichungen, so erhält man

$$F = \eta \cdot I_0 \cdot (1 - e^{-\varepsilon \cdot c \cdot l}) = \eta \cdot I_0 \cdot (1 - e^{-A}) \quad (\text{Gleichung 3})$$

Dies ergibt nach Taylor-Entwicklung

$$F = \eta \cdot I_0 \cdot \left(A + \frac{A^2}{2!} + \frac{A^3}{3!} + \dots \right) \quad (\text{Gleichung 4})$$

Für kleine Werte von A (kleine Farbstoffkonzentrationen oder Extinktionskoeffizienten) sind näherungsweise die Glieder höherer Ordnung gegenüber A zu vernachlässigen:

$$F = \eta \cdot I_0 \cdot A \quad (\text{Gleichung 5})$$

Bei der Analyse von Fluoreszenzfarbstoffen ist daher zunächst die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration des Farbstoffes zu messen, um herauszufinden, in welchem Bereich diese Näherung benutzt werden kann. Alternativ kann man durch photometrische Messung ermitteln, ob der Extinktionskoeffizient in einem für unsere Annahmen geeigneten Bereich liegt. Die Literatur (Kubista et al., 1994) empfiehlt eine Absorption von $A < 0,05$. Wird dieser Wert überschritten, durchflutet das Anregungslicht die Küvette nicht mehr gleichmäßig. Stattdessen absorbiert der vordere Teil mehr Anregungslicht; dem hinteren Teil verbleibt eine geringere Anregungsintensität. Diesen Effekt nennt man *Eigenabsorption* (engl.

inner filter effect). Er macht eine Korrekturrechnung anhand von Gleichung 4 notwendig, welche auch höhere Ordnungen der Taylor-Reihe berücksichtigt.

3.1.2 Korrektur der Eigenabsorption

Will man einen Fluoreszenzfarbstoff für die Messung von Metallionen benutzen, so kann der Effekt der Eigenabsorption zu Messfehlern führen. Nach Kubista et al. (1994) lässt sich dann ein Korrekturfaktor k_{EA} berechnen, der durch Multiplikation mit der gemessenen Fluoreszenz den Effekt bei Absorptionen $> 0,05$ ausgleicht.

$$k_{EA} = \frac{A_i + A - B_i - B}{e^{-B_i - B} - e^{-A_i - A}} \quad (\text{Gleichung 6})$$

A und B sind die Absorptionen der mit Metallionen versetzten Farbstofflösung, gemessen bei der Anregungs- bzw. Emissionswellenlänge des Farbstoffs. Mit dem Index i werden die entsprechenden Werte der reinen Farbstofflösung – ohne Zusatz von Metallionen – gekennzeichnet.

Bleibt das Hinzufügen des Metalls ohne Einfluss auf die Absorption des Farbstoffes, so ist k_{EA} nach Gleichung 6 offensichtlich eine Konstante. Soweit nur relative Fluoreszenzänderungen von Interesse sind, kann daher in diesem Falle auf k_{EA} verzichtet werden.

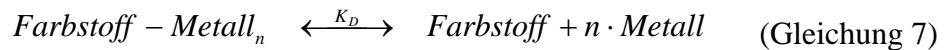
3.1.3 Self-quenching

Hohe Konzentrationen bedingen eine hohe Anzahl von Zusammenstößen zwischen den Molekülen. Bei jeder Kollision entsteht ein strahlungsloser Übergang (IK_s in Abbildung 3.1), durch welche das betroffene Teilchen Energie in Form von Wärme an die Umgebung verliert. Folglich sinkt die Fluoreszenzintensität eines Farbstoffes ab einem gewissen Grad in Abhängigkeit von dessen Konzentration.

3.2

Berechnung der Dissoziationskonstanten

Die Anlagerung von n Metallionen an einen Farbstoff zur Bildung eines Komplexes Farbstoff – Metall_n wird in folgender Reaktionsgleichung ausgedrückt:



Die Gleichgewichtskonstante dieses Prozesses nennt man *Dissoziationskonstante*. Sie ist mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes zu berechnen:

$$K_D = \frac{[\text{Farbstoff}] \cdot [\text{Metall}]^n}{[\text{Farbstoff} - \text{Metall}_n]} \quad (\text{Gleichung 8})$$

[Farbstoff], [Metall], [Farbstoff–Metall_n] beschreiben jeweils die Konzentration des Farbstoffs, des Metallions bzw. des Farbstoff-Metall-Komplexes. Ist die Gesamtkonzentration des Farbstoffs [Farbstoff]_t = [Farbstoff] + [Farbstoff–Metall_n] bekannt, erhält man

$$\begin{aligned} K_D &= \frac{([\text{Farbstoff}]_t - [\text{Farbstoff} - \text{Metall}_n]) \cdot [\text{Metall}]^n}{[\text{Farbstoff} - \text{Metall}_n]} \\ &= \frac{[\text{Farbstoff}]_t \cdot [\text{Metall}]^n}{[\text{Farbstoff} - \text{Metall}_n]} - [\text{Metall}]^n \end{aligned} \quad (\text{Gleichung 9})$$

so dass sich der Anteil f_n an komplexiertem Farbstoff zur Gesamtmenge Farbstoff folgendermaßen darstellen lässt:

$$f_n \equiv \frac{[\text{Farbstoff} - \text{Metall}_n]}{[\text{Farbstoff}]_t} = \frac{[\text{Metall}]^n}{K_D + [\text{Metall}]^n} \quad (\text{Gleichung 10})$$

Für n = 1, d.h. Bindung nur eines Metallions pro Komplex, erhält man also

$$f \equiv f_{n=1} = \frac{[\text{Metall}]}{K_D + [\text{Metall}]} \quad (\text{Gleichung 11})$$

Im allgemeinen wird die Fluoreszenz durch Komplexbildung abgeschwächt. Folge ist eine maximale Fluoreszenz F_{max} bei [Metall] = 0, und eine minimale Fluoreszenz F_{min} bei vollständiger Komplexbildung ([Farbstoff–Metall] = [Farbstoff]_t). So lässt sich die Fluoreszenz F bei beliebiger Metallionen-Konzentration aus folgender Gleichung ablesen:

$$F = F_{\max} - (F_{\max} - F_{\min}) \cdot f \quad (\text{Gleichung 12})$$

Bei Zunahme der Fluoreszenz durch Zugabe von Metallionen, gilt analog

$$F = F_{\min} + (F_{\max} - F_{\min}) \cdot f \quad (\text{Gleichung 13})$$

3.3 Messung der Konzentrationen von Kupfer und Zink mit dem Farbstoff TSPP

Im Vorfeld dieser Arbeit ist es gelungen, einen für unsere Zwecke geeigneten Farbstoff – TSPP – zu finden. Die Fluoreszenz des TSPP sinkt durch Komplexbildung mit Cu^{2+} von F_{\max} auf F und erreicht bei entsprechend hohen Kupferionen-Konzentrationen sogar $F_{\min} = 0$ (s. Tabelle 5.3). Die Anwendung des Ergebnisses aus 3.2 ergibt somit für die Kupferionen-Konzentration $[\text{Cu}^{2+}]$:

$$\begin{aligned} F &= F_{\max} - (F_{\max} - \underbrace{F_{\min}}_{=0}) \cdot \frac{[\text{Cu}^{2+}]}{[\text{Cu}^{2+}] + K_D} \\ &= F_{\max} - F_{\max} \cdot \frac{[\text{Cu}^{2+}]}{[\text{Cu}^{2+}] + K_D} \\ \Leftrightarrow r_{\text{Cu}} &\equiv \frac{F}{F_{\max}} = 1 - \frac{[\text{Cu}^{2+}]}{[\text{Cu}^{2+}] + K_D} \\ \Leftrightarrow [\text{Cu}^{2+}] &= K_D \cdot \frac{(1 - r_{\text{Cu}})}{r_{\text{Cu}}} \end{aligned} \quad (\text{Gleichung 14})$$

r_{Cu} ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten nach und vor Zugabe der Kupferionen.

Durch Hinzufügen von Zn^{2+} steigt die Fluoreszenz des TSPP von F_{\min} auf F an (Tabelle 5.3).

Für die Zinkionen-Konzentration $[\text{Zn}^{2+}]$ gilt daher analog:

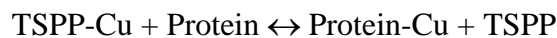
$$\begin{aligned} F &= F_{\min} + (F_{\max} - F_{\min}) \cdot \frac{[\text{Zn}^{2+}]}{[\text{Zn}^{2+}] + K_D} \\ \Leftrightarrow ([\text{Zn}^{2+}] + K_D) \cdot F &= [\text{Zn}^{2+}] \cdot F_{\min} + K_D \cdot F_{\min} + (F_{\max} - F_{\min}) \cdot [\text{Zn}^{2+}], \\ \Leftrightarrow [\text{Zn}^{2+}] \cdot F + K_D \cdot F &= [\text{Zn}^{2+}] \cdot F_{\max} + K_D \cdot F_{\min} \\ \Leftrightarrow [\text{Zn}^{2+}] \cdot (F - F_{\max}) &= K_D \cdot (F_{\min} - F) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \leftrightarrow [Zn^{2+}] &= \frac{K_D \cdot (F_{\min} - F)}{F - F_{\max}} \\ \leftrightarrow [Zn^{2+}] &= \frac{K_D \cdot (1 - r_{Zn})}{r_{Zn} - \frac{F_{\max}}{F_{\min}}} \quad \text{mit} \quad r_{Zn} = \frac{F}{F_{\min}} \end{aligned} \quad (\text{Gleichung 15})$$

r_{Zn} repräsentiert wie vorher r_{Cu} das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten nach und vor Zugabe der Zinkionen.

3.4 Bindung von Kupfer an Proteine

Normalerweise liegt das Kupfer nicht frei vor, wie in der Berechnung von Abschnitt 3.2 und 3.3 angenommen. Stattdessen sind die Metallionen zum großen Teil an Transportproteine wie Coeruloplasmin gebunden (Brown et al., 1997a). Das Gleichgewicht bei Messung mit TSPP sieht also folgendermaßen aus:



Die Bindungskonstante $K_{\text{Konkurrenz}}$ dieser Reaktion ergibt sich aus:

$$K_{\text{Konkurrenz}} = \frac{[Protein - Cu] \cdot [TSPP]}{[TSPP - Cu] \cdot [Protein]} \quad (\text{Gleichung 16})$$

Mit den Dissoziationskonstanten K_{Protein} und K_{TSPP} der Dissoziation beider Komplexe,

$$\begin{aligned} Protein - Cu \leftrightarrow Protein + Cu &\rightarrow K_{\text{Protein}} = \frac{[Protein] \cdot [Cu]}{[Protein - Cu]} \\ TSPP - Cu \leftrightarrow TSPP + Cu &\rightarrow K_{\text{TSPP}} = \frac{[TSPP] \cdot [Cu]}{[TSPP - Cu]} \end{aligned} \quad (\text{Gleichung 17})$$

folgt für $K_{\text{Konkurrenz}} = K_{\text{TSPP}} / K_{\text{Protein}}$.

Mit $f_{Cu} = [TSPP-Cu]/[TSPP]_t$ analog zur Definition von f aus Abschnitt 3.2 erhält man:

$$\begin{aligned}
\frac{K_{TSPP}}{K_{Protein}} &= \frac{[Protein - Cu] \cdot ([TSPP]_t - [TSPP - Cu])}{[Protein] \cdot [TSPP - Cu]} \\
&= \frac{[Protein - Cu]}{[Protein] \cdot f} \cdot \frac{[Protein - Cu]}{[Protein]} \\
&= \frac{[Protein - Cu]}{[Protein]} \cdot \left(\frac{1}{f} - 1 \right) \\
&= \left(\frac{[Protein]_t - [Protein - Cu]}{[Protein - Cu]} \right)^{-1} \cdot \left(\frac{1}{f_{Cu}} - 1 \right) \\
&= \left(\frac{1}{f_{Cu}} - 1 \right) / \left(\frac{1}{f_{Protein}} - 1 \right)
\end{aligned}
\tag{Gleichung 18}$$

[TSPP]_t und [Protein]_t bezeichnen dabei die Gesamtkonzentration des TSPP bzw. des Proteins; $f_{Protein} = [Protein-Cu]/[Protein]_t$. Die Verteilung der Kupferionen ist also vom Verhältnis der Dissoziationskonstanten K_{TSPP} und $K_{Protein}$ abhängig.

3.5 Ratiometrische Messung der Konzentration von Kalzium mit Fura-2

Fura-2 bindet Ca^{2+} im Verhältnis 1:1 und ändert dadurch seine Fluoreszenzeigenschaften. Je nach Anregungswellenlänge (340 bzw. 380 nm) zeigt sich eine unterschiedliche Änderung der Emissionsintensität bei 510 nm als Reaktion auf das Hinzufügen von Kalziumionen. Durch abwechselnde Anregung bei 340 bzw. 380 nm und Bildung des Verhältnisses R der hieraus resultierenden Fluoreszenzintensitäten bei 510 nm lässt sich die Kalziumkonzentration so unabhängig von Farbstoffkonzentration, Zelldicke, Intensität des Anregungslichts und Kamerasensitivität messen. Die Berechnung folgt der Formel (Grynkiewicz, 1985):

$$[Ca^{2+}] = K_{eff} \cdot \frac{R - R_{min}}{R_{max} - R}
\tag{Gleichung 19}$$

Dabei bedeuten

- $R = \frac{\text{Fluoreszenz durch Anregung bei } 340 \text{ nm}}{\text{Fluoreszenz durch Anregung bei } 380 \text{ nm}}$,
- $R_{\max} = R$ bei maximaler Kalziumkonzentration (alle Bindungsstellen des Farbstoffs mit Kalziumionen besetzt),
- $R_{\min} = R$ bei minimaler Kalziumkonzentration (Ca^{2+} fehlt vollständig),
- $K_{\text{eff}} = S \cdot K_D$

S repräsentiert das Verhältnis zwischen der Fluoreszenz durch Fura-2-Anregung bei 380 nm ohne Anwesenheit von Kalzium und derjenigen bei maximaler Kalziumkonzentration.

K_D ist die Dissoziationskonstante von Fura-2.

Die Werte für K_{eff} , R_{\min} , R_{\max} werden üblicherweise in einer Kalibrationsmessung bestimmt.

3.6 Abschätzung des Kupfergehalts der synaptischen Vesikel

Mit dem später benutzten Farbstoff FM 1-43 kann man Exozytose-Vorgänge beobachten (Smith und Betz, 1999). Er zeigt eine Fluoreszenz F, welche proportional zur Membranfläche einer Zelle steigt.

Durch das Verschmelzen einer Anzahl von n_{Vesikel} synaptischen Vesikeln pro Synaptosom bei Depolarisation steigt die Membranfläche bzw. die Oberfläche des Synaptosoms $O_{\text{Synaptosom}}$ auf $O_{\text{Synaptosom}} + n_{\text{Vesikel}} \cdot O_{\text{Vesikel}}$ (O_{Vesikel} : Oberfläche eines einzelnen synaptischen Vesikels). Dadurch erhält man eine lineare Änderung der ursprünglichen Fluoreszenzintensität F_{vor} auf

$F_{\text{nach}} = \frac{F_{\text{nach}}}{F_{\text{vor}}} \cdot F_{\text{vor}}$ bzw. eine Änderung um einen Anteil von

$$f_{FM} - 1 \equiv \frac{F_{\text{nach}}}{F_{\text{vor}}} - 1 = \frac{F_{\text{nach}} - F_{\text{vor}}}{F_{\text{vor}}} = \frac{n_{\text{Vesikel}} \cdot O_{\text{Vesikel}}}{O_{\text{Synaptosom}}} = \frac{n_{\text{Vesikel}} \cdot d_{\text{Vesikel}}^2}{d_{\text{Synaptosom}}^2}, \quad (\text{Gleichung 20})$$

wobei hier für O_{Vesikel} und $O_{\text{Synaptosom}}$ die Oberfläche einer Kugel angenommen und diese mit den entsprechenden Durchmessern d_{Vesikel} bzw. $d_{\text{Synaptosom}}$ berechnet werden.

Verbindet man diesen Zusammenhang mit der aus Abschnitt 3.3 erhaltenen Kupferkonzentration $[Cu^{2+}]$, welche in einer Küvette des Volumens V (in unseren Experimenten $V = 2$ ml) nach Vesikelausschüttung gemessen wird, so ergibt sich daraus der Kupfergehalt der synaptischen Vesikel $[Cu^{2+}]_{Vesikel}$:

$$\begin{aligned}
 [Cu^{2+}]_{Vesikel} &= \frac{\text{ausgeschüttete Menge an Kupfer}}{\text{Volumen aller synaptischen Vesikel in der Präparation}} \\
 &= \frac{[Cu^{2+}] \cdot V}{n_{Synaptosom} \cdot n_{Vesikel} \cdot \underbrace{\frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{d_{Vesikel}}{2}\right)^3}_{\text{Volumen eines Vesikels}}} \\
 &= \frac{[Cu^{2+}] \cdot V}{n_{Synaptosom} \cdot \underbrace{(f_{FM} - 1) \cdot \left(\frac{d_{Synaptosom}}{d_{Vesikel}}\right)^2}_{=n_{Vesikel} \text{ nach Gleichung 20}} \cdot \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{d_{Vesikel}}{2}\right)^3} \\
 &= \frac{[Cu^{2+}] \cdot V}{n_{Synaptosom} \cdot (f_{FM} - 1) \cdot d_{Synaptosom}^2 \cdot d_{Vesikel} \cdot \frac{1}{6} \cdot \pi} \\
 &= \frac{1}{n_{Synaptosom}} \cdot \frac{[Cu^{2+}]}{(f_{FM} - 1)} \cdot \frac{V}{d_{Synaptosom}^2 \cdot d_{Vesikel} \cdot \frac{1}{6} \cdot \pi} \quad (\text{Gleichung 21})
 \end{aligned}$$

Die Durchmesser sind weitgehend konstant und betragen nach Dunkley et al. (1988, 1986) durchschnittlich $d_{Synaptosom} = 0,6 \mu\text{m}$ und $d_{Vesikel} = 0,06 \mu\text{m}$. Gleichzeitig kann die Anzahl der synaptischen Vesikel pro Synaptosom innerhalb einer Präparation als konstant und die Anzahl der Synaptosomen $n_{Synaptosom}$ als ungefähr proportional zum experimentell gemessenen Proteingehalt vorausgesetzt werden.

Nimmt man die Proportionalitätskonstante $\rho_{Synaptosom}$ (Proteingewicht pro Synaptosom) und den gemessenen Proteingehalt $\xi_{Protein}$ (Proteingewicht pro Volumen eingesetzter Synaptosomenlösung) hinzu, so folgt über die Beziehung

$$n_{Synaptosom} = \frac{\xi_{Protein} \cdot V}{\rho_{Synaptosom}} \quad (\text{Gleichung 22})$$

die Kupferkonzentration im synaptischen Vesikel:

$$\begin{aligned}
[Cu^{2+}]_{Vesikel} &= \frac{\rho_{Synaptosom}}{\xi_{Protein} \cdot V} \cdot \frac{[Cu^{2+}]}{(f_{FM} - 1)} \cdot \frac{V}{d_{Synaptosom}^2 \cdot d_{Vesikel} \cdot \frac{1}{6} \cdot \pi} \\
&= \frac{\rho_{synaptosome}}{\xi_{Protein}} \cdot \frac{[Cu^{2+}]}{(f_{FM} - 1)} \cdot \frac{1}{d_{Synaptosom}^2 \cdot d_{Vesikel} \cdot \frac{1}{6} \cdot \pi} \quad (\text{Gleichung 23})
\end{aligned}$$

Bei gleicher Proteinkonzentration also ist innerhalb einer Präparation die Kupferkonzentration in einem Vesikel direkt proportional zu der in der Küvette gemessenen Kupferkonzentration geteilt durch den Faktor $f_{FM} - 1$, der die Membranvergrößerung nach Depolarisation angibt. Dies ist nicht verwunderlich, da $f_{FM} - 1$ nach Gleichung 20 direkt proportional zur Anzahl ausgeschütteter Vesikel pro Synaptosom ist.

4.

Methoden

4.1 Messung der Extinktion von TSPP und Phen Green

Um sicher zu gehen, dass der in der Theorie geschilderte Effekt der Eigenabsorption keinen Einfluss auf unsere Messungen hat bzw. um diesen Effekt per Ausgleichsrechnung zu eliminieren, werden zunächst Absorptionsmessungen an einem gängigen Photometer (Perkin Elmer, Norwalk, USA) mit den Porphyrinen (TSPP, TCPP) und Phen Green durchgeführt. Von den anderen Farbstoffen (Fluo-3, CaGreen, CaCrimson, Fura Red) stehen bereits ausreichende Daten in der Literatur (Minta et al., 1989; Lattanzio et al., 1991) zur Verfügung.

Laut obiger theoretischer Berechnung braucht man zum Ausgleich der Eigenabsorption die Absorptionswerte bei den Anregungs- und Emissionswellenlängen des Farbstoffs und deren Änderung unter Zugabe von Kupfer.

So werden von Lösungen 9 verschiedener Farbstoffkonzentrationen zwischen 0 und 30 μM die Absorptionsspektren im Bereich von 200 nm bis 900 nm (langsam und im Intervall von 0,5 nm) bestimmt. Als Referenzsubstanz und auch als Träger der Farbstofflösungen dient de-ionisiertes Wasser, welches mittels Nanopure-Filtern (Barnstead | Thermolyne, Dubuque, USA) auf einen Widerstand von über 18 $\text{M}\Omega/\text{cm}$ gebracht worden ist (pH 7,0).

Aus den Daten der Spektren lässt sich mittels linearer Regression der Extinktionskoeffizient ε bei verschiedenen Wellenlängen bestimmen, da laut Abschnitt 3.1 für die Absorption A mit einer Küvettenlänge von $l = 1 \text{ cm}$ gilt

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l = \varepsilon \cdot c ,$$

wenn die Farbstoffkonzentration c in $\text{M} = \text{mol/l}$ und ε in $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ gemessen werden.

Nach jeder Messung wird der Einfluss von Kupfer auf das Absorptionsspektrum durch Hinzutitrieren von entsprechenden Stammlösungen auf Konzentrationen zwischen 0 und 100 μM CuCl_2 bestimmt.

Zuletzt werden die Experimente für TSPP mit der später für die biologischen Untersuchungen verwendeten Pufferlösung (Zusammensetzung s. Abschnitt 4.3) wiederholt.

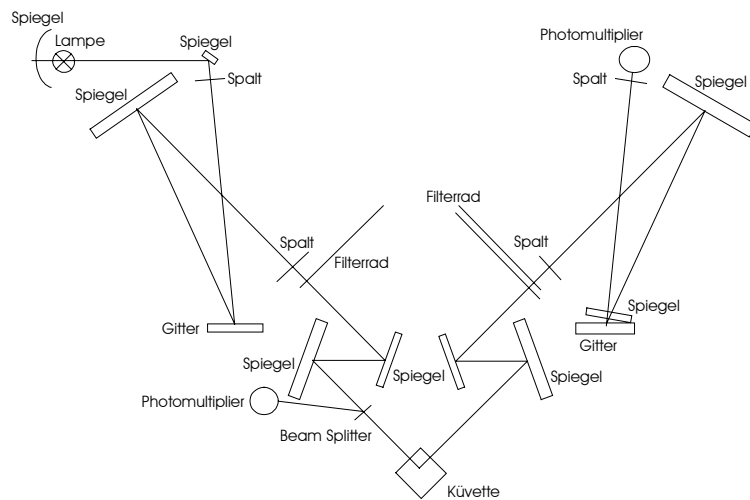


ABBILDUNG 4.1
STRAHLENGANG DES LS 50 SPEKTROMETERS.

4.2 Messung der Fluoreszenzspektren im Photometer

Allgemeine Verfahrensweise bei den Fluoreszenzmessungen

Für die Farbstoffmessungen eignet sich ein LS50 Spektrometer von Perkin Elmer (Norwalk, USA), das man vor jeder Messung $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ h warmlaufen lässt. Zur Gewährleistung der Temperaturkonstanz an der Messstelle wird ein thermostatregulierter Wasserkreislauf angeschlossen. Bei der Überprüfung der Temperatur nach jedem Durchgang wird ein digitales Thermoelement benutzt (Messgenauigkeit $\pm 0,5^\circ\text{C}$).

Alle Experimente werden unter Verwendung eines Magnetrührers durchgeführt, um die schnelle Durchmischung der zugegebenen Lösungen zu garantieren. Als Wasser wird Millipore-Wasser (Millipore, Eschborn, Deutschland) mit einem Widerstand von mindestens 18 $\text{M}\Omega$ benutzt.

Die Reinigung der Küvette ist ganz besonders sorgfältig durchzuführen. Man spült sie im Anschluss an jede einzelne Messung nacheinander mit Hellmanex II (Hellma, Essex; Detergens), 10 mM EDTA (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland; Komplexbildner), 3 mal mit dem

Schwermetallfänger Chelex 100 (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) und ein weiteres Mal mit Ethanol. Anschließend wird die Küvette mit N₂ getrocknet.

Zur Verdünnung der Farbstoffe und der Metall-Lösungen verwendet man auch hier das deionisierte Millipore-Wasser.

Die schwer wasserlöslichen Fluorophore, CaGreen, TSPP und TCPP, werden vor ihrer Verdünnung in DMSO (*Dimethylsulfoxid*) gelöst.

4.2.1 Messung der Spektren und der Dissoziationskonstanten

Zunächst wird von allen Farbstoffen das Absorptions- und Emissionsspektrum bestimmt. Dann zeichnet man deren Fluoreszenzintensität am jeweiligen Emissionsmaximum bei Anregung am zugehörigen Absorptionsmaximum in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration auf.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten wird jedes Metall gegen jeden Farbstoff (bei 37°C und pH 7,0) titriert. Dazu wird die Küvette mit 4 ml Farbstofflösung gefüllt und strikt darauf geachtet, dass die Zugabe an Schwermetall-Lösung insgesamt 200 µl nicht übersteigt. Die damit verbundene, lediglich geringfügige Veränderung der Verdünnungsverhältnisse wird hernach im Messergebnis korrigiert. Die Farbstoff-Konzentration wird durchgängig um eine Größenordnung (d.h. einen Faktor 10) höher angesetzt als die angenommene bzw. in Vorexperimenten grob gemessene Dissoziationskonstante K_D . Die Zugaben der Metallionen erfolgen erst, wenn keine zeitliche Änderung der Fluoreszenz mehr registriert wird, d.h. sich ein Gleichgewicht eingestellt hat.

Es werden eine Reihe von Metallen, Cu²⁺, Zn²⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Cd²⁺, Fe³⁺, geprüft, darunter die im Hirn am häufigsten vorkommenden Metalle (Rajan et al., 1976). Grob wird auch der Einfluss der Erdalkalimetalle Na⁺ und K⁺ untersucht.

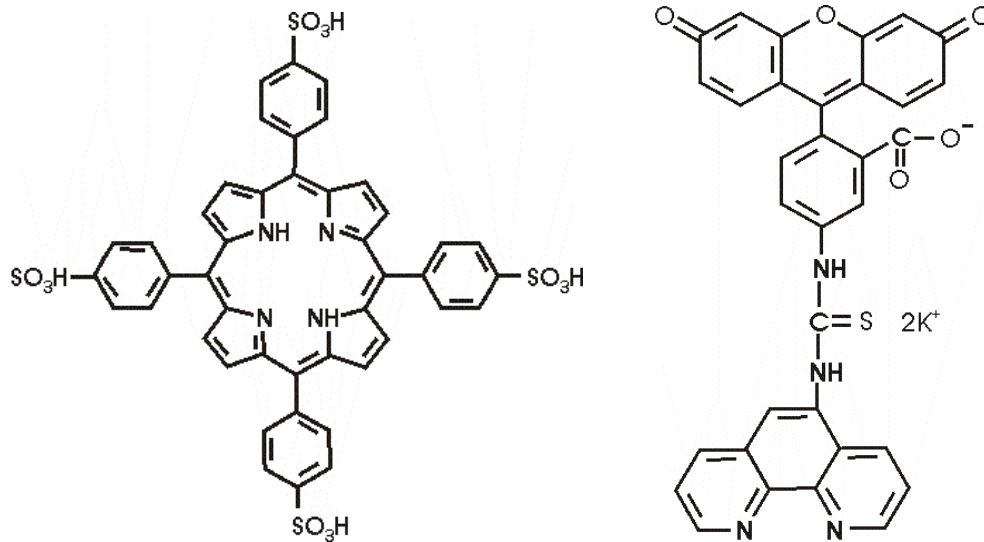


ABBILDUNG 4.2

STRUKTURFORMEL VON TSP (LINKS) UND PHEN GREEN (RECHTS). TCPP ENTSTEHT DURCH SUBSTITUTION DER SULFONAT-GRUPPEN MIT CARBOXYL-GRUPPEN.

In einer zweiten Versuchsreihe werden statt des reinen Wassers als Lösungsmittel die für die unten beschriebenen Experimente mit Synaptosomen gebräuchlichen Pufferlösungen (s.u.) verwendet. Als Referenz muss man demnach je nach Versuchsreihe das Nanopure-Wasser bzw. den Puffer benutzen.

Passt man die so gemessenen Intensitäts-Konzentrations-Verläufe an Gleichung 12 bzw. 13 aus Abschnitt 3.2 an (bei Anstieg bzw. Abfall der Fluoreszenz mit höherer Metallionen-Konzentration), erhält man die Dissoziationskonstante K_D . Diese Vorgehensweise ist äquivalent zur Bestimmung der Dissoziationskonstante mittels eines Stern-Vollmer-Plots (s. Abbildung 6.1).

4.2.2 Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die K_D von TSP mit Kupfer

Ferner werden auf dieselbe Art wie in Abschnitt 4.2.1 die Einflüsse von Temperatur und pH auf die Dissoziationskonstante von Cu^{2+} mit TSP gemessen. Für Temperatur- und pH-Verhalten der Kalziumfarbstoffe sei auf die einschlägige Literatur (Minta et al., 1989; Lattanzio et al., 1991) verwiesen, aus welcher auch die Werte für Abbildung 4.3 entnommen worden sind.

Die Temperatur stellt man dabei mit Hilfe des Thermostats auf vier verschiedene Werte zwischen 20 und 40°C ein und kontrolliert dies mit dem Thermoelement.

Den pH-Wert reguliert man mit Hilfe von 10 mM HEPES-Puffer (pH 6,5 – 7,4) bzw. 10 mM MES-Puffer (pH 5,0 – 6,5), von deren Neutralität gegenüber der Farbstoffreaktion mit Kupfer man sich vorher überzeugt hat.

Es werden 6 verschiedene Werte der Bindungskonstanten K_D zwischen pH 5 und 8 untersucht.

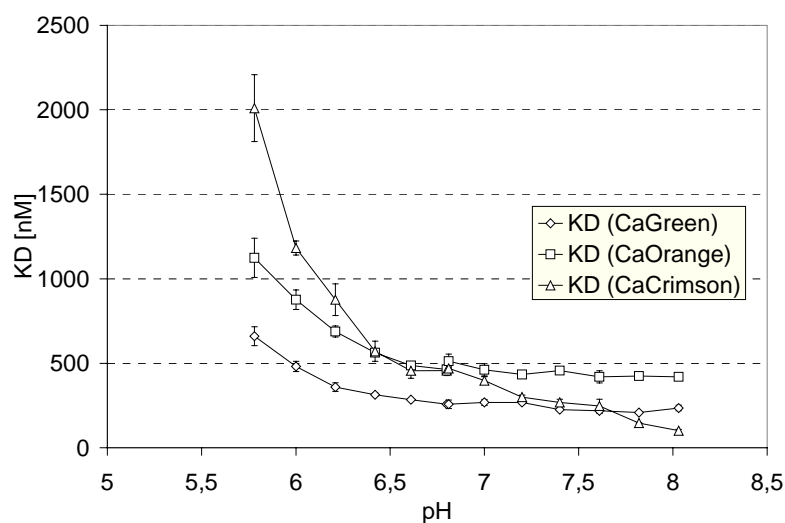


ABBILDUNG 4.3

MINTA ET AL. (1989) ZEIGEN DIE ABHÄNGIGKEIT DER DISSOZIATIONSKONSTANTEN K_D GÄNGIGER KALZIUMFARBSTOFFE VOM pH-WERT.

4.2.3 Zeitverhalten der Kupferbindung an TSPP

Weitere Messungen bestimmen die Geschwindigkeit, mit der der Farbstoff TSPP das Kupfer bindet. Verschiedene Kupferkonzentrationen (0,5, 0,6, 10 μ M) werden zu einer Lösung von 10 μ M TSPP unter physiologischem pH-Wert und Temperatur (7,4 und 37°C) hinzugegeben und dabei alle 6 Sekunden die Fluoreszenzintensität bei 645 nm bestimmt, bis keine Änderung mehr zu verzeichnen ist.

4.3 Präparation von Synaptosomen

Die Präparation der Synaptosomen erfolgt nach McMahon und Nicholls (1991). Ziel dabei ist die Extraktion einer möglichst reinen Fraktion von Synaptosomen aus Mäuse-Gehirnen. Zusätzlich müssen die Synaptosomen als Vitalitätszeichen noch aktiv Glutamat freisetzen können.

Als Puffer verwendet man eine Lösung von 10 mM Glucose, 5 mM KCl, 140 mM NaCl, 5 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 1,2 mM Na₂HPO₄ und 20 mM HEPES, deren pH mit NaOH und HCl auf 7,4 eingestellt wird.

Besondere Aufmerksamkeit sollte darauf gelegt werden, die Zeitdauer der Präparation auf maximal 1 ½ bis 2 h zu beschränken. Man homogenisiert 8 Mäuse-Gehirne in 30 ml eiskalter 320 mM Saccharose-Lösung (600 rpm, 10 Auf- und Abbewegungen). Danach entfernt man grobe Verunreinigungen durch Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm (SS34) für 2 min und anschließendes Dekantieren. Der flüssige Überstand wird nochmals bei 11000 rpm (SS34) für 12 min. (4°C) zentrifugiert. Diesmal werden die Partikel entfernt, welche wesentlich leichter sind als die Synaptosomen. Man verwendet also die entstandenen Pellets weiter und löst sie in 2,7 ml 320 mM eiskalter Saccharose-Lösung & 5 mM HEPES auf. Während der Zentrifugation wird ein Ficoll-Gradient aufgeschichtet (6, 9 und 12 %), auf den man maximal 2 ml der entstandenen Lösung auflagern sollte. Den Gradienten zentrifugiert man mit 22500 rpm (SW41) 35 min lang bei 4°C. An den beiden Grenzen zwischen der 6 / 9 % sowie der 9 / 12 % Lösung sind nun sehr reine Synaptosomen-Fractionen zu finden, die mit einer Pipette vorsichtig abgesogen werden. Nach einer Bestimmung des Proteingehalts (mit Hilfe des Bradford-Tests) kann man jeweils 1,25 mg Protein in ein Eppendorf-Cup geben und auf 2 ml mit eiskalter Pufferlösung auffüllen. Die Eppendorf-Cups werden 5 min bei 4°C zentrifugiert (14000 rpm), um Pellets zu erzeugen. Nach dem Abgießen überschüssiger Flüssigkeit stellt man das

Pellet bis zur Messung kalt. Die Zeit bis zur Messung sollte auch gering gehalten werden, ist aber nicht so kritisch wie die Dauer der Präparation selbst.

4.4 Vitalitätsnachweis durch Messung der Glutamatausschüttung

Von der Aktivität der Synaptosomen kann sich durch den Nachweis der Glutamat-Freisetzung überzeugen (Link et al., 1992). Dabei löst man 1 Pellet (entspricht 1,25 mg Protein) der präparierten Synaptosomen in 1 ml Puffer auf und stellt die Lösung nach 10 minütiger Inkubation bei 37°C im Wasserbad in ein Photometer. Gemessen wird die Absorption bei 360 und 390 nm. Nach Zugabe von 1,3 mM CaCl₂ und 1 mM NADP, sowie 60 U Glutamatdehydrogenase (Sigma Aldrich Chemie, München) depolarisiert man die Synaptosomen mit KCl (50 µM).

Vitale Synaptosomen setzen bei der Depolarisation Vesikel mit Glutamat frei, welches dann durch die Glutamatdehydrogenase mit Hilfe von NADP abgebaut wird. Durch den Abbau vermindert sich die Konzentration von NADP. Stattdessen entsteht NADPH, welches im Vergleich zu NADP ein weiteres Absorptionsmaximum bei 340 nm besitzt. Durch Messung der Absorptionsveränderung kann man so die Ausschüttung des Glutamats und damit die Vitalität der Synaptosomen qualitativ nachweisen.

Die Gegenprobe wird ausgeführt, indem man statt dem CaCl₂ 0,5 mM EGTA zugibt, um eine Depolarisation unmöglich zu machen. Hier wie auch bei den folgenden Messungen von Vesikel-Freisetzung mittels Depolarisation werden als Alternative zur Gegenprobe 250 nM Botulinustoxin (freundlicherweise von R. Jahn zur Verfügung gestellt) verwendet, welches die Ausschüttung der Vesikel blockiert (Bruns et al., 1997). Dies führt zu ähnlichen Resultaten.

In den Messreihen kann man am Schluss der Messung mit 40 µl 20% Triton (Detergens) prüfen, ob durch Zerplatzen der Synaptosomen eine weit größere Menge an Glutamat freigesetzt

wird. Ein Beispiel für den Zeitverlauf der Absorption eines solchen Experiments wird in Abbildung 4.4 gezeigt.

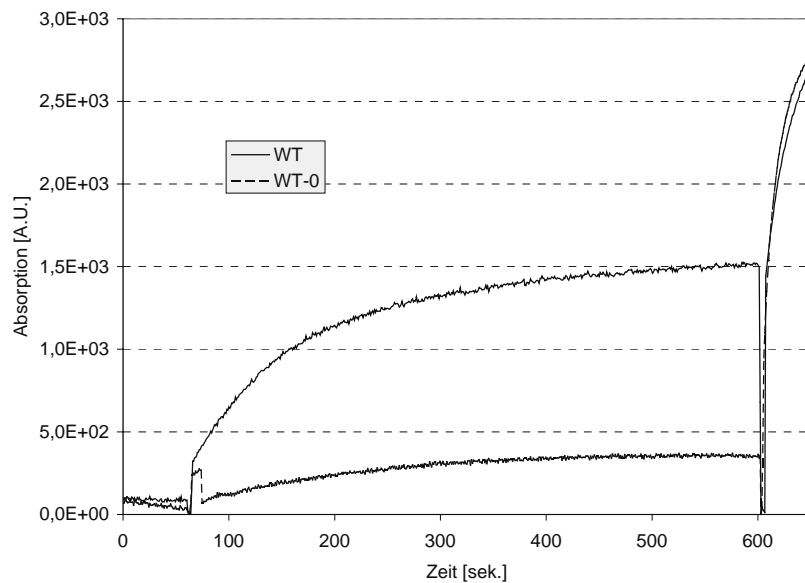


ABBILDUNG 4.4

AUSSCHÜTTUNG VON GLUTAMAT BEI WT-MÄUSEN. DIE MIT WT BEZEICHNETE KURVE ZEIGT DIE AUSSCHÜTTUNG NACH ZUGABE VON CaCl_2 (1.3 mM) ZUR ANSONSTEN Ca^{2+} -FREIEN PUFFERLÖSUNG UND DEPOLARISATION MIT 50 mM KCL. DIE GEGENPROBE, WT-0, WIRD MIT EGTA, WIE IM METHODENTEIL BESCHRIEBEN, DURCHFÜHRT. IN BEIDEN FÄLLEN WIRD NACH 600 S TRITON HINZUGEFÜGT.

Aus der Messung der Glutamat-Ausschüttung lassen sich allerdings keine quantitativen Aussagen über die Menge an freigesetzten Vesikeln ableiten. Dafür bedarf es der unten beschriebenen Messungen mit FM 1-43. Auch die Anzahl der Synaptosomen in der Küvette lässt sich hiermit nicht abschätzen.

4.5 Messung depolarisationsbedingter Kalziumveränderungen mit Fura-2-AM

Zunächst löst man 2 Pellets der hergestellten Synaptosomen (entspricht 2,5 mg Protein) in 1 ml Puffer auf und lädt sie dann für 20 min. mit Fura-2-AM ($K_D = 224$ nM, nach Grynkiewicz et al., 1985) in einer Konzentration von 2 μM (Haughland, 1996). Fura-2-AM ist ein Ester des Fura-2-Farbstoffes, welcher zellpermeabel ist und innerhalb der Synaptosomen

in die zellimpermeable Ursprungsform Fura-2 umgewandelt wird. Während der oben erwähnten 20 min. mischt man die Lösung mit einem Magnetprüher gut durch und stellt sie in ein Wasserbad der Temperatur 37°C. Gemäß Whatley et al. (1995) ist der Farbstoff nach dieser Zeit bereits in die Zelle diffundiert. Um dennoch sicher zu gehen, dass kein außerhalb der Zelle zurückgebliebenes Fura-2 oder Fura-2-AM die Messung stört, werden die Synaptosomen 5 Minuten lang bei 14000 rpm (3000 g) zentrifugiert und erneut im bereits vorgewärmten Puffer aufgelöst, bevor sie in das Fluoreszenzphotometer gestellt werden. Nach Erfassung der Basiswerte (Anregung bei 340 / 380 nm, Fluoreszenz bei 510 nm) werden die Synaptosomen wie gewohnt mit 1,3 mM CaCl₂ versetzt und mit 50 µM KCl depolarisiert. Zur Kalibration (s. Abschnitt 3.5) gibt man aber noch Triton X-100 (1 % in 3 M Tris-HCl, pH 8) oder 25 µM Ionomycin für die Bestimmung von R_{max}, danach 5 mM EGTA für die von R_{min} hinzu. Statt der Kaliumlösung kann auch 7,5 µM Ionomycin mit demselben Ergebnis benutzt werden. Nach Kao (1994) und del Rio et al. (1994) erhöht dieser Stoff die Permeabilität von Biomembranen spezifisch für Kalzium und sorgt so für einen Kalzium-Einstrom in die Zellen. Gegenproben können mit gleichem Ergebnis durch Unterlassen der Zugabe von Kalzium und anschließendes Hinzufügen von EGTA oder mit Botulinus-Toxin (Bruns et al., 1997) durchgeführt werden.

4.6 Nachweis der Ungiftigkeit von TSPP auf Synaptosomen

Die Messungen der Ausschüttung von Glutamat nach 4.4 und die Bestimmung der Kalziumveränderungen nach 4.5 dienen als Vitalitätskontrolle und zeigen eine regelgerechte Depolarisation bzw. Vesikelausschüttung an. Man wiederholt die bereits beschriebenen Experimente mit solchen Synaptosomen, die während der Inkubation einer Konzentration von 10 µM TSPP ausgesetzt worden sind.

Da die späteren Messungen in der Regel nicht länger als 20 min. dauern, wird die Zeitdauer der Inkubation bzw. des Kontaktes mit TSPP um diese Dauer erhöht, ansonsten hält man alle experimentellen Bedingungen aus 4.4 bzw. 4.5 bei.

4.7 Nachweis der Impermeabilität und Adhärenz von TSPP an Zellen

Unter einem konfokalen Mikroskop (LSM 410 der Firma Zeiss, Jena, GER) kann man feststellen, dass TSPP membranimpermeabel ist. Dazu präpariert man bovine Chromaffinzel- len nach Smith (1999) und löst den Farbstoff in einer Konzentration von 10 μ M im extrazellu- lären Medium. Man beobachtet die für diesen Zelltyp charakteristische Autofluoreszenz (Du- chen und Biscoe, 1992; Zhou und Neher, 1993a-b) der Flaviproteine bei 530 nm und das Flu- oreszenzlicht von TSPP bei Anregung mit einem HeNe-Laser der Wellenlänge 488 nm, die für den Farbstoff leider nur suboptimal ist.

Das Licht des Farbstoffs kann über einen 700 ± 40 nm Filter (Omega Optical, Battleboro, USA) mit einem rot-sensitiven R3896 Photomultiplier der Firma Hamamatsu (München, GER), die Autofluoreszenz über einen 510-525 nm Filter der Firma Zeiss (Jena, GER) beo- bachtet werden.

4.8 Quantitative Messung der Exozytose mit FM 1-43

FM 1-43, ein Styrol-Farbstoff, wird an einzelnen Nervenzellen benutzt, um unab- hängig von endozytotischen Prozessen kumulativ den Umfang einer Exozytose zu messen (Smith und Betz, 1996). Der Farbstoff bindet bei Zugabe von Zellen an deren Membranen und zeigt dabei eine von der Größe der Membranfläche abhängige Fluoreszenz. Bei Vergrö- ßerung durch Exozytose verschiebt sich sein Emissionsspektrum zum höherenergetischen Bereich hin. Bei Endozytose bleibt dieser Effekt erhalten, da der Farbstoff innerhalb der Zelle

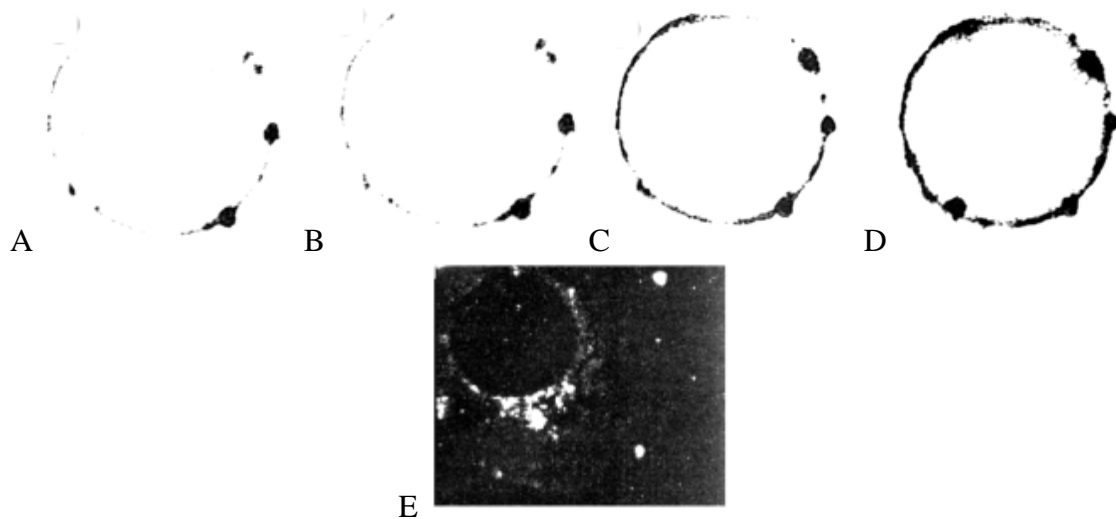


ABBILDUNG 4.5

FLUORESZENZ VON FM 1-43 (A) – (D) BEI ZUNEHMENDER MEMBRANFLÄCHE DURCH EXOZYTOSE (E) ENDOZYTIERTE MEMBRANTEILE STRAHLEN IMMER NOCH.

QUELLE: SMITH AND BETZ, 1996

weiter fluoresziert und die Membran nicht penetrieren kann. Kombiniert man die Messung mit den Kapazitätsmessungen einer Patch-Clamp-Elektrode, so kann man sogar eine Endozytose mitbestimmen (Smith and Betz, 1996).

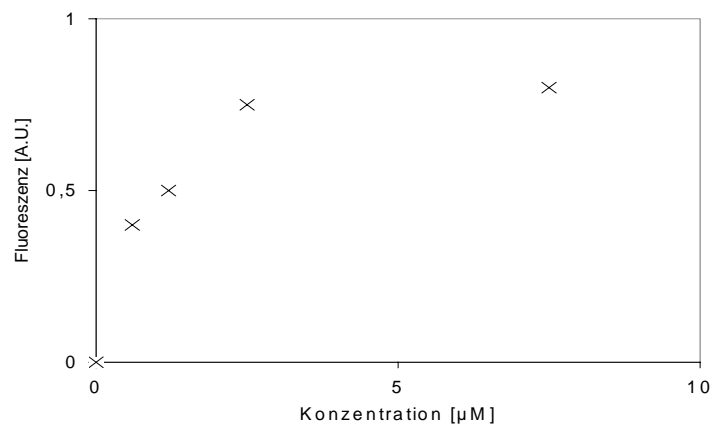


ABBILDUNG 4.6

ABHÄNGIGKEIT DER FM-1-43-FLUORESZENZ VON DER KONZENTRATION DES FARBSTOFFES (SMITH UND BETZ, 1996)

Man hat also ein kumulatives Maß für die Menge der Exozytose, welches im Gegensatz zur genannten Kapazitätsmessung unabhängig von der nachfolgenden Endozytose ist.

Abbildung 4.6 zeigt, dass gemäß Literatur die optimale Konzentration des Farbstoffs 3 – 4 μM ist.

Man gibt den Farbstoff in eine Synaptosomenlösung mit 2,5 mg Protein in 1 ml Pufferlösung, welche zuvor 10 min. bei 37°C vorinkubiert worden ist. Diese Lösung regt man nun mit Licht der Wellenlänge 510 nm an und misst die Fluoreszenz bei 626 nm. Die Depolarisation erfolgt wie oben mit 1,3 mM CaCl_2 und 50 mM KCl, die Gegenprobe mittels Substitution des Kalziums durch 0,5 mM EGTA. Da sich das Emissionsmaximum bei Erhöhung der Membranfläche verschiebt, steigt die gemessene Fluoreszenzintensität, und zwar annähernd proportional.

4.9 Fluorimetrischer Nachweis der Kupfer- und Zink-Ausschüttung

TSPF wird zu 1 ml einer wie unter 4.4 vorinkubierten Lösung mit 2,5 mg Protein hinzugegeben, so dass die Konzentration des Farbstoffes 10 μM beträgt. Die Anregung erfolgt hier bei einer Wellenlänge von 414 nm, die Fluoreszenz wird bei 605 nm und 645 nm aufgezeichnet, die sich nach den obigen Experimenten als die Bereiche des Spektrums herausgestellt haben, welche sich bei Zugabe von Zink und Kupfer verändern. Die Vorgehensweise zur Auslösung der Depolarisation erfolgt wie unter 4.8 beschrieben, alternativ zur Depolarisation mit KCl werden auch Messungen mit 2,5 M Sucrose (Abbott et al. 1997) und 1 mM 4-AP durchgeführt (Molina-Hernandez, 2001; Moe et al., 2002). Als Gegenprobe wird mit gleichem Erfolg die Zugabe von 250 nM Botulinustoxin wie das Abziehen aller Kalziumionen (durch Zugabe von EGTA wie oben beschrieben) benutzt.

4.10 Massenspektrometrische Messung der Schwermetallausschüttung

Synaptosomen von Wildtyp- und Prnp-Knockout-Mäusen werden auf dieselbe Art behandelt, wie in Abschnitt 4.9. Eine Depolarisation und damit die Vitalität der Synaptosomenpräparation kann zuvor mittels Fura-2-Messung nach 4.5 festgestellt werden.

Nach der Vorbehandlung werden die depolarisierten Synaptosomen, sowie die Gegenprobe mit einer Zentrifuge bei 14000 g abzentrifugiert und der Überstand bzw. das Pellet getrennt für die Untersuchung mit einem Massenspektrometer mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS) gesichert.

Die Proben werden mit Millipore-Wasser 1:5 verdünnt und mit einem ^{103}Rh -Standard versetzt (auf eine Konzentration von 10 $\mu\text{g/l}$). Das Massenspektrometer (Elan 6000, Perkin Elmer, Sciex, Toronto, Kanada) wird mit einer Reihe von Einzel- und Multielement-Standards (Merck, Darmstadt, Deutschland) kalibriert.

Die ICP-MS ermöglicht die gleichzeitige Bestimmung verschiedener Schwermetalle (Cu, Mn, Fe, Co, Ni, Zn) sowohl im Überstand, als auch im Pellet und im Gesamthomogenat. Dabei wird die zu analysierende Probe mittels eines Hochfrequenzgenerators (1100 Watt Leistung) in Argon-Atmosphäre auf 5000°C aufgeheizt und so in den Plasma-Zustand versetzt. Die entstehenden Ionen können nun in ein klassisches Massenspektrometer überführt werden, wo sie nach Massenzahl aufgetrennt und von einem Elektronen-Multiplier detektiert werden.

5.

Ergebnisse

5.1 Hohe Extinktion von TSPP

Bei der Anregungswellenlänge $\lambda = 414 \text{ nm}$ ermittelt man für den Farbstoff TSPP mittels linearer Regression den sehr hohen Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon = 427000 \pm 42000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$. Der Wert stimmt mit dem Literaturwert (Igarashi und Yotsuyanagi, 1993; Falk, 1975; Biesaga et al., 2000) praktisch überein ($\varepsilon_{414 \text{ nm}} = 464000 \pm 30000 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$). Bei der Emissionswellenlänge von 645 nm ermittelt man einen Wert von $\varepsilon_{645 \text{ nm}} = 47000 \pm 2700 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Abbildung 5.1).

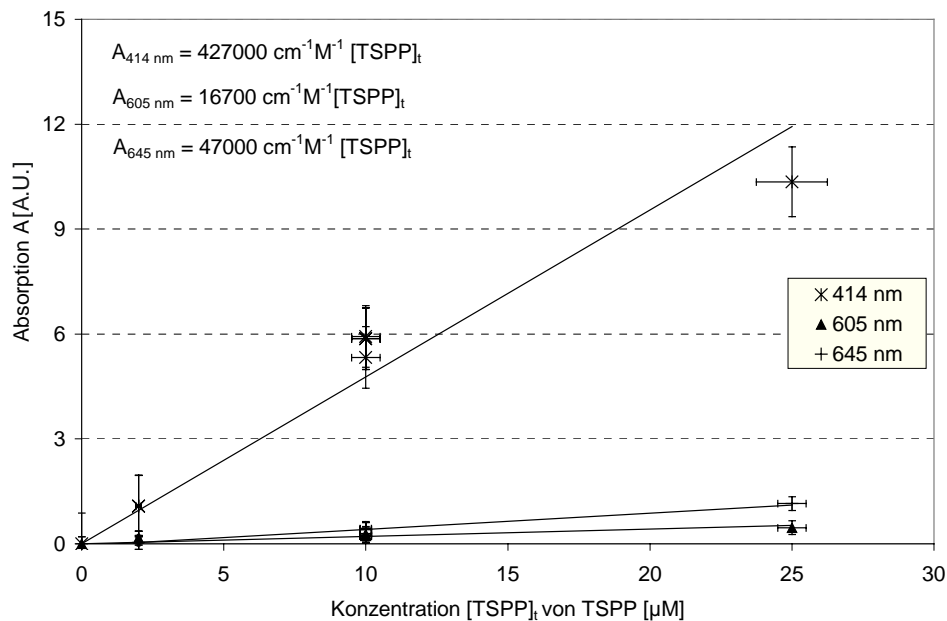


ABBILDUNG 5.1

ABSORPTION VON TSPP AN DEN VERSCHIEDENEN ANREGUNGS- UND EMISSIONSMAXIMA IN ABHÄNGIGKEIT VON DER FARBSTOFFKONZENTRATION (MITTELWERT UND STANDARDFEHLER VON 9 VERSCHIEDENEN MESSUNGEN). TEMPERATUR (37°C) UND pH (7,0) WERDEN KONSTANT GEHALTEN. DER KONZENTRATIONSFEHLER VON 5 % REPRÄSENTIERT DIE GESCHÄTZTEN VERDÜNNUNGSFEHLER.

Eigenabsorption ist also wahrscheinlich die Ursache für das nichtlineare Verhalten der Fluoreszenzintensität bei Konzentrationen von $[\text{TSPP}]_t > 0,8 \mu\text{M}$ (Abbildung 5.5).

Bei Konzentrationen über $0,1 \mu\text{M}$, welche eine Absorption von ungefähr $A \approx 0,05$ ergeben, muss daher der Korrekturterm k_{EA} nach Gleichung 6 eingeführt werden. Abbildung 5.5 zeigt die mit k_{EA} korrigierte Absorption in Abhängigkeit der Farbstoffkonzentration.

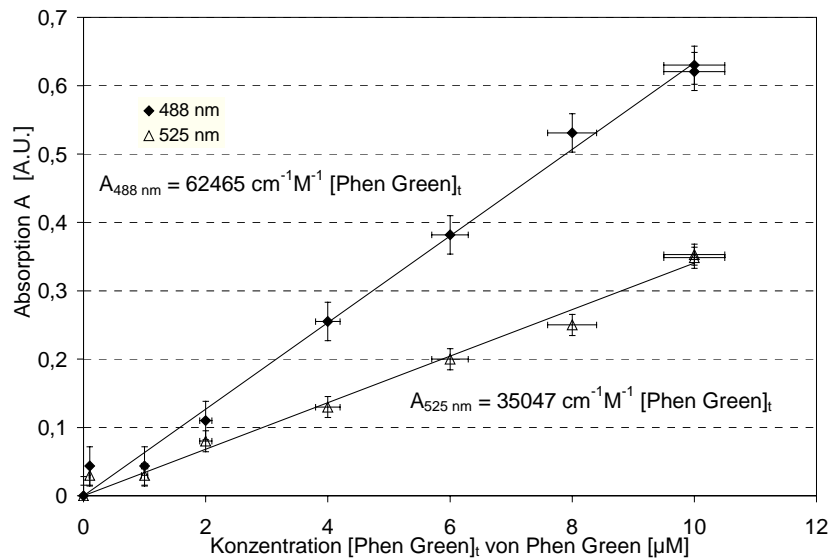


ABBILDUNG 5.2

WIE ABBILDUNG 5.1 MIT PHEN GREEN. AUFGETRAGEN SIND MITTELWERT UND STANDARDFEHLER VON 5 VERSCHIEDENEN MESSUNGEN. DER KONZENTRATIONSFEHLER VON 5 % REPRÄSENTIERT DIE GESCHÄTZTEN VERDÜNNUNGSFEHLER.

Die Absorption verändert sich allerdings nur unwesentlich mit der Kupferkonzentration (Abbildung 5.3), und die Farbstoffkonzentration bleibt während des Experiments gleich, so dass der Korrekturterm k_{EA} nach Gleichung 6 in unserem Falle konstant ist. Da aber nur die Verhältnisse der verschiedenen Fluoreszenzwerte vor und nach Depolarisation (bzw. ohne und mit Kupfer) benötigt werden (s. Abschnitt 3.2), kürzt sich bei der Ermittlung der Kupferkonzentration der Korrekturterm heraus und muss für unsere Zwecke nicht berücksichtigt werden.

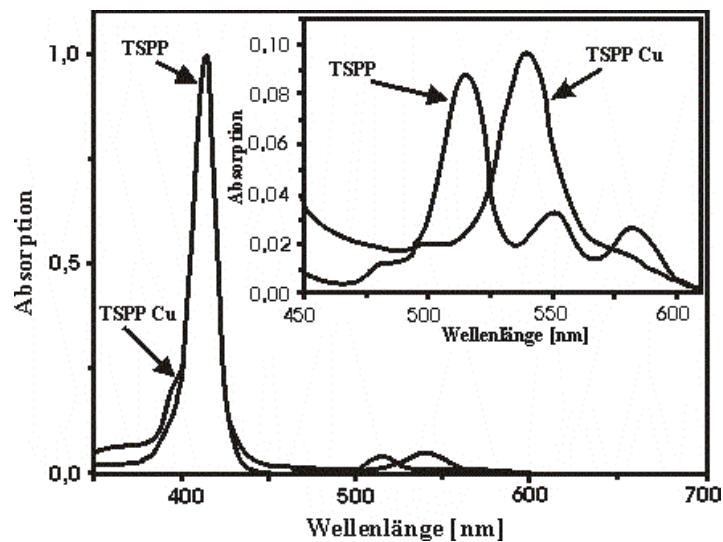
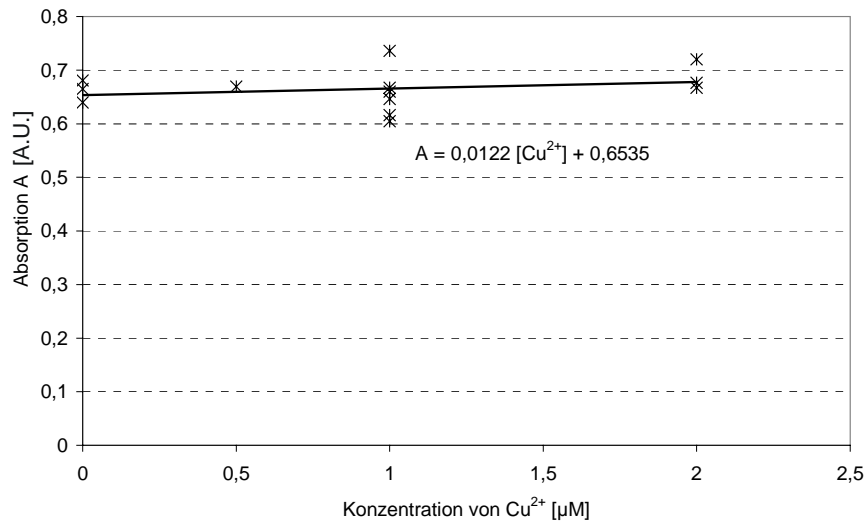


ABBILDUNG 5.3

OBEN: ABSORPTION IN ABHÄNGIGKEIT DER KUPFERKONZENTRATION; UNTEN: ÄNDERUNG DES ABSORPTIONSSPEKTRUMS BEI ZUGABE VON 2 μM KUPFERCHLORID ZU 4 μM TSPP.

DIE ABSORPTION VON TSPP BEI DER ANREGUNGSWELLENLÄNGE 414 NM UND DEN EMISSIONSWELLENLÄNGEN 605 NM BZW. 645 NM VERÄNDERN SICH DURCH ZUGABE VON KUPFER NICHT SIGNIFIKANT.

ES VERÄNDERT SICH JEDOCH DER KLEINE ZUSÄTZLICHE ABSORPTIONSBEREICH ZWISCHEN 500 UND 600 NM, WIE IM EINSCHUB DER UNTEREN ABBILDUNG VERGRÖßERT GEZEIGT.

Die Wiederholung des Experiments mit der später für die biologischen Untersuchungen verwendeten Pufferlösung (Zusammensetzung s. Abschnitt 4.3) ergibt keine signifikanten Unterschiede, weder in den Absorptionsspektren noch in den Reaktionen auf Kupfer.

5.2 Die Fluoreszenzmessungen

5.2.1 Hochspezifische Kupferbindung von TSPP

Die Spektren der Porphyrine und des Phen Green zeigt Abbildung 5.4. Erstere werden optimal mit Licht der Wellenlänge 414 nm, der letztere Farbstoff mit 488 nm angeregt.

TSPP und TCPP strahlen ähnliches Fluoreszenzlicht aus, sie haben einen Emissionspeak bei 645 nm, gefolgt von einer „Schulter“ um 700 nm (Abbildung 5.4).

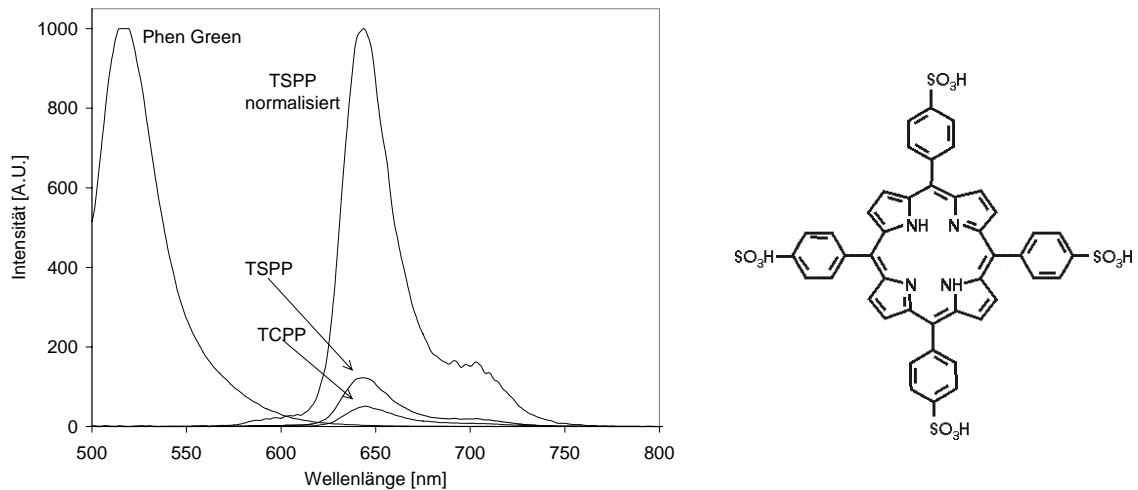


ABBILDUNG 5.4

LINKS SIEHT MAN DIE EMISSIONSSPEKTREN VON 2 μ M TSPP, 10 μ M TCPP UND 2 μ M PHEN GREEN, ANGEREGT MIT DEN ENTSPRECHENDEN WELLENLÄNGEN AUS TABELLE 5.1. FERNER WIRD DAS AUF DEN EMISSIONSPEAK VON PHEN GREEN NORMALISIERTE SPEKTRUM VON TSPP GEZEIGT, UM DESSEN VERLAUF ZU VERDEUTLICHEN. RECHTS WIRD DIE STRUKTURFORMEL VON TSPP DARGESTELLT.

Die gemessenen Anregungs- und Emissionsmaxima der übrigen Farbstoffe werden in Tabelle 5.1 zusammengefasst.

Farbstoff	Anregungs- Emissions- maximum [nm]	→ Veränderung des Emissionsmaximums bei Zugabe von Metallionen
CaGreen-1	506 → 529	
Fura Red	480 → 650	+ Co: Verschiebung auf bis zu 598 nm + Cd: Verschiebung auf bis zu 580 nm + Ca: Verschiebung auf bis zu 637 nm
CaCrimson	588 → 617	
Fluo-3	504 → 526	
Phen Green	488 → 526	
TCPP	414 → 645	
TSPP	414 → 645	+ Zn: zusätzl. Emissionsmaximum bei 605 nm

TABELLE 5.1

ABSORPTIONS- / EMISSIONSWELLENLÄNGEN DER VERSCHIEDENEN FARBSTOFFE UND DEREN BEEINFLUSSUNG DURCH DIE GETESTETEN METALLIONEN.

Die Abhängigkeit der TSPP-Fluoreszenz von der Konzentration des Farbstoffs zeigt Abbildung 5.5.

Die optimale Konzentration ohne Kompensation der Eigenabsorption liegt zwischen 0 und 1 μM . Nach Korrektur steigt die Fluoreszenz bis 10 μM linear an, danach beeinträchtigt wahrscheinlich Self-Quenching oder Dimerisation die Moleküle. Deshalb sollte man TSPP besser nicht in höheren Konzentrationen für Metallbestimmungen benutzen.

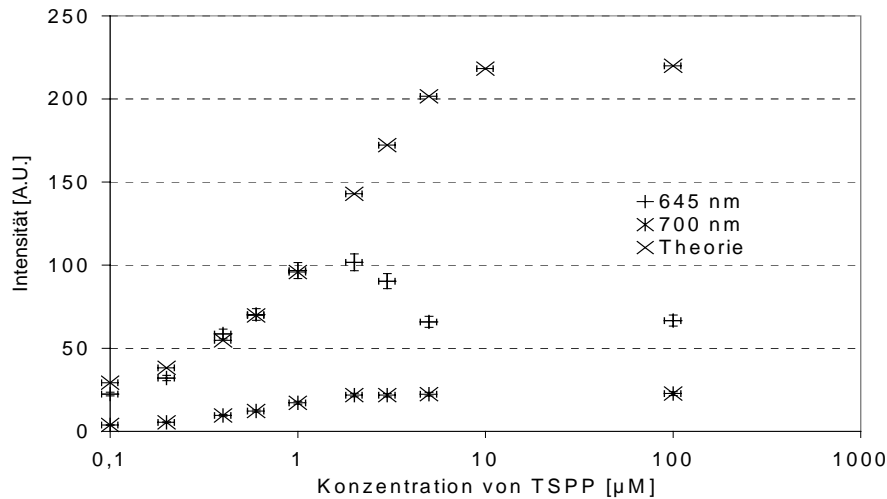


ABBILDUNG 5.5

ABHÄNGIGKEIT DER FLUORESCENZ-INTENSITÄT VON DER KONZENTRATION DES TSPP BEI 645 UND 700 NM. DER FARBSTOFF WIRD MIT 414 NM LICHT ANGEREGT. DIE THEORETISCHE KURVE ENTSPRICHT DER KORREKTUR NACH GLEICHUNG 6 AUS DEM THEORIETEIL, DEREN NÄHERUNG AB UMGEFÄHR 10 µM ZU GROB IST.

Die Eigenabsorption von Phen Green ist nur sehr gering. Bei 2 µM Konzentration erhält man eine Absorption bei der Anregungswellenlänge von $A_{488 \text{ nm}} = 0,125$ aus Abbildung 5.2, was zu einem Korrekturfaktor von $k_{EA} = 1,10$ führt (nach Gleichung 6 aus Abschnitt 3.1.2). Die Emissionsintensität von Phen Green ist, verglichen mit der von TSPP, um ein Vielfaches höher (Abbildung 5.4).

Die entsprechenden Werte für die genannten Kalziumfarbstoffe sind in der Tabelle 5.2 zusammengefasst, sie werden durch viele Literaturquellen bestätigt (z.B. Kao, 1994; Haughland, 1996).

Die ermittelten Dissoziationskonstanten bei Zugabe verschiedener Metallionen findet man in Tabelle 5.3.

$\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$	Calcium-Green	Fura-Red	Calcium Crimson	Fluo 3
Extinktionskoeffizient bei niedriger Kalziumkonzentration	81	29	96	90
Extinktionskoeffizient bei hoher Kalziumkonzentration	82	41	92	100

TABELLE 5.2

DIE EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN DER KALZIUMFARBSTOFFE (HAUGHLAND, 1996), ERMITTELT BEI DER JEWELIGEN ANREGUNGSWELLENLÄNGE AUS TABELLE 5.1.

Ion	Ca-Green-1 Ex. 488 nm	Ca-Crimson Ex. 570 nm	Fura Red Ex. 488 nm	Fluo-3 Ex. 488 nm	TSPP Ex. 414 nm	TCP Ex. 414 nm	Phen Green Ex. 488 nm
Ca ²⁺	529 nm ↑ 0.20 μM	607 nm ↑ 0.19 μM	620 nm ↓ 0.14 μM	525 nm ↑ 0.40 μM	-	645 nm ↓ 0.50 μM	-
Mg ²⁺	529 nm ↓ 0.25 μM	-	-	-	-	-	-
Zn ²⁺	-	607 nm ↑ 1.00 μM	-	525 nm ↑ 0.10 μM	605 nm ↑ 50.00 μM	645 nm ↓ 9.00 μM 605 nm ↑ 9.00 μM	525 nm ↓ 0.20 μM
Cu ²⁺	529 nm ↓ 0.05 μM	607 nm ↓ 0.25 μM	620 nm ↓ 2.50 μM	525 nm ↓ 0.10 ± 0.05 μM	645 nm ↓ 0.43 ± 0.07 μM	645 nm ↓ 0.30 μM	525 nm ↓ 0.30 μM
Co ²⁺	529 nm ↓ 0.20 μM	607 nm ↓ 0.70 μM	620 nm ↓ 1.20 μM	525 nm ↑ 5.70 μM	645 nm (↓) 0.20 ± 0.1 μM	645 nm ↓ 0.05 ± 0.01 μM	525 nm ↓ 0.25 μM
Cd ²⁺	-	-	620 nm ↓ 2.50 μM	-	-	645 nm ↓ 0.02 ± 0.01 μM 605 nm ↑ 0.01 ± 0.01 μM	525 nm ↓ 0.02 ± 0.01 μM
Fe ³⁺	529 nm ↓ 0.20 μM	607 nm ↓ 3.00 μM	620 nm ↓ 6.00 μM	525 nm ↓ 10.00 μM	645 nm ↓ 12.00 μM	645 nm ↓ 0.15 ± 0.03 μM	525 nm ↓ 0.60 μM

TABELLE 5.3

REAKTIONEN DER FARBSTOFFE AUF DIE VERSCHIEDENEN METALLIONEN. MIT EX. IST DIE ANREGUNGSWELLENLÄNGE DES JEWEILIGEN FARBSTOFFS GEKENNZEICHNET, DIE WELLENLÄNGENANGABEN IN DEN EINZELNEN ZELLEN ENTSPRECHEN DEN EMISSIONSWELLENLÄNGEN, BEI WELCHEN EINE REAKTION DES BEZEICHNETEN FARBSTOFFS AUF DAS JEWEILIGE METALL ZU BEOBACHTEN IST. DIE PFEILE GEBEN DIE RICHTUNG DIESER REAKTION AN (↑ / ↓ = ZUNAHME / ABNAHME DER INTENSITÄT). DIE KONZENTRATIONEN GEBEN DIE GEMESSENEN DISSOZIATIONSKONSTANTEN K_D AN. DIE FEHLERWERTE WERDEN – SOWEIT NICHT ANDERS BEZEICHNET – AUF CA. 5 % RELATIVER FEHLER GESCHÄTZT.

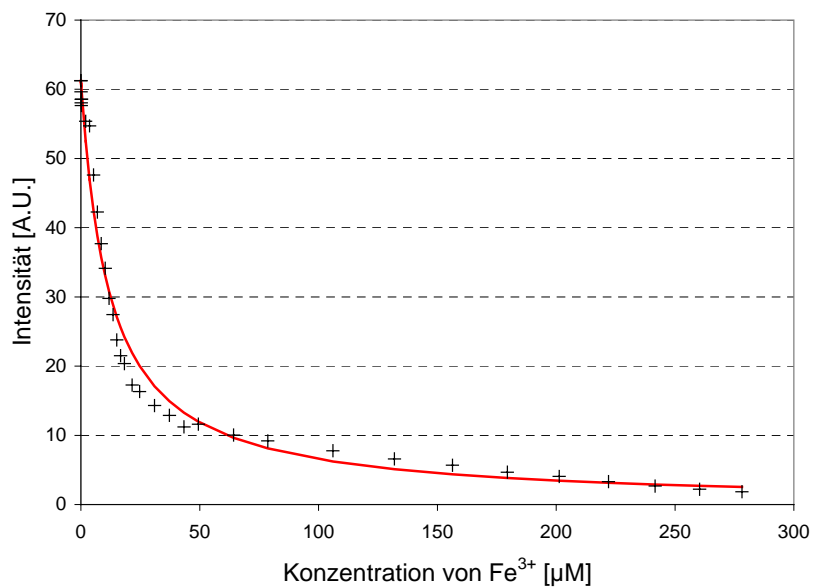
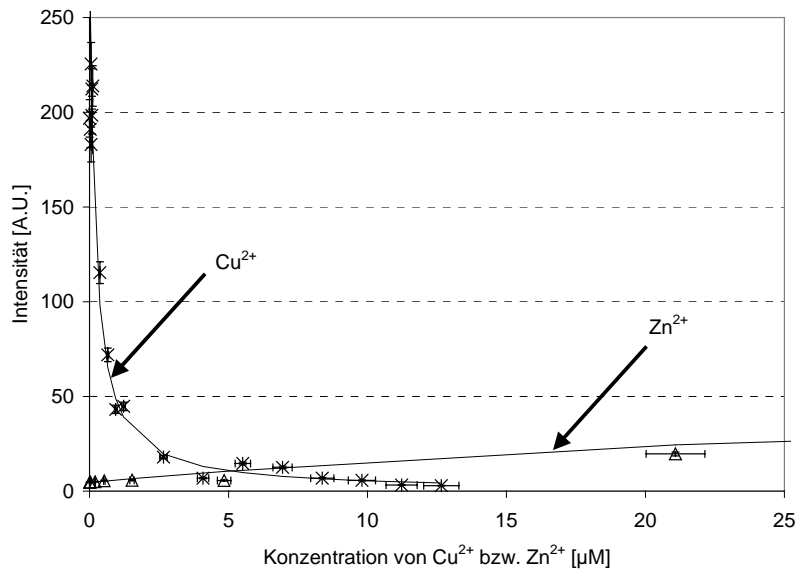


ABBILDUNG 5.6

ÄNDERUNG DER FLUORESZENZ VON TSPP IN BEISPIELMESSUNGEN DURCH ZUGABE VON KUPFER-, ZINK- (OBEN) BZW. EISENIONEN (UNTEN). DIE ANREGUNGSWELLENLÄNGE LIEGT BEI 414 NM. DIE DURCHGEHENDEN LINIEN SIND THEORETISCHE ANPASSUNGSKURVEN NACH DEN GLEICHUNGEN 14 UND 15 AUS ABSCHNITT 3.3 MIT DEN PARAMETERN $K_D = 0,45 \mu\text{M}$ BEI 645 NM FÜR Cu^{2+} , $K_D = 50 \mu\text{M}$ BEI 605 NM FÜR Zn^{2+} , $K_D = 12 \mu\text{M}$ BEI 645 NM FÜR Fe^{3+} .

TSPP reagiert bei 645 nm, dem Wellenlängenbereich maximaler Emission, weder auf die Erdalkali- (Na^+ , K^+) noch auf die Alkalimetalle (Ca^{2+} , Mg^{2+}) und – im Unterschied zu den Angaben von Haughland (1996) – auch nicht auf Kadmium und Mangan, praktisch vernachlässigbar auf Co^{2+} (mit $K_D = 0,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$), nur schwach auf Fe^{3+} (mit $K_D = 12 \pm 0,6 \mu\text{M}$) und recht sensitiv auf Cu^{2+} ($K_D = 0,43 \pm 0,07 \mu\text{M}$). Bei 605 nm wird TSPP nur durch Zn^{2+} positiv gequench (mit $K_D = 50 \pm 2,5 \mu\text{M}$).

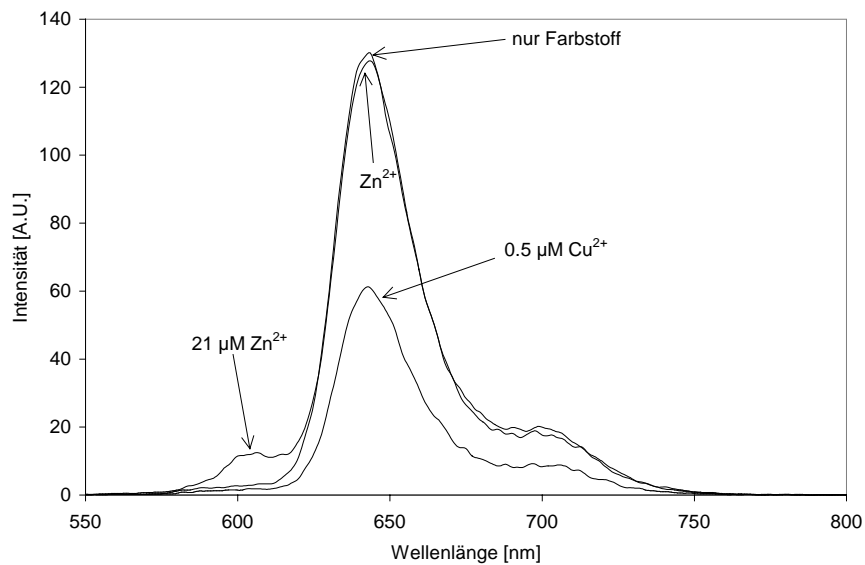


ABBILDUNG 5.7

VERGLEICH DER SPEKTREN VON 10 μM TSPP UNTER EINFLUSS VON KUPFER UND VON ZINK IN DEN ANGEGEBENEN KONZENTRATIONEN. DIE BEIDEN WELLENLÄNGENBEREICHE WERDEN VOLLSTÄNDIG UNABHÄNGIG VONEINANDER GEQUENCHT.

Zink hat auch in sehr hohen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Emissionslinie bei 645 nm (Abbildung 5.7). Man kann dieses Metall also wegen des ausreichenden Abstands der zwei Peaks sogar gleichzeitig mit Kupfer messen.

Mit dem physiologischen Synaptosomen-Puffer ergeben sich keine Unterschiede in den festgestellten Dissoziationskonstanten der hier wichtigen Farbstoffe TSPP, TCPP, Phen Green.

Die zum Einstellen des pH-Wertes verwendeten Chemikalien, HEPES und MES bzw. NaOH und HCl, beeinflussen die Fluoreszenz in Konzentrationen von $> 50 \text{ mM}$ bzw. $> 200 \text{ mM}$ nicht, sofern der pH-Wert und das Volumen konstant gehalten werden.

Alle anderen Farbstoffe werden durch mindestens ein weiteres der untersuchten Metallionen neben Cu^{2+} gequench, so dass diese für eine Messung der Kupferkonzentration nicht in Frage kommen.

Mit der so ermittelten Dissoziationskonstante von $0,43 \mu\text{M}$ für TSPP mit Cu^{2+} sollte man also Konzentrationen von mindestens $4\text{-}5 \mu\text{M}$ des Farbstoffs benutzen. Diese Konzentration ist allerdings bereits mit einer sehr hohen Absorption ($A = 2,39$) bzw. einer sehr hohen Eigenabsorption belegt. Die Fluoreszenzintensität des Porphyrins ist daher recht gering und nur bei optimaler Einstellung im Mikroskop verwendbar.

5.2.2 Unabhängigkeit der TSPP-Kupferbindung von pH und Temperatur

Alle anderen Parameter von TSPP sind günstig für biologische Messungen: Die Dissoziationskonstante mit Kupfer ist – wie man in Abbildung 5.8 sehen kann – praktisch unabhängig von der Temperatur im Bereich von 20 bis 40°C , wie sie bei biologischen Proben in der Regel verwendet werden. Außerdem steigt K_D erst bei Reduzierung des pH unter $6,0$, welcher meist nicht benötigt wird (Abbildung 5.9).

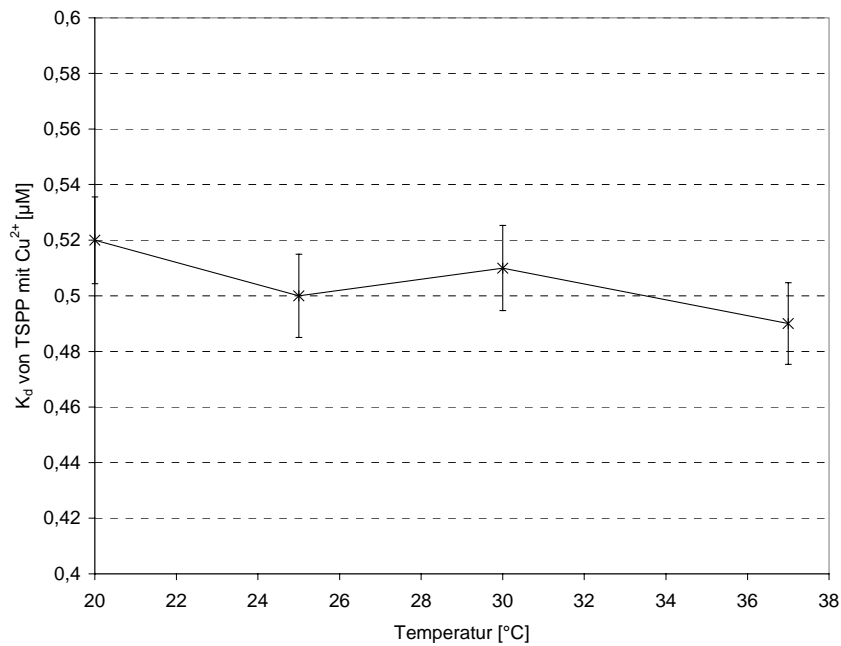


ABBILDUNG 5.8

IM TEMPERATURBEREICH VON 20 BIS 40°C IST DIE K_D VON TSPP MIT Cu^{2+} UNGEFÄHR KONSTANT. DIE TEMPERATUR WIRD MIT EINEM DIGITALEN THERMOELEMENT (FEHLER $\Delta t = \pm 0,5^\circ\text{C}$) GEMESSEN, SIE WIRD MIT EINEM WASSERKREISLAUF INNERHALB DES LS 50 SPEKTROMETERS KONSTANT GEHALTEN.

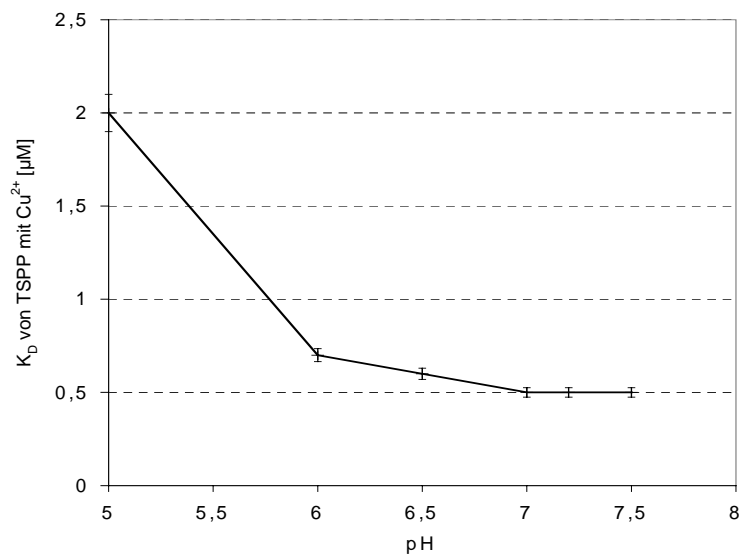


ABBILDUNG 5.9

DIE DISSOZIATIONSKONSTANTE K_D VON TSPP MIT Cu^{2+} ÄNDERT SICH SIGNIFIKANT, SOBALD DER pH UNTER 6,0 SINKT. DIE AUFGETRAGENEN PUNKTE SIND MITTELWERTE UND STANDARDFEHLER VON 3 VERSCHIEDENEN MESSUNGEN. DER pH-WERT WIRD MIT EINEM ÜBLICHEN pH-METER GEMESSEN, DESSEN FEHLER AUF $\Delta\text{pH} = \pm 0,2$ GESCHÄTZT WIRD.

5.2.3 Geschwindigkeit der Komplexbildung von TSPP mit Kupfer

Das Zeitverhalten des Farbstoffs zeigt Abbildung 5.10. Die Reaktion auf Kupfer erfolgt demnach innerhalb von ca. einer halben Minute.

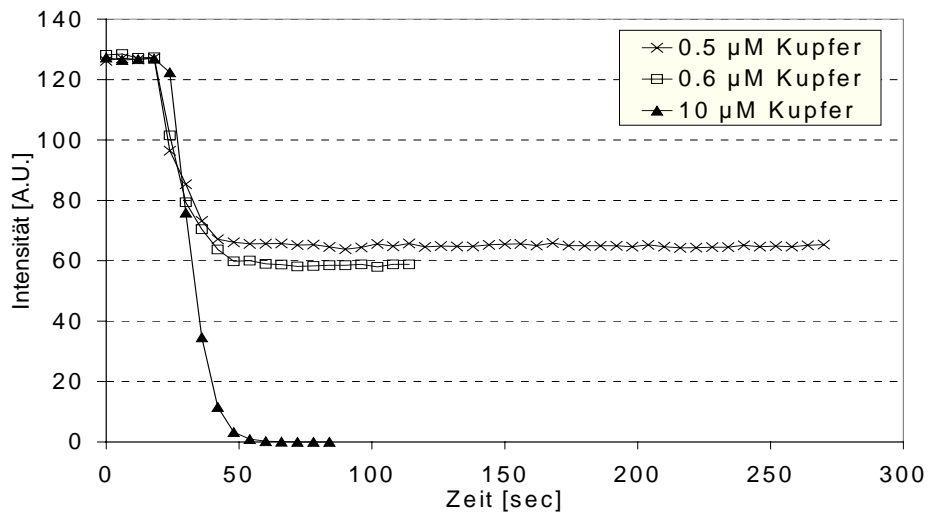


ABBILDUNG 5.10

ZEITLICHE AUFTRAGUNG DER REAKTION VON TSPP BEI BINDUNG MIT KUPFER. NACH CA. 30 SEKUNDEN SIEHT MAN KEINE ÄNDERUNG DER FLUORESZENZ MEHR.

5.3 Biologische Anwendung

5.3.1 Alle Maustypen zeigen ähnliche intrazelluläre Kalziumkonzentrationen

Mit den gemessenen Zeitprofilen der Anregung von Fura-2, wie z.B. Abbildung 5.11, kann man nach Abschnitt 3.5 die Kalziumkonzentrationen vor und nach Depolarisation berechnen.

Die basalen Kalziumkonzentrationen aus 9 Messungen von 4 verschiedenen Präparationen unterscheiden sich nur unwesentlich voneinander ($p < 0,05$, t-Test), den niedrigsten Wert findet man beim C4-Typ (s. Tabelle 5.4).

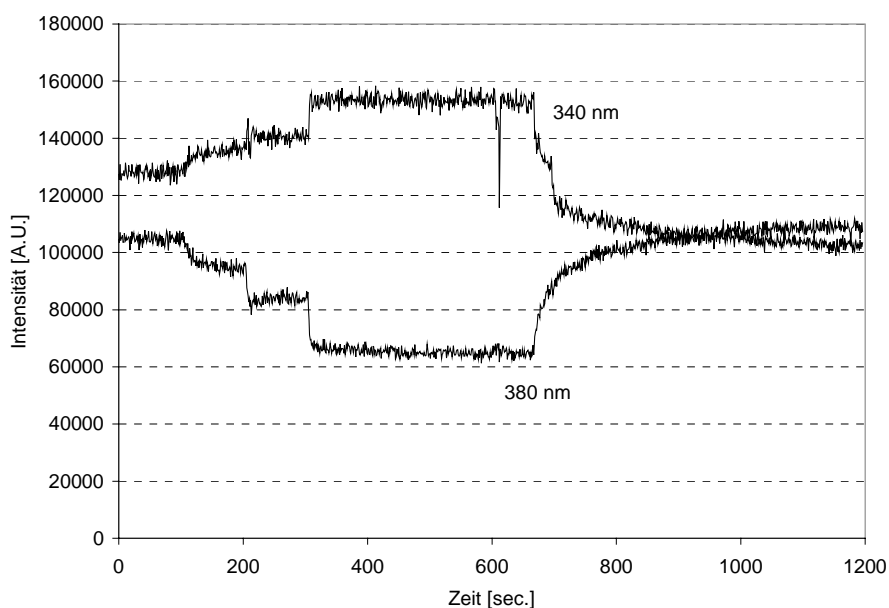


ABBILDUNG 5.11

MESSUNG DER INTRAZELLULÄREN KALZIUMKONZENTRATION VON WT-SYNAPTOSOMEN MIT 4 μM FURA-2-AM. BEI 100 s ZUGABE VON CaCl_2 (1.3 mM), BEI 200 s KCL (50 mM), BEI 300 s TRITON X-100 (1 % IN 3 M TRIS-HCL, PH 8) ODER WIE HIER IONOMYCIN (25 μM), BEI 650 s EGTA (10 mM). ANDERE EXPERIMENTE WERDEN MIT 200 μM DIGITONIN ANSTATT IONOMYCIN DURCHFÜHRT (MIT DEMSELBEN ERGEBNIS).

	$[Ca^{2+}]_{i,vor}$ in nM	$[Ca^{2+}]_{i,nach}$ in nM	Differenz in nM
Bestimmung von R_{max} mit Triton (je 9 Messungen aus 4 Präparationen)			
WT	$221,7 \pm 18,5$	$422,3 \pm 38,1$	$197,8 \pm 18,2$
Prnp ^{0/0}	$201,0 \pm 22,7$	$369,9 \pm 43,0$	$168,9 \pm 22,3$
C4	$224,4 \pm 16,0$	$392,1 \pm 25,8$	$167,7 \pm 14,6$
Tg20	$215,2 \pm 17,5$	$405,8 \pm 30,2$	$190,6 \pm 19,1$

TABELLE 5.4

ERGEBNISSE DER KALZIUMMESSUNGEN. $[Ca^{2+}]_{i,vor}$ BZW. $[Ca^{2+}]_{i,nach}$ BEDEUTEN DIE INTRAZELLULÄRE KALZIUMKONZENTRATION VOR BZW. NACH DEPOLARISATION. ANGEGEBEN SIND JEWEILS MITTELWERT UND STANDARDFEHLER AUS 9 MESSUNGEN.

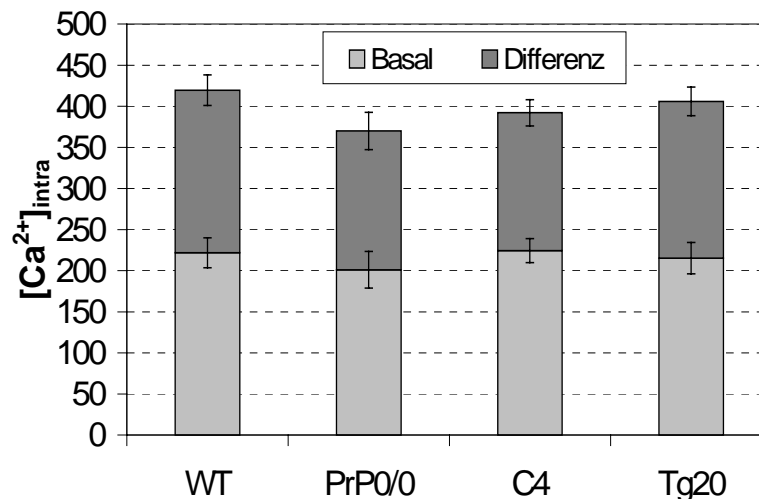


ABBILDUNG 5.12

BASALE INTRAZELLULÄRE KALZIUMKONZENTRATION UND DEREN DIFFERENZ $[Ca^{2+}]_{NACH} - [Ca^{2+}]_{VOR}$ NACH BZW. VOR DER DEPOLARISATION. ES WERDEN ZUR BERECHNUNG VON MITTELWERT UND STANDARDFEHLER 9 MESSUNGEN VON 4 VERSCHIEDENEN WÜRFEN VERWENDET. DIE VERSCHIEDENEN TRANSGENE ZEIGEN ÄHNLICHE BASALE KALZIUMKONZENTRATIONEN, DER KALZIUMEINSTROM SCHEINT BEI WT-MÄUSEN HÖHER ZU LIEGEN.

Die intrazellulären Kalziumkonzentrationen erhöhen sich um $197,8 \pm 18,2$ nM in WT-, $168,9 \pm 22,3$ nM in Prnp^{0/0}-, $167,7 \pm 14,6$ nM in C4- und $190,6 \pm 19,1$ nM in Tg20-Synaptosomen.

Mit dem t-Test erkennt man, dass die Differenzen zwischen den Maustypen nicht signifikant ist ($p < 0,05$ in allen Fällen). Abbildung 5.12 fasst die Ergebnisse zusammen.

Benutzt man für die Ermittlung des Wertes für R_{\max} statt einer Kalziumlösung eine 25 μM Ionomycin-Lösung (del Rio et al., 1994), erhält man ähnliche Ergebnisse, sowohl die intrazellulären Konzentrationen, als auch die Veränderungen bei Depolarisation sind bei dieser Eichung allerdings ca. 20 – 25 % höher.

5.3.2 TSPP hat auf Chromaffinzellen und Synaptosomen keine toxischen Effekte

Bei der Vitalität der Zellen ergibt sich kein signifikanter Unterschied zu den Messungen, welche ohne vorherige Zugabe von TSPP durchgeführt worden sind: Die Zellen funktionieren normal, haben im Mittel ähnliche Kalziumkonzentrationen vor bzw. nach Depolarisation und zeigen ähnliche Reaktionen bei der Glutamatfreisetzung. Es gibt daher keinen Anlass, eine Beeinflussung von TSPP auf die Synaptosomen oder auf deren Verhalten bei Depolarisation und Vesikelrelease zu befürchten. Auch die Chromaffinzellen aus dem folgenden Abschnitt zeigen keine Zeichen von Beschädigung, nachdem sie 1 Stunde dem Farbstoff ausgesetzt worden sind.

5.3.3

TSPP ist membranimpermeabel an Chromaffinzellen und Synaptosomen

Selbst nach 1 Stunde beobachtet man im Zellinneren von bovinen Chromaffinzellen keine TSPP-spezifische (Abbildung 5.13A), wohl aber die Autofluoreszenz der Zellen (Abbildung 5.13B).

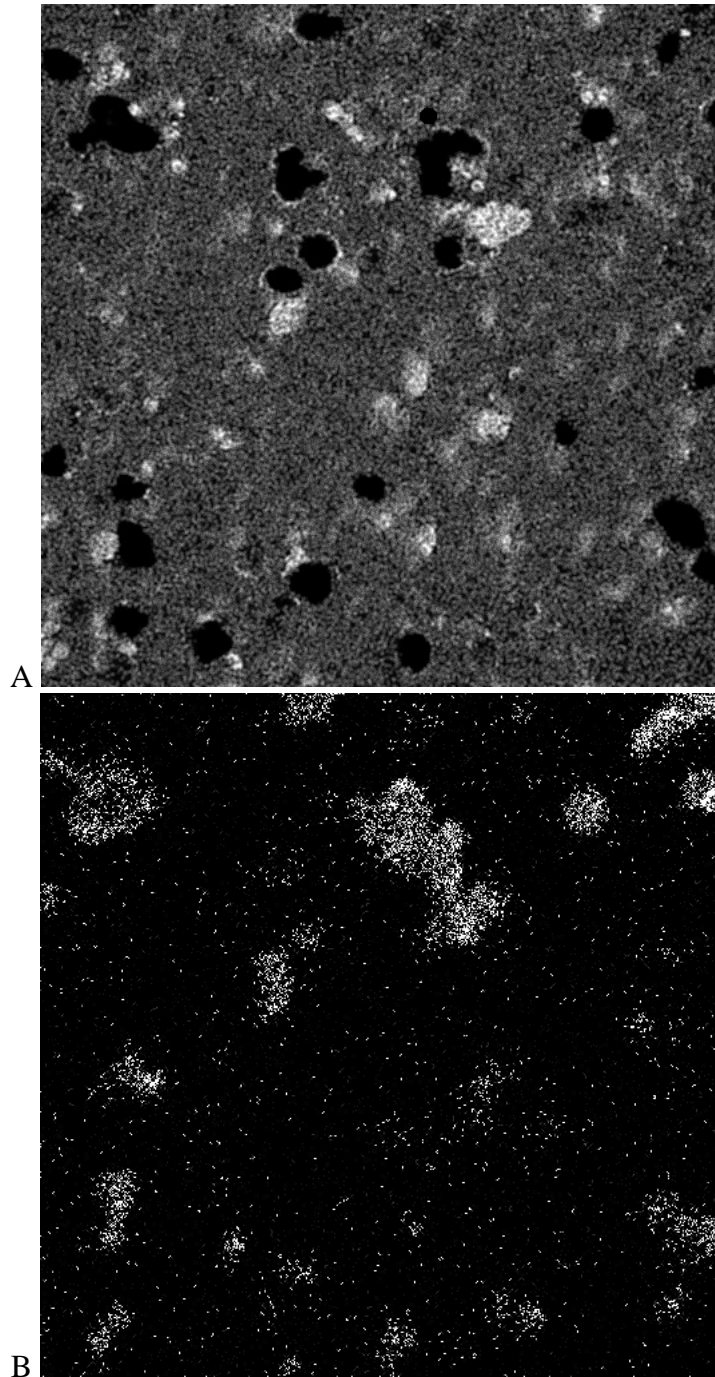


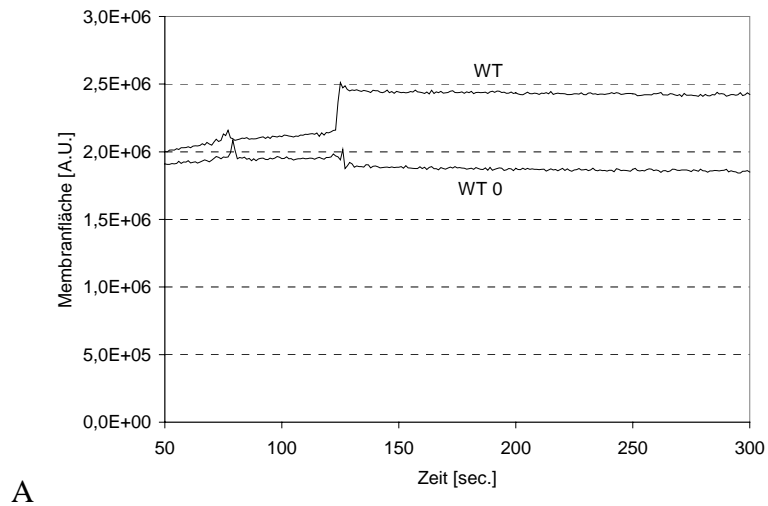
ABBILDUNG 5.13

CHROMAFFINZELLEN UNTER EINFLUSS VON TSPP. MAN SIEHT IN (A) TSPP-FLUORESCENZ, IN (B) AUTOFLUORESCENZ.

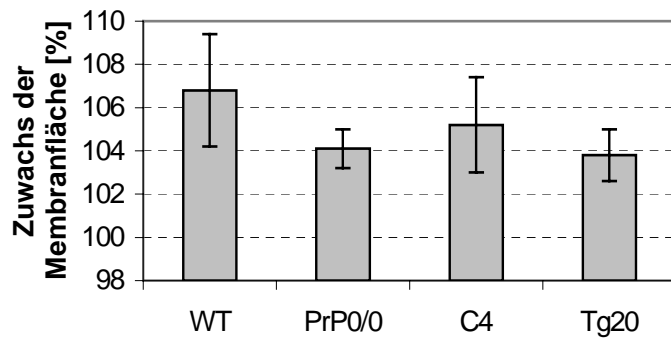
Nach Zerstörung der Zellen durch hohe Osmolarität (1 M KCl) verschwindet die Autofluoreszenz. Die Fluoreszenz bei 700 nm bleibt erhalten und weitet sich sogar auf die vorher nicht in bei dieser Wellenlänge fluoreszierenden, intrazellulären Bereiche aus. Triton zur Zerstörung der Zellen zu verwenden, verbietet sich, da hierdurch auch die Fluoreszenz des Farbstoffs beeinflusst wird.

5.3.4 Alle Maustypen zeigen ähnliche exozytotische Aktivität

Die Messungen mit FM 1-43 zeigen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (im t-Test $p < 0,05$, vgl. Abbildung 5.14). Man erhält eine durchschnittliche Membranvergrößerung um $(6,8 \pm 2,6)$ % für WT, $(4,1 \pm 0,9)$ % für Prnp^{0/0}, $(5,2 \pm 2,2)$ % für C4 und $(3,8 \pm 1,5)$ % für Tg20. Die Werte haben eine relativ hohen Standardfehler, die durch hohe Abweichungen zwischen verschiedenen Messtagen zustande kommt. Innerhalb einer Präparation liegen die Ergebnisse aber dicht beieinander. Dies liegt wahrscheinlich an einer unterschiedlichen Vitalität der Synaptosomen von Präparation zu Präparation.



A

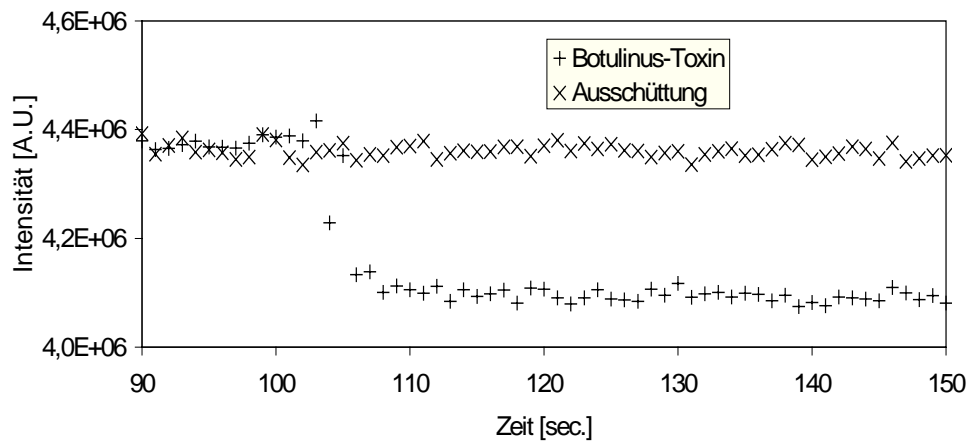


B

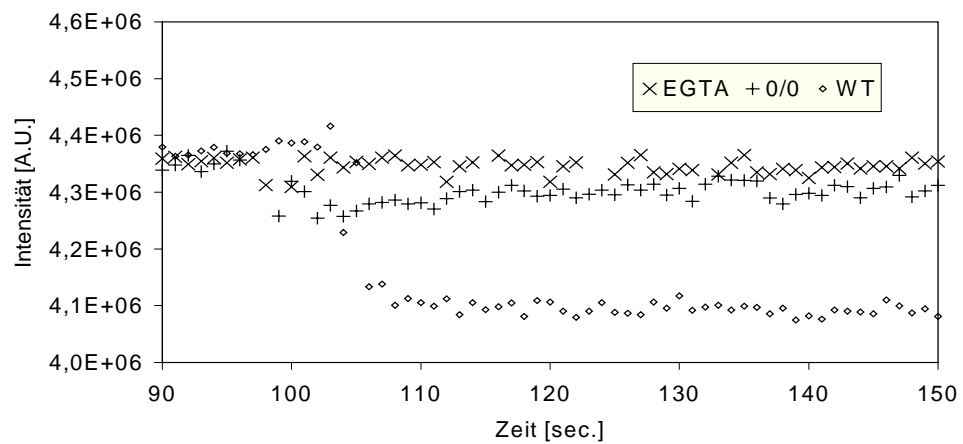
ABBILDUNG 5.14

(A) MESSUNG DER EXOZYTOSE VON WT-SYNAPTOSOMEN MIT FM 1-43 WIE IM METHODENTEIL BESCHRIEBEN. DIE OBERE KURVE REPRÄSENTIERT DIE DEPOLARISATION MIT KCL (50 mM BEI 125 s), DIE UNTERE ENTSpricht DER GEGENPROBE, WELCHE MIT EGTA WIE BESCHRIEBEN DURCHFÜHRT WORDEN IST. EXPERIMENTE MIT BOTULINUS-TOXIN, WELCHES DIE EXOZYTOSE VERHINDERT, ERGEBEN ÄHNLICHE WERTE.

(B) DER VERGLEICH DER DURCHSCHNITTlichen INTENSITÄTserHÖHungen DER FLUORESZENZ VON FM 1-43 BZW. DER MEMBRANVERGRÖßERungen DURCH EXOZYTOSE ERGIBT KEINE SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DEN TRANSGENEN.



(A)



(B)

ABBILDUNG 5.15

(A) MESSUNG VON Cu^{2+} MIT TSPP WIE IM METHODENTEIL BESCHRIEBEN, OBEN IN ANWESENHEIT VON BOTULINUS-TOXIN. BEI 100 s DEPOLARISATION MIT 50 mM KCL. (B) VERGLEICH DER ÄNDERUNGEN BEI EINER 0/0-MAUS, EINER WT-MAUS UND ALS GEGENPROBE UNTER ENTZUG DER IONEN MIT EGTA.

5.3.5 Nachweis von depolarisationsbedingten und PrP-abhängigen Kupfer-, sowie Zink-Ausschüttungen

Die Ergebnisse der Kupfermessungen sind in Abbildung 5.17 verzeichnet. Sie werden nach Abschnitt 3.3 durch Messkurven ermittelt, wie z.B. in Abbildung 5.15 dargestellt.

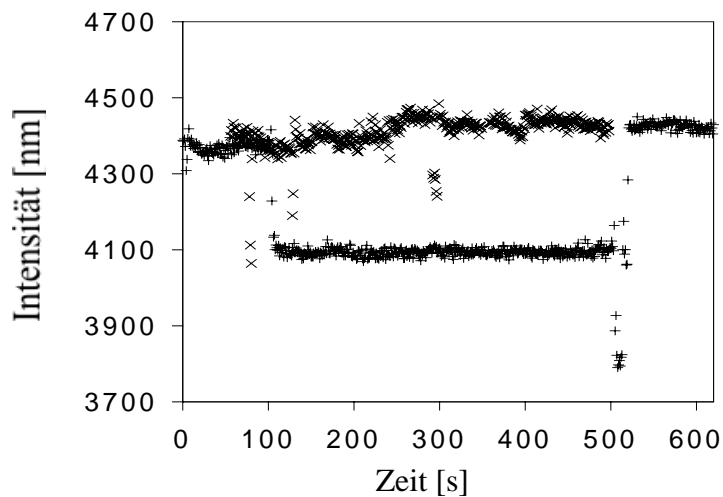
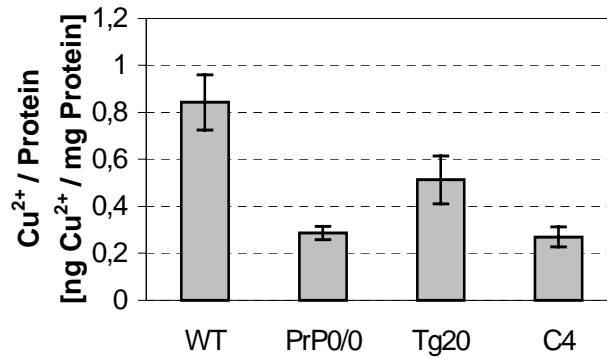


ABBILDUNG 5.16

IM VERGLEICH ZUR KONTROLLE (x) SINKT DIE TSPP-FLUORESZENZ (+) NACH DEPOLARISATION DER SYNAPTOSOMEN MIT 50 mM KCL BEI 100 S. AB UND ERREICHT NACH ZUGABE VON 50 mM CA-EGTA BEI 500 S. WIEDER IHREN URSPRÜNGLICHEN WERT

Nach Messung von 37 verschiedenen Präparationen, die vorher jeweils mittels der Messung des Glutamat-Releases auf Vitalität geprüft worden sind, mit je ≥ 3 Proben berechnet man nach Gleichung 14 aus Abschnitt 3.3 die Kupferkonzentrationen nach Depolarisation in der Messküvette. Mittels des Atomgewichts für Kupfer (63,546 g/mol) und dem Volumen der Küvette (2 ml) kann man aus den gemessenen Konzentrationen die ausgeschüttete Menge an Kupfer in ng berechnen. Bezogen auf die eingesetzte Proteinmenge von 2,5 mg erhält man schließlich für WT-Mäuse einen Kupfergehalt von $0,9 \pm 0,1$ ng / mg Protein, für Prnp^{0/0} $0,45 \pm 0,04$ ng / mg Protein, Tg20 $0,67 \pm 0,09$ ng / mg Protein, C4 $0,39 \pm 0,08$ ng / mg Protein (Abbildung 5.17). Hierbei unterscheiden sich Tg20-Werte nicht signifikant von den WT-Äquivalenten, während C4- und Prnp^{0/0}-Kupfergehalte deutlich vom Normwert abweichen (im t-Test $p < 0,05$).



Typ	[Cu ²⁺] [nM]	[Cu ²⁺][ng/mg P.]
WT	35,5 ± 3,8	0,902 ± 0,097
0/0	17,7 ± 1,7	0,450 ± 0,043
Tg20	26,2 ± 3,4	0,666 ± 0,090
C4	15,4 ± 3,2	0,392 ± 0,081

ABBILDUNG 5.17

DIE ERGEBNISSE DER KUPFERMESSUNGEN (MITTELWERT UND STANDARDFEHLER AUS JE 9 MESSUNGEN VON 3 VERSCHIEDENEN MÄUSEWÜRFEN). IN DER TABELLE SIND DIE IN DER KÜVETTE GEMESSENEN KONZENTRATIONEN UND DIE AUF DEN GEMESSENEN PROTEINGEHALT (2500 µg/ML) BEZOGENE MENGE AN AUSGESCHÜTTETEM KUPFER ANGEZEIGT.

Die Menge des ausgeschütteten Kupfers ist proportional zur eingesetzten Proteinmenge, wie in der Theorie vorhergesagt (Abbildung 5.18). Lineare Regression der Werte in Abbildung 5.18 liefert:

$$[Cu^{2+}] = 1,0 \pm 0,3 \cdot 10^{-5} \left[\frac{mmol Cu^{2+}}{g Protein} \right] \cdot \xi_{Protein}$$

$\xi_{Protein}$ ist der Proteingehalt in µg / ml.

Auch nach der Depolarisation kann man den Farbstoff noch erwartungsgemäß durch Kupferzugaben von außen beeinflussen. Erhöhung der Konzentration um 0,2 µM Cu²⁺ zeigt dabei einen ähnlichen Abfall in der Fluoreszenzintensität, wie man ihn auch nach der Vesikelausschüttung beobachten kann, durch zusätzliche 25 µM CuCl₂ erlischt das ausgestrahlte Licht (Abbildung 5.19). 50 mM Ca-EGTA stellen die vor der Depolarisation beobachtete Fluoreszenzintensität wieder her (Abbildung 5.16), da die Bildungskonstante des EGTA um viele

Größenordnungen ($K_D \approx 10^{-38}$ M) unter der von TSPP liegt und ihm daher die Kupferionen entzieht.

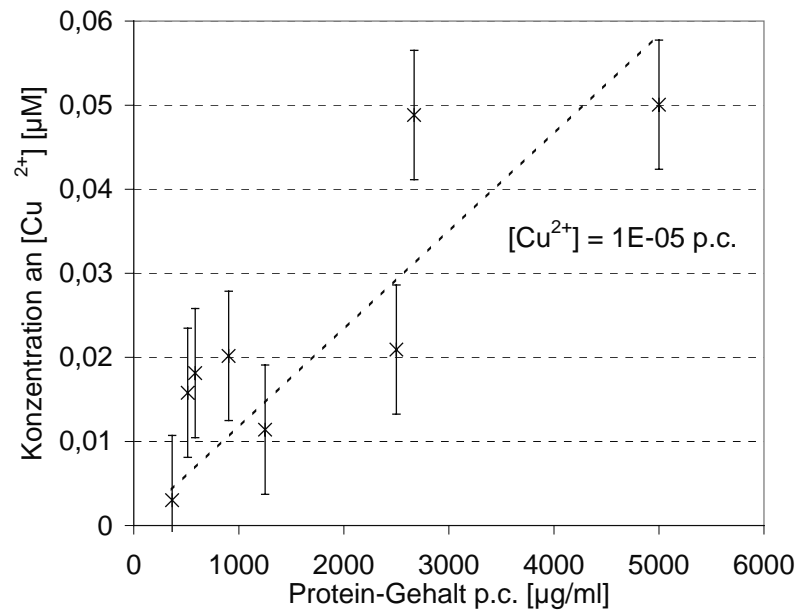


ABBILDUNG 5.18

DIE GEMESSENE KUPFERAUSCHÜTTUNG IST PROPORTIONAL ZUM PROTEINGEHALT DER WT-SYNAPTOSOMENPRÄPARATIONEN. DIE FEHLERBALKEN ZEIGEN DEN STANDARDFEHLER AUS JE 5 MESSUNGEN AN.

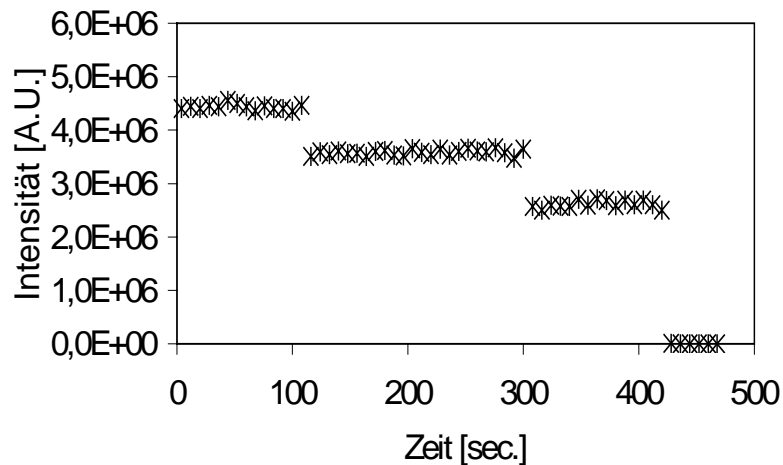


ABBILDUNG 5.19

NACH DEPolarisation VON WT-SYNAPTOSOMEN MIT KCL, WIE BESCHRIEBEN, ZUGABE VON 0,2 µM Cu^{2+} (MIT ÄHNLICHEM FLUORESCENZABFALL WIE NACH DEPolarisation) BEI 300 S. ERLISCHT DIE FLUORESCENZ DURCH ZUGABE WEITERER 25 µM KUPFER VOLLENDTS.

Der Kupfergehalt liegt im Bereich von 2 % der mit Atom-Absorptionsmessungen bestimmten Kupfermengen, die in synaptosomalen Präparationen gefunden worden sind (39 ± 9 ng / mg Protein, Herms et al., 1999). Der Unterschied erklärt sich dadurch, dass der Hauptteil der Kupferionen sich in den Mitochondrien befindet und an Proteine gebunden vorliegt (vgl. Berechnungen in Abschnitt 3.4).

Wie schon bei der Messung der Farbstoffspektren dargelegt, kann man mit TSPP auch parallel Zinkkonzentrationen messen. Dies ist bei einigen Mäusen durchgeführt worden, man erhält eine Zink-Ausschüttung von im Mittel $20,1 \pm 5,5$ ng Zn^{2+} / mg Protein für WT-Mäuse.

5.3.6 Massenspektroskopischer Nachweis der Ausschüttung von Zink, Nickel und Eisen und Bestätigung des vom Maustypen abhängigen Kupfer-Releases

Mit der ICP-MS-Methode wird die Ausschüttung wie oben beschrieben von WT- (4 Messungen) und $Prnp^{0/0}$ -Mäusen (8 Messungen) untersucht. Die Ergebnisse fasst Tabelle 5.5 zusammen. Im Rahmen der Messfehler ist bei WT-Mäusen praktisch keine Ausschüttung von Kobalt, Nickel und Mangan zu beobachten, während Kupfer, Eisen und Zink in mehr oder weniger großen Mengen bei der Depolarisation freigesetzt werden. Nur die Ausschüttungen von Kupfer ($3,9 \pm 1,0$ ng/mg Protein WT und $1,2 \pm 0,3$ ng/mg Protein Knockout-Maus) unterscheiden sich signifikant in Abhängigkeit vom Maustyp ($p < 0,05$, t-test).

ng / mg Protein	WT	$Prnp^{0/0}$
Cu	$3,9 \pm 1,0$	$1,2 \pm 0,3$
Mn	$0,6 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,1$
Fe	$6,4 \pm 2,8$	$8,6 \pm 2,0$
Zn	$15,7 \pm 5,8$	$13,9 \pm 3,3$

TABELLE 5.5

ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG DES ÜBERSTANDS VON SYNAPTOSOMEN VOR BZW. NACH DEPOLARISATION MITTELS ICP-MS.

6. Diskussion

Die Hinweise für eine wesentliche Beteiligung von Kupferionen bei neurodegenerativen Krankheiten, wie z.B. dem M. Alzheimer und der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (Bush, 2000), haben in den letzten Jahren zugenommen. Es wurde bereits in der Einleitung betont, wie wichtig daher eine Methode zur Bestimmung von Kupferkonzentrationen *in vivo* ist.

Zusammenfassend sind in Abschnitt 2.6 folgende Ziele dieser Arbeit festgelegt worden:

↪ ... die Entwicklung einer Methode, die geeignet ist, Cu^{2+} - Konzentrationen *in vivo*, idealerweise im synaptischen Spalt zu bestimmen.

Hierzu werden in Abschnitt 6.1 zunächst die Eigenschaften des Farbstoffs *in vitro* diskutiert und daraus auf die Grenzen und Möglichkeiten des Farbstoffs geschlossen.

In Abschnitt 6.2 wird schließlich seine Anwendung *in vivo* betrachtet. Insbesondere wird dort auch auf die möglichen Messfehler eingegangen und die Begründung geliefert, wieso der Farbstoff sowohl im Reagenzglas, als auch in biologischem Gewebe scheinbar sehr selektiv und spezifisch Kupfer aufspürt.

↪ ... die Erarbeitung einer Kreuzprobe mit anderen Messverfahren.

Hierfür wird die ICP-MS herangezogen, deren Ergebnisse daher in Abschnitt 6.3 mit denen des Farbstoffs TSPP verglichen werden.

↪ ... die Klärung der Frage, ob die veränderte Kupferausschüttung durch eine verminderte Exozytose synaptischer Vesikel entsteht.

Hierzu werden in Abschnitt 6.4 die Ergebnisse der Untersuchungen zur Exozytose analysiert (Glutamatausschüttung, intrazelluläre Kalziumbestimmung, Messung mit FM 1-43).

↪ ... die Prüfung, ob und in welcher Konzentration Kupfer bei der Depolarisation ausgeschüttet wird.

Dies wird bereits aus den vorherigen Punkten beantwortet. Darüber hinausgehend wird aber in Abschnitt 6.5 eine Theorie vorgestellt, anhand welcher aus den Messdaten sowohl die Kupfer-, als auch die Zinkkonzentration in der Synapse und den synaptischen Vesikeln berechnet werden kann.

↳ ... die Analyse, ob die freigesetzten Mengen an Kupfer von der PrP-Expression abhängen. Solche Unterschiede werden gefunden. Erklärungsansätze hierfür werden in Abschnitt 6.6 geliefert.

6.1 Analyse der Farbstoffe

Das gefundene Porphyrin TSPP wurde bisher nur für die photophysikalische Bekämpfung von Leukämie benutzt (z.B. Fiedorowicz et al., 1993). Es hat sich nun aber als wertvoller Farbstoff entpuppt, der es ermöglicht, kleinste Konzentrationen von Zink und Kupfer gleichzeitig *in vivo* zu messen. TSPP wird nämlich separat in einem Wellenlängenbereich um 605 nm ($K_D = 50 \mu\text{M}$) von Zn^{2+} und um 645 nm ($K_D = 0,43 \mu\text{M}$) von Cu^{2+} selektiv gequenchet.

Aus den vorgestellten Messergebnissen ergeben sich folgende Eigenschaften von TSPP:

- a) Die hohe Sensitivität für Cu^{2+} liest man an der Dissoziationskonstante im submikromolaren Bereich ab.
- b) Die hohe Spezifität für Cu^{2+} kann nicht nur aus den hier vorgestellten In-vitro-Messergebnissen, sondern zusätzlich anhand theoretischer Überlegungen abgeleitet werden:
 - Aus sterischen Gründen passen nur Kationen mit einem Ionenradius zwischen 60 – 70 pm in den Porphyrinring. Mn^{2+} , Cd^{2+} , K^+ , Na^+ und Ca^{2+} (Ionenradien > 90 pm) könnten damit nur oberhalb der Ebene des Porphyrinrings angreifen (Abbildung 4.2), und ein

solcher Komplex ist energetisch recht ungünstig (Falk, 1975; Tanaka, 1983; Turay et al., 1980). Daher werden mit diesen Metallionen in vitro keine signifikanten Fluoreszenzänderungen beobachtet.

- Außerdem sind nach den von Jimenez et al. (1991) bestimmten thermodynamischen Konstanten eventuelle Komplexbildungen zwischen TSPP und Ca^{2+} bzw. TSPP und Mg^{2+} unter den gegebenen experimentellen Voraussetzungen (pH, Temperatur) viel zu langsam. Auch Mg^{2+} beeinflusst aus diesem Grunde die Fluoreszenz von TSPP nicht.
- Der gemessene Einfluss von Fe^{3+} auf den Emissionsbereich um 645 nm ist in den vorliegenden In-vitro-Messungen deutlich schwächer (ca. 28 mal größere Dissoziationskonstante) als der von Cu^{2+} .

In der ICP-MS-Messung wird lediglich eine Eisen-Ausschüttung festgestellt, welche größenordnungsmäßig der von Kupfer entspricht (1,6 mal höher). Dieser Wert wird durch Rajan et al. (1976) bestätigt, demzufolge der Eisengehalt der synaptischen Vesikel maximal doppelt so hoch ist wie deren Kupfergehalt. Aufgrund der viel schwächeren Dissoziationskonstante ist ein Einfluss von Eisen auf unsere Messwerte also vernachlässigbar.

- Zn^{2+} (Ionenradius = 73 pm) passt ebenso wie Cu^{2+} in den Porphyrin-Ring (Abbildung 4.2) hinein. Es sorgt wahrscheinlich über eine Erhöhung der strukturellen Stabilität des TSPP zu einer Reduzierung der inneren Konversionsprozesse (s. Abbildung 3.1) und damit zu einer Fluoreszenzerhöhung.
- Cu^{2+} zeigt im Stern-Volmer-Plot (Abbildung 6.1) – oder gleichwertig in der Anpassung der Messergebnisse an Gleichung 14 mittels linearer Regression – eine hohe Linearität der einzelnen Datenpunkte ($r^2 = 0,94$). Dies deutet auf einen rein statischen oder dynamischen Quenchprozess. Das Quenchen durch Cu^{2+} entsteht durch seine paramagnetische Konfiguration ($[\text{Ar}]3d^9$), welche die Triplet-Übergänge im TSPP-Molekül ver-

stärkt („*Intersystem Crossing*“, s. Abbildung 3.1). Daher sind die Übergänge von Singulett- zu Grundzustand, also die Fluoreszenz, vermindert.

- Ein Einfluss von Cu^+ auf die Fluoreszenz von TSPP – wenn auch hier nicht direkt gemessen – kann aufgrund theoretischer Überlegungen recht sicher ausgeschlossen werden: Während Cu^{2+} mit einem Ionenradius von 73 pm gerade in den Ring eindringen kann, ist Cu^+ zu groß dafür (91 pm). Bestätigend zeigen Jimenez et al. (1991), dass durch einwertiges Kupfer das Absorptionsspektrum bei Komplexbildung mit Kupfer (Mischungsverhältnis 80:20 mit DMSO-Wasser) nur um 1 nm verschoben wird, das Absorptionsmaximum wandert von 414 nm auf 413 nm.

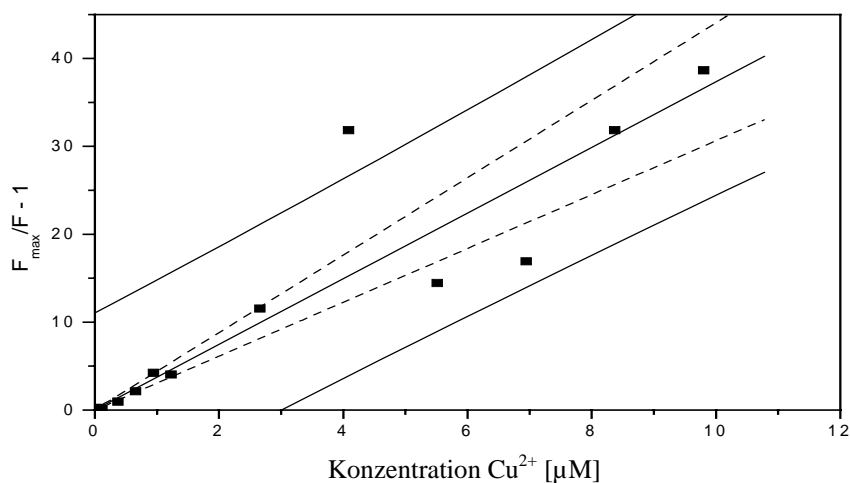


ABBILDUNG 6.1

STERN-VOLLMER-PLOT DER REAKTION VON TSPP MIT KUPFER (AUS DEN DATEN VON ABBILDUNG 5.6)

- c) Ungiftigkeit: Der Farbstoff scheint biologische Proben zumindest bei extrazellulärer Applikation nicht signifikant zu schädigen. Sowohl die Kalzium- als auch die Glutamat-Veränderungen bei Depolarisation von Synaptosomen bleiben bei Zugabe des Farbstoffs im Rahmen der verwendeten Konzentrationen gleich. Chromaffinzellen zeigen unter dem

Mikroskop nach längerer Exposition keine Schäden. Die geringe Toxizität wird durch die Ergebnisse von Streleckova et al. (1995) an Mäusen und Ratten bestätigt.

d) Mäßige Quanteneffizienz bzw. Fluoreszenzintensität: Die maximale Anregung erfolgt bei 414 nm, was relativ ungünstig ist, da nur wenige Laser in diesem Bereich des Spektrums arbeiten. Weiterhin führt die hohe Absorption des Farbstoffes zu einer großen Eigenabsorption (s. Abschnitt 3.1.1) und damit zu einer nur mäßigen Fluoreszenzintensität, was seine Anwendung in Mikroskopen limitiert. Die Experimente an unserem konfokalen Mikroskop (s. Abschnitt 5.3.3) zeigen jedoch, dass bei entsprechend optimal abgestimmten Komponenten (Tan et al., 1999; Hopt und Neher, 2001) seine Benutzung selbst bei der ungünstigeren Wellenlänge von 488 nm möglich ist.

Evt. können diese Probleme auch durch eine Zwei-Photonen-Anregung (Abbildung 3.1; Hopt und Neher, 2001) verbessert werden. Die Absorptionskoeffizienten – und damit der Einfluss der Eigenabsorption – weichen nämlich für Zwei-Photonen-Fluoreszenz im allgemeinen von denen der klassischen Ein-Photonen-Anregung ab (Denk et al., 1990). Außerdem wäre dann die Anregungswellenlänge in den Nahinfrarotbereich verschoben (um ca. 830 nm), für den sich leicht Anregungslichtquellen finden lassen (z.B. ein Ti:Saphir-Laser).

e) Membranimpermeabilität: Nach unseren Messungen ist TSPP nicht in der Lage, die Zellmembranen von Synaptosomen und bovinen Chromaffinzellen zu passieren. Demzufolge ist der Farbstoff sowohl extra- wie intrazellulär einsetzbar.

f) Schnelle Kinetik der Komplexbildung: Im Gegensatz zu einigen anderen Porphyrinen (Purrello et al., 1999) und auch zur Komplexbildung mit Zink ist die Reaktion von TSPP mit Kupfer recht zügig (Abbildung 5.10), was in der Literatur bestätigt wird (Turay et al., 1980).

g) Das Maximum der Fluoreszenz von TSPP liegt bei 645 nm, einem Wellenlängenbereich, der nur selten genutzt wird, so dass in Kombination mit anderen Farbstoffen parallele Mes-

sungen weiterer Parameter möglich sind. Speziell wird dieser Vorzug mit Fura-2 zur gleichzeitigen Messung von Kalzium erfolgreich genutzt.

- h) Detergentien wie Triton bewirken eine Verschiebung der Anregungswellenlänge von 420 nm nach 600-800 nm.
- i) Die Dissoziationskonstante bei Untersuchungen mit Kupfer pH-abhängig, ändert sich aber nicht signifikant in den für biologische Proben üblichen pH- (um 7,0) und Temperatur-Bereichen (20-40°C). Letzteres deutet darauf hin, dass das Quenchen mit Kupfer durch einen statischen Prozess entsteht, da man bei einem dynamischen Prozess eine Erhöhung der K_D bzw. der Stern-Vollmer-Konstante SV erwarten würde (Lakowicz, 1999). Der hier beobachtete Anstieg der Dissoziationskonstante bei Absinken des pH-Wertes unter 6,0 wird bei Jimenez et al. (1991) und Turay et al. (1980) bestätigt.

Phen Green strahlt mit deutlich höherer Fluoreszenzintensität und kann mit der Wellenlänge 488 nm, einer gängigen HeNe-Laserlinie, angeregt werden. Der Farbstoff reagiert zwar nicht auf Ca^{2+} oder Mg^{2+} , aber auf alle anderen getesteten Metallionen, ist also für eine separate Kupfermessung nicht geeignet. Vielleicht aber besitzt er für andere Zwecke, z.B. als grober Schwermetallionen-Indikator, vorteilhaftere Eigenschaften.

Die Fluoreszenz der getesteten Kalziumfarbstoffe wird durchweg von Kupfer beeinflusst. In dieser Genauigkeit liefert die vorliegende Arbeit erste Ergebnisse über den Einfluss von Metallionen wie Kupfer, Zink, Eisen, Kadmium und Kobalt auf die nicht-ratiometrisch verwendeten Kalziumfarbstoffe. Aussagen zu den gemessenen Bindungskonstanten sucht man in der Literatur vergebens.

Die erhaltenen Daten bezüglich der Kalziumfarbstoffe und deren Reaktion auf Kalzium decken sich weitgehend mit den Angaben der Literatur (Kao, 1994).

TSPP und evt. Phen Green könnten daher auch für die Korrektur von metallionenbedingten Fehlern bei Kalzium-Messungen wertvolle Dienste leisten.

6.2 Fluorimetrische Methode zur Messung der Konzentration von Kupfer in vivo

Die beschriebenen Messergebnisse zeigen, dass TSPP sich zur In-vivo-Messung bei sehr geringen Kupferkonzentrationen eignet (s. auch Hopt et al., 2003). Die limitierte Anwendung unter dem Mikroskop wird durch Verwendung des Spektrometers umgangen. Hier adiert sich die Ausschüttung der synaptischen Vesikel vieler Millionen von Nervenzellen in der Küvette, wodurch die Methode an Sensibilität und Genauigkeit noch zunimmt.

Die Annahme, dass tatsächlich eine durch Depolarisation ausgelöste Kupferausschüttung vorgelegen hat, stützt sich im wesentlichen auf folgende Ergebnisse:

- 1) Die Glutamat-Messungen lassen erkennen, dass eine Depolarisation mit KCl die Synaptosomen zur Exozytose veranlasst. Bestätigt wird dieser Umstand durch die Veränderungen der Kalziumkonzentration und die Erhöhung der Fluoreszenzintensität von FM 1-43.
- 2) TSPP zeigt eine signifikante Fluoreszenzverminderung bei gleicher Vorgehensweise zur Auslösung einer Depolarisation wie in 1).
- 3) Bei Verzicht der Zugabe von Kalzium vor der Depolarisation und Entzug evt. vorhandener Kalziumionen mittels EDTA zeigen weder der Indikator TSPP eine Fluoreszenzverminderung noch kann durch die Messungen aus 1) eine Exozytose ~~nachgewiesen werden~~ aus dem kalziumfreien, extrazellulären Medium kein Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle möglich, was aber Voraussetzung für eine Exozytose und damit für eine Kupfer- bzw. Glutamat-Ausschüttung wäre.
- 4) Blockiert man die Ausschüttung der Vesikel direkt mit Botulinus-Toxin, so ist ebenfalls keine Veränderung der Fluoreszenz von TSPP festzustellen.

- 5) Der bei der Depolarisation ausgeschüttete und mit TSPP nachgewiesene Stoff wird von Ca^{2+} -EGTA wieder abgezogen, da die Fluoreszenz durch dessen Zugabe auf das vor der Depolarisation vorgefundene Niveau zurückkehrt. Die Bindungskonstante von EGTA mit Kupfer ist um Größenordnungen niedriger (nach Martell & Hancock, 1996: $K_D = 10^{-38}$ M) als die von TSPP, weshalb es diese Ionen dem Farbstoff praktisch komplett zu entziehen imstande ist. Ein kupferspezifischer Komplexbildner konnte noch nicht ausfindig gemacht werden.
- 6) All diese Beobachtungen verweisen auf die Existenz eines Stoffes, der aus den synaptischen Vesikeln freigesetzt wird und der Bindung an EGTA wegen eher metallisch ist. Aufgrund der Überlegungen zu den In-vitro-Untersuchungen (Abschnitt 6.1) können für die Fluoreszenzänderung von TSPP bei 645 nm alle untersuchten und damit gleichzeitig die gängigsten Metalle im biologischen Gewebe bis auf Cu^{2+} ebenfalls ausgeschlossen werden. Für die Fluoreszenzänderung bei 605 nm kann aus demselben Grunde von den untersuchten Metallionen nur Zn^{2+} verantwortlich gemacht werden.

Mit der hier vorgestellten Methode kann also erstmals mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Ausschüttung von physiologisch vorhandenem Cu^{2+} in vivo nachgewiesen werden. Gewissheit bringt in diesem Zusammenhang letztlich aber erst die Kontrolle mit Hilfe der Massenspektroskopie (s. Abschnitt 6.3).

Für die Quantifizierung der Kupferausschüttung stellt sich noch die Frage, inwiefern TSPP auch das gesamte ausgeschüttete Kupfer nachzuweisen vermag. Hierzu müssen zwei Einschränkungen analysiert werden:

- In biologischem Gewebe wurden einige intrazelluläre Cu-Chaperone gefunden (z.B. Ccs, Cox 17), welche Kupfer im monovalenten Zustand binden. Durch die vielen Reduktasen im Zytosol können dort signifikante Mengen von Cu^+ entstehen, welche von TSPP aufgrund obiger Überlegungen nicht nachgewiesen werden können. Extrazellulär jedoch wer-

werden diese Ionen dann durch Kontakt mit Sauerstoff zu Cu^{2+} oxidiert (Frausto da Silva et al., 2001). Da nur Ausschüttungen gemessen werden, d.h. extrazelluläres Kupfer, kann man davon ausgehen, dass nur Cu^{2+} in unseren Messungen vorkommt. Dass TSPP auf das divalente Kupfer anspricht, folgt aus den obigen Überlegungen.

- Da Kupferionen in biologischen Proben hauptsächlich an Proteine gebunden vorliegen, stellt sich die Frage, wieviele der Ionen durch den Farbstoff überhaupt abgezogen werden können. Es existieren tatsächlich einige Proteine mit wesentlich niedrigeren Bindungskonstanten als derjenigen von TSPP. Trotzdem vermag TSPP noch einen großen Teil der Kupferionen nachzuweisen, da ...

1) ... die Bindungsproteine, welche den Hauptteil des Kupfers an sich binden und nachweislich wichtige Funktionen im Kupferstoffwechsel übernehmen, wie z.B. Coeruloplasmin (Wirth und Linder 1985; Loeffler et al., 1996), höhere oder dem TSPP ähnliche Dissoziationskonstanten im Bereich von $0,1 \mu\text{M}$ (Coeruloplasmin; Orena et al., 1986) bis $46 \mu\text{M}$ (Menke-Protein; Jensen et al., 1999) haben. Die Zahl an Proteinen mit niedrigeren Bindungskonstanten kann also nur gering sein, da sonst die biologische Funktion der obigen Bindungsproteine fraglich erschiene.

Insbesondere PrP hat mit $6,7 \mu\text{M}$ (Viles et al., 1999) gegenüber $0,43 \mu\text{M}$ eine mehr als 10 mal höhere K_D als TSPP und gibt daher praktisch alle gebundenen Kupferionen an den Farbstoff ab.

2) ... nach Abschnitt 3.4 auch das Verhältnis der Konzentrationen von TSPP und den konkurrierenden, kupferbindenden Proteinen eine Rolle für die Verteilung der Ionen spielt. Gleichung 18 lässt sich wie folgt ausdrücken:

$$\left(\frac{1}{f_{\text{Protein}}} - 1 \right) \cdot \frac{K_{\text{TSPP}}}{K_{\text{Protein}}} = \left(\frac{1}{f_{\text{Cu}}} - 1 \right)$$

$$\Leftrightarrow \left(\frac{m_{\text{Mengenverhältnis}}}{m_{\text{Entzug}}} \cdot \frac{1}{f_{\text{Protein}}} - 1 \right) \cdot \frac{K_{\text{TSPP}}}{K_{\text{Protein}}} = \left(\frac{1}{f_{\text{Cu}}} - 1 \right) \quad (\text{Gleichung 24})$$

$$\text{Dabei wird } f_{\text{Protein}} = \frac{[\text{Protein} - \text{Cu}]}{[\text{Protein}]_t} = \frac{m_{\text{Entzug}} \cdot [\text{TSPP} - \text{Cu}]}{m_{\text{Mengenverhältnis}} \cdot [\text{TSPP}]_t} = \frac{m_{\text{Entzug}}}{m_{\text{Mengenverhältnis}}} \cdot f_{\text{Cu}} \text{ ge-}$$

setzt.

$$m_{\text{Entzug}} = \frac{[\text{Protein} - \text{Cu}]}{[\text{TSPP} - \text{Cu}]} \text{ entspricht dem Kupferanteil, der sich dem Nachweis durch}$$

TSPP aufgrund der Anlagerung an Proteine entzieht, bezogen auf die Menge an Kupfer, die einen Komplex mit TSPP bildet. Diese Größe kann als Fehler angesehen werden, der durch die Proteinbindung von Kupfer entsteht. Bildet sich nämlich kein Kupfer-Protein-Komplex, so ist $m_{\text{Entzug}} = 0$, während bei vollständiger Bindung des Kupfers durch die Proteine $m_{\text{Entzug}} \rightarrow \infty$ geht.

$m_{\text{Mengenverhältnis}}$ drückt das Verhältnis der totalen Proteinkonzentration zur totalen Farbstoffkonzentration aus:

$$m_{\text{Mengenverhältnis}} = \frac{[\text{Protein}]_t}{[\text{TSPP}]_t}.$$

Nur die Proteine, welche aus den synaptischen Vesikeln ausgeschüttet werden, sowie die an den Membranen der Synaptosomen verankerten Proteine treten in Konkurrenz mit TSPP um die Bindung von Kupfer. Da das Volumen des Pellets (ca. 100 μl) sehr gering im Vergleich zum Volumen der Küvette (2 ml) ist, wird die Konzentration der Proteine bei Zugabe des Pellets in die Küvette stark verdünnt und $m_{\text{Mengenverhältnis}}$ nimmt wahrscheinlich einen sehr geringen Wert an ($m_{\text{Mengenverhältnis}} \ll 1$).

Definiert man noch $K \equiv K_{\text{TSPP}}/K_{\text{Protein}}$, so folgt aus Gleichung 24 für den Kupferanteil, der sich unserer Messung durch Proteinbindung entzieht:

$$\left(\frac{m_{\text{Mengenverhältnis}}}{m_{\text{Entzug}}} \cdot \frac{1}{f_{\text{Cu}}} - 1 \right) \cdot K = \left(\frac{1}{f_{\text{Cu}}} - 1 \right)$$

$$\Leftrightarrow m_{\text{Entzug}} = m_{\text{Mengenverhältnis}} \cdot \underbrace{\left[\frac{K}{f_{\text{Cu}} \cdot (K-1) + 1} \right]}_{\#} \quad (\text{Gleichung 25})$$

Da maximal alle Farbstoffmoleküle Kupferionen binden können, kann f_{Cu} maximal

$$\text{den Wert 1 annehmen: } f_{\text{Cu}} = \frac{[\text{TSPP} - \text{Cu}]}{[\text{TSPP}]_t} \leq 1.$$

Insbesondere bei ähnlichen Dissoziationskonstanten, d.h. $K \approx 1$, wird nach Gleichung 25 $m_{\text{Entzug}} \approx m_{\text{Mengenverhältnis}} \ll 1$, und es kann deshalb nur ein praktisch vernachlässigbarer Anteil m_{Entzug} des gesamten Kupfers an den Proteinen gebunden bleiben.

Wird allerdings K größer, weil die Dissoziationskonstante der Proteine viel niedriger ist als die des TSPP, steigt gleichzeitig m_{Entzug} , da infolge $f_{\text{Cu}} \leq 1$ der Nenner von # stets langsamer zunimmt als K .

Bei der Untersuchung mit TSPP zeigt sich in der Kupferausschüttung eine signifikante Abhängigkeit von der Prnp-Expression. Man sieht sehr schön, dass Mäuse, die kein PrP exprimieren ($\text{Prnp}^{0/0}$), oder solche, die das PrP ohne die kupferbindende Octarepeat-Sequenz exprimieren (C4), auch erniedrigte Kupferausschüttungen aufweisen, während höhere Werte nur bei Tg20 und WT zu finden sind. Die ca. vierfache Überexpression von PrP in Tg20-Mäusen scheint hingegen nicht notwendigerweise zu höherem Kupferrelease zu führen.

Hartter und Barnea (1988) haben zur Bestimmung von Kupfer-Ausschüttungen Zellen mit radioaktivem Kupfer ^{67}Cu geladen und hernach gemessen, wieviel aufgenommenes ^{67}Cu bei Depolarisation freigesetzt wird. Die hier vorgestellte Methode zur Bestimmung von Kupferkonzentrationen ist weitaus einfacher anzuwenden, so braucht man hier kein radioaktives ^{67}Cu und die Messwerte sind nicht von einem Transport- bzw. Aufnahme-Mechanismus abhängig. Insbesondere zeigt Brown (1999b, 2000a, 2002a), dass eine Aufnahme von Kupfer von der Expression des PrP abhängt. Im Gegensatz dazu misst man mit TSPP jedoch die in vivo freigesetzte und unbeeinflusste Menge an Kupfer, ohne vorheriges Laden der Synaptosomen.

6.3 Massenspektrometrische Überprüfung der Ausschüttung von Metallionen

Die alternative physikalische Methode der ICP-MS bestätigt qualitativ sowohl die gemessenen Kupfer-, wie auch die gemessenen Zink-Ausschüttungen.

Quantitative Abweichungen zu der Messung mit TSPP ergeben sich aus den Überlegungen in Abschnitt 6.2:

- Zum einen können noch ein bestimmter Anteil einwertiger Kupferionen ausgeschüttet werden, welche nicht durch TSPP, wohl aber durch die massenspektrometrische Analyse nachgewiesen werden können. Eine Unterscheidung zwischen ein- und zweiwertigen Ionen ist mit ICP-MS nicht möglich.
- Ebenfalls kann ein Anteil der Kupferionen auch an Proteine mit niedrigeren Bindungskonstanten als der von TSPP gebunden vorliegen. So entzieht sich ein Teil des Kupfers dem chemischen Gleichgewicht und damit dem Nachweis durch den Farbstoff. Da die ICP-MS auch gebundenes Kupfer messen kann, liegt der so ermittelte Wert zwangsläufig höher. Auch eine Unterscheidung zwischen gebundenem und nicht gebundenem Kupfer lässt sich mit ICP-MS nicht bewerkstelligen.

Das Verhältnis der ausgeschütteten Kupfermengen zwischen WT- und Prnp^{0/0}-Mäusen ist allerdings bei Messung mit ICP-MS und mit TSPP ähnlich.

Die Ausschüttung von Eisen kann nur massenspektrometrisch nachgewiesen werden, da sie nur wenig höher liegt als die von Kupfer, die K_D von TSPP mit Fe^{3+} aber 20 mal größer ist als diejenige mit Cu^{2+} .

Nicht berücksichtigt ist dabei, dass der Wert für freie, mit TSPP nachweisbare Eisenionen infolge der Bindungsproteine sogar noch wesentlich unter dem der ICP-MS liegen kann. Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Kupfer nämlich weisen die Haupttransportproteine für Eisen im Gehirn, Transferrin und Ferritin deutlich geringere Dissoziationskonstanten von 2-5

nM auf (Mash et al., 1990 und Hulet et al., 1999). Dadurch wird der Einfluss auf TSPP durch Eisenionen vernachlässigbar gering.

Während der Zinkrelease in der Literatur dokumentiert ist (z.B. Assaf und Chung, 1984), sind Angaben über Kupfer- und Eisen-Ausschüttungen bei Depolarisation von Synaptosomen nicht zu finden. Die Ausschüttung von Zink und Eisen hängen nach den vorliegenden Ergebnissen nicht von der Prnp-Expression ab; insofern beschränkt sich die weitere Analyse auf Kupfer.

Die Messung von Kupfer-Ausschüttungen mit ICP-MS bedarf ungefähr 2 mal mehr Synaptosomen als die fluorimetrische Analyse mit TSPP und ist außerdem wesentlich komplizierter durchzuführen. Während man für erstere Methode aufwendige Apparaturen braucht, kann man letztere in jedem laborüblichen Fluoreszenzspektrometer oder gar -mikroskop einsetzen. Vorteil der ICP-MS ist die Möglichkeit, mehr Elemente zu analysieren als nur Zn und Cu, sowie die Unabhängigkeit von Bindungsproteinen und Oxidationszuständen (wie oben dargelegt).

6.4 Messung der Exozytose

Die Exozytose wird auf dreierlei Arten gemessen: Mit Fura-2 gelingt nur ein indirekter Nachweis der Vesikelfreisetzung über die Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Während hiermit also der *Auslöser* der Ausschüttung, nämlich der Kalziumeinstrom, untersucht wird, weist die Messung der Freisetzung von Glutamat im Absorptionsphotometer und die der Metallionen mit TSPP das *Ergebnis* der Ausschüttung nach. Um die Vesikelfreisetzung aber *direkt* zu messen und vor allen Dingen zu quantifizieren, bedient sich diese Arbeit einer neuen Methode: Der Farbstoff FM 1-43 wurde bislang noch nicht für den Vergleich von Synaptosomen verschiedener Mausstränge herangezogen.

- 1) Die Messung der Glutamat-Ausschüttung ist eine Standard-Methode, die leider keine quantitativen Aussagen über die Exozytose zulässt. Festzustellen ist aber, dass die Signalverläufe bei den verschiedenen Maustypen nicht signifikant voneinander abweichen.
- 2) Die in Abschnitt 2.5.1 erwähnte verminderte Leitfähigkeit kalziumaktivierter Kaliumkanäle könnte durch eine veränderte intrazelluläre Kalziumkonzentration in Prnp^{0/0}-Mäusen entstehen. Besondere Erwähnung verdient daher der Vergleich der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in den Synaptosomen zwischen den verschiedenen Maustypen, der in dieser Arbeit erstmalig präsentiert wird. Nur Whatley (1995) hat bisher Ca²⁺ in Synaptosomen mit Fura-2 analysiert. Seine Messungen erschöpfen sich jedoch in der Darstellung des Unterschieds der intrazellulären Kalziumkonzentration bei externem Hinzufügen von humanem Prionprotein bzw. von ~~Ditrikop durchgeführte PrP~~ Untersuchungen ergeben eine basale, intrazelluläre Kalziumkonzentration von ca. 200-220 nM, welche in allen vier Maustypen (WT, Prnp^{0/0}, Tg20, C4) ungefähr gleich groß ist und sich mit den Literaturwerten von Wistar-Ratten aus anderen Studien deckt (Molina-Hernandez et al., 2001; Adamson et al., 1990; Martinez et al., 1988). Die Erhöhung der Konzentration bei Depolarisation in WT-Mäusen um den Faktor 1,2 im Vergleich zu Knockout- und C4-Mäusen erklärt sich wahrscheinlich durch die hohen Messfehler, insgesamt ist der Unterschied statistisch nicht signifikant. Eine Beeinflussung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen durch das PrP kann daher anhand dieser Ergebnisse nicht bestätigt werden.
- 3) Konform mit den Kalziummessungen liefert FM 1-43 den Beweis, dass kein signifikanter Unterschied in der Anzahl freigesetzter Vesikel bzw. dem freigesetzten Vesikelvolumen besteht. Man erhält eine durchschnittliche Membranvergrößerung von ca. 4 – 7 %.

Größenordnungsmäßig ergibt sich dieser Wert auch mit den Ergebnissen von Dunkley et al. (1988), sowie Dunkley et al. (1986). Sie erhalten durch Analyse elektronenmikroskopischer Bilder für den Durchmesser ähnlich präparierter Synaptosomen im Mittel $d_{\text{Synaptosom}} = 0,6 \mu\text{m}$. Ferner liest man aus deren Bildern die ungefähren Durchmesser der synaptischen Vesikel $d_{\text{Vesikel}} = 0,06 \mu\text{m}$, sowie eine Anzahl n_{Vesikel} von ca. 6 Vesikeln pro Synaptosom ab. Theoretisch errechnet sich damit nach Gleichung 20 eine Membranvergrößerung von

$$\begin{aligned}
 f_{FM} - 1 &= \frac{n_{\text{Vesikel}} \cdot O_{\text{Vesikel}}}{O_{\text{Synaptosom}}} \\
 &= \frac{n_{\text{Vesikel}} \cdot 4 \cdot \pi \cdot d_{\text{Vesikel}}^2}{4 \cdot \pi \cdot d_{\text{Synaptosom}}^2} && \text{(Gleichung 26)} \\
 &= n_{\text{Vesikel}} \cdot \left(\frac{d_{\text{Vesikel}}}{d_{\text{Synaptosom}}} \right)^2 \\
 &= 0,01 \cdot n_{\text{Vesikel}} \\
 &\approx 6 \%
 \end{aligned}$$

(O_{Vesikel} : durchschnittliche Oberfläche eines synaptischen Vesikels, $O_{\text{Synaptosom}}$: Oberfläche eines Synaptosoms, f_{FM} : Verhältnis der Fluoreszenzintensität von FM 1-43 nach bzw. vor Depolarisation). Dieses rein aus theoretischen Größen abgeschätzte Ergebnis deckt sich im Rahmen der Fehlergrenzen mit unseren Messungen.

6.5 Berechnung der Kupfer- und Zinkfreisetzung bei der Depolarisation

Die vorliegenden Ergebnisse bestärken die von Hartter und Barnea (1988) aufgestellte Hypothese einer Ausschüttung von Kupfer bei Depolarisation. Beide Autoren haben festgestellt, dass Synaptosomen über einen langsamen Kupferaufnahme-Mechanismus verfügen und über diesen aufgenommenes radioaktives Kupfer bei Depolarisation wieder freisetzen.

Die ermittelten Metallionenwerte lassen sich nur schwer in die vorliegenden Literaturangaben eingliedern, da sowohl die Präparationsmethoden als auch die untersuchten Spezies und insbesondere die Proteinbestimmungsmethoden erheblich voneinander abweichen. Gerade durch letztere Tatsache bezieht sich die Angabe „mg Protein“ auf verschiedene Mengen an Synaptosomen. Es wird in den Artikeln aber nicht angegeben, wieviel Proteinmenge bei der jeweils angewandten Methode einem Synaptosom entspricht (d.h. der Faktor $\rho_{\text{Synaptosom}}$ aus Gleichung 22 ist unbekannt). Tabelle 6.1 erfasst alle gefundenen Literaturwerte.

Angaben in ng / mg Protein	Kupfer	Zink	Eisen	Mangan
Brown et al., 1997a (Synaptosomen)	20	5	5	
Herms et al., 1999 (Synaptosomen)	39 ± 9			
Rajan et al., 1976 - Synaptosomen	460 ± 90	120 ± 20	510 ± 180	
- synaptische Vesikel (Hirnstamm)	180 ± 30	3260 ± 650	1790 ± 1080	
- synaptische Vesikel (Kortex)	850 ± 200	4630 ± 460	1410 ± 320	
Chan et al., 1983 (Kortex)	19,52 ± 1,86	62,31 ± 10,60	81 ± 10	1,548 ± 0,600
Kardos et al., 1990 (synaptische Vesikel)	0,5			
Colburn und Maas, 1965 (synaptische Vesikel)	2,0	1,05	1,7	
vorliegende Arbeit (Ausschüttung aus synaptischen Vesikeln, TSPP)	0,9 ± 0,1	20,1 ± 5,5		
vorliegende Arbeit (Ausschüttung aus synaptischen Vesikeln, ICP-MS)	3,9 ± 1,0	15,7 ± 5,8	6,4 ± 2,8	0,6 ± 0,2

TABELLE 6.1

VERGLEICH DER VERSCHIEDENEN LITERATURWERTE MIT DEN ERGEBNISSEN DER AUSSCHÜTTUNG VON WT-SYNAPTOSOMEN DIESER ARBEIT. DIE FEHLER – SOWEIT ANGEZEIGT – SIND IN DIE TABELLE EINGEFÜGT.

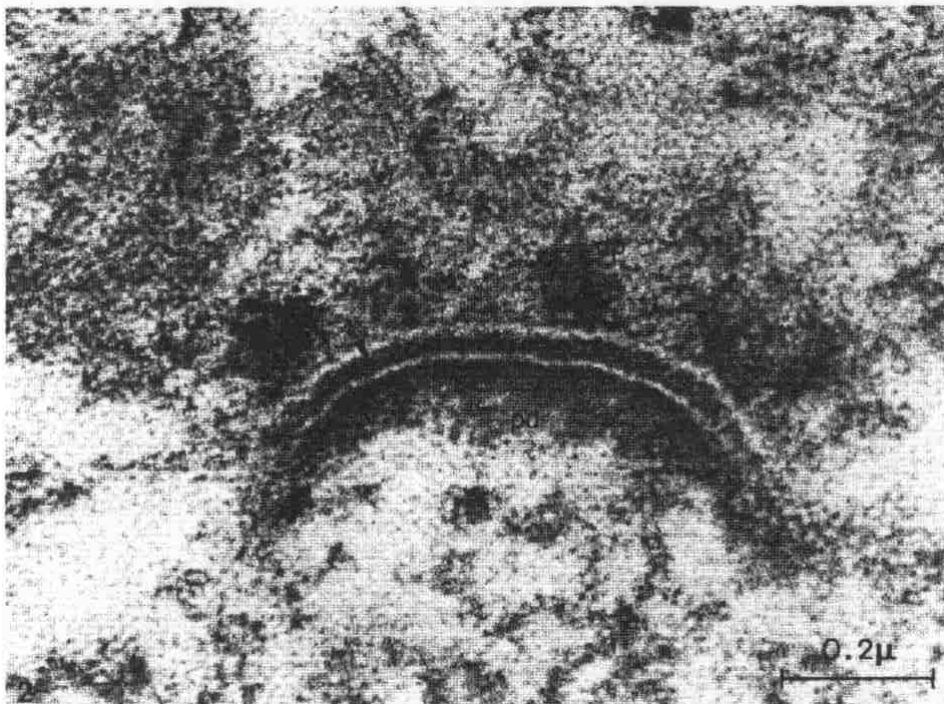
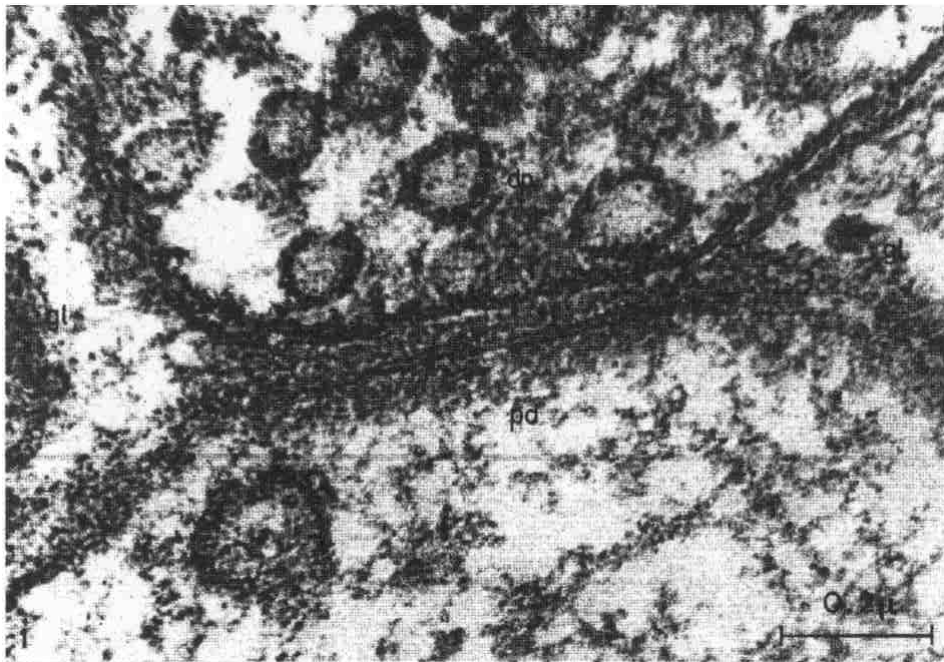


ABBILDUNG 6.2

ELEKTRONENMIKROKOPISCHES BILD VON SYNAPSEN NACH HAJÓS (1980). DIE SPALTBREITE WIRD MIT DURCHSCHNITTLICH 18 NM ANGEZEIGT.

Mit dem oben bestimmten Wert für den Anstieg der in der Küvette gemessenen Kupferkonzentration bei Erhöhung des Proteingehalts ξ_{Protein} (Abbildung 5.18) erhält man für die WT-Maus:

$$[\text{Cu}^{2+}] = 1,0 \pm 0,3 \cdot 10^{-5} \left[\frac{\text{mmol Cu}^{2+}}{\text{g Protein}} \right] \cdot \xi_{\text{Protein}} \quad (\text{Gleichung 27})$$

Bei konstantgehaltenen Proteinkonzentrationen wird mit TSPP eine Kupferausschüttung von $0,9 \pm 0,1 \text{ ng Cu}^{2+} / \text{mg Protein}$ bei der WT-Maus gemessen. Dies entspricht bei einem Atomgewicht von 63,546 u für Cu:

$$[\text{Cu}^{2+}] = 1,4 \pm 0,2 \cdot 10^{-5} \left[\frac{\text{mmol Cu}^{2+}}{\text{g Protein}} \right] \cdot \xi_{\text{Protein}} \quad (\text{Gleichung 28})$$

Dieser Wert ist etwas höher, aber genauer (geringere Standardabweichung), weil ungefähr vier mal mehr Datenpunkte auf diese Weise ausgewertet worden sind als für den Wert aus Gleichung 27. Innerhalb der Fehlergrenzen entsprechen sich die beiden Ergebnisse.

Über Gleichung 23,

$$[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Vesikel}} = \frac{\rho_{\text{Synaptosom}}}{\xi_{\text{Protein}}} \cdot \frac{[\text{Cu}^{2+}]}{(f_{\text{FM}} - 1)} \cdot \frac{1}{d_{\text{Synaptosom}}^2 \cdot d_{\text{Vesikel}} \cdot \frac{1}{6} \cdot \pi}, \quad (\text{Gleichung 29})$$

erhält man aus der Konzentration in der Küvette $[\text{Cu}^{2+}]$ die Konzentration in den synaptischen Vesikeln:

$$[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Vesikel}} = \frac{1,4 \pm 0,2 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mmol Cu}^{2+}}{\text{g Protein}} \cdot \rho_{\text{Synaptosom}}}{(f_{\text{FM}} - 1) \cdot d_{\text{Synaptosom}}^2 \cdot d_{\text{Vesikel}} \cdot \frac{1}{6} \cdot \pi} \quad (\text{Gleichung 30})$$

Aus den Daten von Dunkley et al. (1988) ergibt sich $d_{\text{Synaptosom}} = 0,6 \mu\text{m}$ und $d_{\text{Vesikel}} = 0,06 \mu\text{m}$ (s. Abschnitt 6.4), die Zunahme der Membranfläche bei Vesikelausschüttung liegt nach den Messungen mit FM 1-43 bei ca. $f_{\text{FM}} - 1 = 0,07 \pm 0,03$ für WT-, $0,04 \pm 0,01$ für Prnp^{0/0}-, $0,05 \pm 0,02$ für C4- und $0,04 \pm 0,02$ für Tg20-Mäuse. Im Durchschnitt liegt der Faktor $f_{\text{FM}} - 1$ also bei ca. 0,05.

$\rho_{\text{Synaptosom}}$ kann aus dem Volumen der Pellets abgeschätzt werden, welches ca. 100 μl beträgt:

Das Volumen $V_{\text{Synaptosom}}$ eines einzelnen Synaptosoms berechnet sich aus:

$$V_{\text{Synaptosom}} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{d_{\text{Synaptosom}}}{2} \right)^3 \approx 1,1 \cdot 10^{-10} \mu\text{l} \quad (\text{Gleichung 31})$$

Daher sind in einem Pellet ca. $n_{\text{Synaptosom}} = 100 \mu\text{l} / 1,1 \cdot 10^{-10} \mu\text{l} = 9,1 \cdot 10^{11}$ Synaptosomen, die einen Proteingehalt haben von 2,5 mg. Daraus folgt für unsere Präparationen ein Faktor von $\rho_{\text{Synaptosom}} = 2,5 \text{ mg} / 9,1 \cdot 10^{11} \text{ Synaptosomen} = 2,7 \cdot 10^{-15} \text{ g pro Synaptosom}$.

Da ein signifikanter Anteil des Pellet-Volumens auch aus Schmutz bestehen kann, wie z.B. Fragmente zerstörter Synaptosomen, wird die tatsächliche Anzahl eher kleiner sein. Auf elektronenmikroskopischen Bildern der Präparationen sieht man jedoch, dass die Pellets sehr rein sind und praktisch nur aus Synaptosomen bestehen. Außerdem werden die Schmutzanteile und der Raum zwischen den Synaptosomen durch den Zentrifugationsschritt auf ein Minimum zusammengepresst. Im Gegensatz dazu bleibt das Volumen intakter Synaptosomen selbst konstant, da die intrazelluläre Flüssigkeit inkompressibel ist. Man kann also davon ausgehen, dass der Schätzwert recht genau ist.

Alle der Literatur entnommenen und abgeschätzten Werte haben ungefähre relative Fehler von 5 – 10 %, wobei $\rho_{\text{synaptosome}}$ sicher die größte Fehlerquelle ist.

Insgesamt erhält man schließlich für WT-Mäuse mit Gleichung 23 als Konzentration in synaptischen Vesikeln $67 \pm 7 \mu\text{M Cu}^{2+}$ (bzw. 5 Ionen pro Vesikel) aus den TSPP-Messungen und $48 \pm 15 \mu\text{M}$ aus der linearen Regression in Abbildung 5.18.

In der Synapse entsteht nach Depolarisation – abhängig von der Menge n_{vesicle} an ausgeschütteten Vesikeln – eine Konzentration $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Synapse}}$ von

$$[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Synapse}} = \frac{[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Vesikel}} \cdot n_{\text{Vesikel}} \cdot V_{\text{Vesikel}}}{V_{\text{Synapse}}} = \frac{[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Vesikel}} \cdot n_{\text{Vesikel}} \cdot \frac{1}{6} \cdot \pi \cdot d_{\text{Vesikel}}^3}{V_{\text{Synapse}}} \quad (\text{Gleichung 32})$$

Für das Volumen einer Synapse V_{Synapse} gibt es unterschiedliche Schätzwerte. Nach Hajós et al. (1980, Abbildung 6.2) ist der synaptische Spalt ungefähr 18 nm breit, die Fläche ungefähr

$(0,8 \mu\text{m})^2$, was insgesamt auf ein Volumen $V_{\text{synapse}} = 18 \cdot 10^{-3} \cdot 0,8 \cdot 0,8 \mu\text{m}^3 = 0,012 \mu\text{m}^3$ schließen lässt. Das Volumen eines synaptischen Vesikels V_{Vesikel} berechnet man wieder aus $d_{\text{Vesikel}} = 0,06 \mu\text{m}$:

$$V_{\text{Vesikel}} = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot \left(\frac{d_{\text{Vesikel}}}{2} \right)^3 \approx 0,00011 \mu\text{m}^3 \approx 0,01 \cdot V_{\text{Synapse}} \quad (\text{Gleichung 33})$$

Nach den bisherigen Ergebnissen kommt man so auf eine Konzentration von

$$[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Synapse}} = 0,66 \pm 0,06 \mu\text{M} \cdot n_{\text{Vesikel}} \quad (\text{Gleichung 34})$$

Pro Synaptosom kann man nach unseren Messungen mit FM 1-43 von 5 ausgeschütteten Vesikeln pro Synaptosom ausgehen, woraus man eine Kupferkonzentration in der Synapse von $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Synapse}} \approx 3,3 \pm 0,4 \mu\text{M}$ (entsprechend 23 Ionen) bzw. mit den Werten der linearen Regression (Gleichung 27, Abbildung 5.18) $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{Synapse}} \approx 2,4 \pm 0,8 \mu\text{M}$ erhält.

Die ICP-MS erzielt bedingt durch die zusätzliche Messung der gebundenen Kupferionen etwa 4-5-fach höhere Werte. Bei der WT-Maus misst man mit ICP-MS eine Kupferausschüttung von $3,9 \pm 1,0 \text{ ng Cu / mg Protein}$ bzw.

$$[\text{Cu}] = 6,1 \pm 1,5 \cdot 10^{-5} \left[\frac{\text{mmol Cu}}{\text{g Protein}} \right] \cdot \xi_{\text{Protein}} \quad (\text{Gleichung 35})$$

Hieraus erhält man in analoger Weise wie oben für $[\text{Cu}]_{\text{vesicle}} \approx 291 \pm 75 \mu\text{M}$ und für $[\text{Cu}]_{\text{synapse}} \approx 14 \pm 4 \mu\text{M}$.

Kardos et al. (1990) schätzen die Konzentration von Kupfer in der Synapse nach Depolarisation auf ca. 100 – 250 μM . Dies ist bereits oberhalb der neurotoxischen Werte nach Brown et al. (1998d), der 50 % Zelltod bei viertägiger Inkubation von neuronalen Zellkulturen der WT-Maus mit 100 μM Kupfer fand. Bei $\text{Prnp}^{0/0}$ -Mäusen sterben sogar über 80 % der Zellen bei genannter Kupferkonzentration. Im Gegensatz dazu ist der hier bestimmte Wert 1-2 Größenordnungen niedriger. Dies ist wahrscheinlich bedingt durch die Tatsache, dass die Abschätzung von Kardos et al. (1990) auf Experimenten beruht, welche zunächst Zellen mit radioaktivem Kupfer laden, um hernach die Ausschüttung dieses radioaktiven Kupfers zu messen. Im

Vergleich dazu wird hier die Ausschüttung des physiologisch vorhandenen Kupfers bestimmt, dessen Menge offensichtlich viel niedriger liegt.

Herms et al. (1999) haben mit Atom-Absorptionsspektrometrie den insgesamt in Synaptosomen vorhandenen Gehalt an Kupfer bestimmt, indem sie auf die gleiche Weise präparierte synaptosomale Fraktionen von verschiedenen Maustypen (WT, Prnp^{0/0}, Tg20) ausgewertet haben. Sie finden einen totalen Gehalt von $39,9 \pm 9$ ng Cu / mg Protein, d.h. 61 ± 14 mmol Kupfer / g Protein. Multiplikation mit $\rho_{\text{Synaptosom}}$ ergibt eine Kupfermenge von $1,7 \pm 0,4 \cdot 10^{-15}$ μmol Cu in einem einzelnen Synaptosom und damit eine durchschnittliche Konzentration in diesem Synaptosom von $1,7 \pm 0,4 \cdot 10^{-15}$ $\mu\text{mol} / V_{\text{Synaptosom}} = 15,4 \pm 3,6$ μM . Dieser Wert umfasst wie die Ergebnisse der ICP-MS sowohl gebundenes wie ungebundenes Kupfer und liegt wesentlich niedriger als die mit ICP-MS bestimmte Konzentration in den synaptischen Vesikeln ($15,4 \pm 3,6$ im Vergleich zu 291 ± 75 μM Cu). Dies deutet darauf hin, dass es einen aktiven Transport für Kupfer in der Membran synaptischer Vesikel gibt, welcher die Kupferionen vor der Depolarisation in den Vesikeln konzentriert.

In ähnlicher Weise wie oben kann man die Daten der TSPP- und ICP-MS-Messung auch zur Bestimmung der Ausschüttung und synaptischen Konzentration von Zink verwenden. Hier sind die Unterschiede zwischen den beiden Methoden nicht so stark wie bei Kupfer ($20,1 \pm 5,5$ ng Zn / mg Protein mit TSPP und $15,7 \pm 5,8$ ng Zn / mg Protein mit ICP-MS). Sie sind sogar im Rahmen der Messfehler ungefähr gleich.

Dies mag zum einen daran liegen, dass Zink im Vergleich zu Kupfer nicht so stark gebunden vorliegt, so haben die üblichen zinkbindenden Proteine Dissoziationskonstanten von $K_D = 10^{-7}$ bis 10^{-3} M (Frederickson et al., 2000), so z.B. S100b mit $K_D = 10^{-7} - 10^{-6}$ M, Calmodulin mit $K_D = 8 \cdot 10^{-5} - 3 \cdot 10^{-4}$ (Baudier et al., 1983) und andere sogar im mM-Bereich (Kumar und Prasad, 1999). Vor allen Dingen aber findet man in biologischem Gewebe von Zink kein

einwertiges Ion, welches Unterschiede in der Messung zwischen TSPP und ICP-MS analog zu den Verhältnissen bei Cu^{2+} bzw. Cu^+ verursachen könnte.

Mit den gemessenen Werten findet man:

$$[\text{Zn}^{2+}] = 31 \pm 8 \cdot 10^{-5} \left[\frac{\text{mmol Zn}}{\text{g Protein}} \right] \cdot \xi_{\text{Protein}} \quad \text{bzw.} \quad [\text{Zn}] = 24 \pm 9 \cdot 10^{-5} \left[\frac{\text{mmol Zn}}{\text{g Protein}} \right] \cdot \xi_{\text{Protein}}$$

(Gleichung 36)

bei TSPP bzw. ICP-MS. Auf analoge Weise wie oben erhält man daraus eine Konzentration von $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{Vesikel}} = 1466 \pm 401 \mu\text{M}$ bzw. $[\text{Zn}]_{\text{Vesikel}} = 1146 \pm 425 \mu\text{M}$ in den synaptischen Vesikeln von WT-Mäusen, sowie eine Konzentration von $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{Synapse}} = 69 \pm 19 \mu\text{M}$ bzw. $[\text{Zn}]_{\text{Synapse}} = 54 \pm 20 \mu\text{M}$ im synaptischen Spalt. Nach Frederickson et al. (2000) beträgt die Konzentration von Zink im synaptischen Vesikel ca. 1000 – 1400 μM , die Werte werden also von der Literatur bestätigt.

6.6 Analyse der gemessenen Kupferwerte

Nach den vorliegenden Messungen ist die Anzahl der ausgeschütteten Vesikel zwischen den verschiedenen Transgenen ungefähr gleich hoch, besonders innerhalb einer Präparation. Nimmt man deshalb zusätzlich an, dass der Proteingehalt ungefähr proportional der Anzahl der Synaptosomen ist, so spiegelt die in unserer Küvette nach Exozytose gemessene Kupferkonzentration nach Gleichung 23 direkt die Konzentration an Cu^{2+} in den synaptischen Vesikeln wider. Die Messungen (Abbildung 5.18) verdeutlichen und bestätigen diesen theoretisch hergeleiteten Zusammenhang: Mit steigendem Proteingehalt, d.h. mit steigender Anzahl $n_{\text{synaptosme}}$ an Synaptosomen, nimmt gleichzeitig die Menge an ausgeschüttetem Kupfer bzw. die Kupferkonzentration in unserer Küvette nach Depolarisation proportional zu.

Ferner stellen die durchgeführten Experimente fest, dass die Menge an ausgeschüttetem Kupfer von der Menge an exprimiertem PrP^{C} abhängt, nicht aber dazu proportional ist. $\text{Prnp}^{0/0}$ -

Mäuse schütten ungefähr um die Hälfte bis $2/3$ weniger Kupfer aus als ihre WT-Äquivalente, während die PrP-überexprimierenden Tg20-Mäuse nicht auch automatisch mehr Kupfer freisetzen.

Auf der anderen Seite zeigen die Werte der C4-Mäuse, dass gerade die kupferbindende Domäne des PrP einen Einfluss auf das hier vorgestellte Ergebnis hat. Fehlt dem PrP die Octarepeat-Sequenz, so schütten die Synaptosomen ähnlich wenig Kupfer aus wie die Prnp^{0/0}-Mäuse.

Herms et al. (1999) finden in synaptosomalen Präparationen von Prnp^{0/0}-Mäusen einen um mehr als ein Drittel erniedrigten Gehalt an Kupfer im Vergleich zu WT-Äquivalenten (23 ± 6 ng im Vergleich zu 39 ± 9 ng Cu/mg Protein, s. Abbildung 6.3). Auch hier liegen die Werte der Tg20-Mäuse im Bereich der WT-Norm.

Da PrP^C spezifisch Cu²⁺ bindet (Brown et al., 1997a), könnte man den Unterschied durch das Fehlen jenes normalerweise bei WT-Neuronen an PrP^C gebunden vorliegende Kupfer erklären. Die durchschnittliche Anzahl der an Synaptosomen gebundenen PrP^C-Molekülen ist dazu jedoch um mindestens eine Zehnerpotenz zu niedrig (Herms et al., 1999). Außerdem spricht dagegen, dass die Kupferkonzentration in den PrP überexprimierenden Tg20-Transgenen nicht erhöht ist (Abbildung 6.3) und dass Waggoner et al. (2000) keine Unterschiede im Kupfergehalt synaptosomaler Membranen zwischen WT und Prnp^{0/0}-Mäusen feststellen konnten.

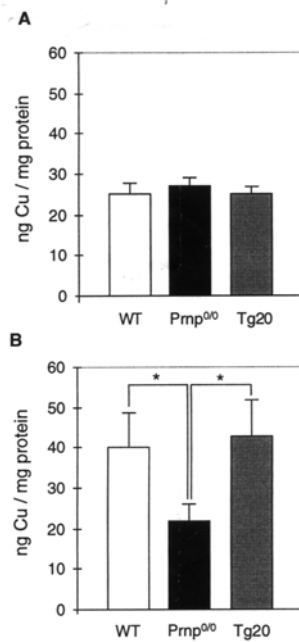


ABBILDUNG 6.3

GEHALT DER SYNAPTOSOMEN AN KUPFER. VERGLEICH VERSCHIEDENER TRANSGENE MITTELS ATOM-ABSORPTIONS-SPEKTROSKOPIE. AUS: HERMS ET AL. (1999).

Die Vesikel von Prnp^{0/0}-Mäusen haben also offensichtlich einen geringeren Kupfergehalt, möglicherweise als Folge eines reduzierten Kupfergehalts in den Synaptosomen insgesamt.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass der reduzierte Kupfergehalt des Prnp^{0/0}- bzw. C4-Maustyps eine direkte Folge des Fehlens von Prionprotein auf den präsynaptischen Membranen bzw. – genauer gesagt – von dessen kupferbindender Octarepeat-Region ist.

PrP^C könnte das bei normaler synaptischer Aktivität ausgeschüttete Kupfer binden und so dafür sorgen, dass dieses wichtige Ion nicht durch Diffusion oder Bindung an andere Proteine den Neuronen verloren geht. Durch das Einfangen kann ein Großteil des Cu²⁺ wieder in die Nervenzelle aufgenommen werden. Letzteren Vorgang beschreiben Pauly und Harris (1998). Hiernach begünstigt die Anwesenheit von Kupfer (200 µM) und etwas schwächer die von Zink (500 µM) die Endozytose selektiv von PrP. Co, Mn und Fe bewirken dagegen bei einer Konzentration von 500 µM keine solche Endozytose. Entfernt man das Kupfer, so ist der Prozess nach 15 min. reversibel. Außerdem wird der Effekt durch Abschneiden der N-terminalen,

kupferbindenden Region aufgehoben. Deletion der vier Octarepeats oder Mutation der Histidine His68 und His76 in den beiden zentralen Octarepeats verhindert den Effekt an menschlichen Neuroblastomzellen (Sumudhu et al., 2001). Brown (1999b, 2000a, 2002a) findet sogar eine vermehrte Aufnahme von Kupfer in WT-Mäusen im Vergleich zu Prnp^{0/0}-Mäusen.

Die Messungen sprechen für die Funktion des PrP^C als einem kupferspezifischen Carrier, der die für das Überleben der Zelle wichtige Homöostase (s. Abschnitt 2.5.3) aufrechterhält. Evt. ist PrP sogar ein Glied in dem von Hartter und Barnea (1988) und Kardos et al. (1990) postulierten Kupferaufnahmemechanismus in Synaptosomen.

Eine erhöhte Menge an exprimiertem PrP, wie z.B. bei den Tg20-Mäusen, hat zwar eine Erhöhung der Kapazität dieses Transporters zur Folge, aber wahrscheinlich verändert sich wegen der in Tg20- und WT-Mäusen gleichen Bindungskonstante K_{PrP} des PrP mit Kupfer die Menge an eingefangenen und damit wiederaufgenommenem Kupfer durch die Überexpression nicht. So erklären sich die ähnlichen synaptosomalen Werte der beiden Mausstypen bei Herms et al. (1999) und in der vorliegenden Arbeit.

Fehlt die kupferbindende Domäne, wie in C4- oder Prnp^{0/0}-Mäusen, erhöht sich die Dissoziationskonstante K_{PrP} drastisch bzw. die Carrier-Funktion ist vollständig aufgehoben. Die Zellen verarmen im Innern an dem Metall.

Alternativ zur hypothetischen Carrierfunktion könnte PrP^C allerdings auch nur eine Speicherfunktion übernehmen und das gebundene Kupfer an einen anderen Transporter mit niedrigerer Kapazität übergeben.

Die in der Einführung (Abschnitt 2.5.3) erwähnte Hypothese, durch fehlende Bindung des Kupfers an die Prionproteine entstehen hohe, neurotoxische Konzentrationen dieses Ions in den Synapsen (Brown, 1998d), kann mit den vorgestellten Experimenten nur schwer nachgeprüft werden, da TSPP dem PrP die Ionen entzieht. Festzustellen ist aber, dass die mit TSPP

nachgewiesenen, in die Synapse ausgeschütteten Mengen an Cu^{2+} unter den von Brown et al. (1998d) angegebenen schädlichen Bereichen liegen. Während die nach Abschnitt 6.5 berechneten Schätzungen für die synaptische Kupferkonzentration im mikromolaren Bereich liegen, zeigen die Experimente von Brown et al. (1998d) nur bei $100 \mu\text{M}$ neurotoxische Wirkungen. Ob unterhalb dieser Konzentration auch bereits toxische Effekte zu spüren sind, wird dort leider nicht untersucht.

Ob die kupferbindende Eigenschaft des PrP^{C} auch von pathophysiologischer Relevanz bei Prionerkrankungen ist, gilt es noch zu klären. Thackray et al. (2002) und Wong et al. (2001a) finden z.B. eine Abnahme der Kupferkonzentration des Hirns im Verlauf der Erkrankung bei Scrapie-infizierten Mäusen und CJD-Patienten, bei Ausbruch der Krankheit wird das Minimum der Kupferkonzentration erreicht. Wadsworth et al. (1999) beschreiben ferner, dass die oben genannten typenspezifischen Konformationen von PrP^{Sc} von einer Kupferbindung beeinflusst werden. Außerdem wurden von Priola et al. (1999, 2000), White et al. (1999) und Caughey et al. (1998) Porphyrine gefunden, die dem TSPP sehr ähnlich sind und den Zeitverlauf der Krankheit bei mit Scrapie infizierten Mäusen signifikant verändern. Die Autoren vermuten, dass dieser Effekt durch eine direkte Interaktion zwischen den Porphyrinen und dem PrP^{Sc} -Molekül entsteht. Er könnte aber auch indirekt durch deren Fähigkeit hervorgerufen werden, Kupfer zu binden. Weitere Untersuchungen mit TSPP und / oder ICP-MS könnten hier in Zukunft Klarheit verschaffen.

7. Literatur

1. Abbott NJ, Mitchell G, Ward KJ, Abdullah F, Smith IC. An electrophysiological method for measuring the potassium permeability of the nerve perineurium. *Brain Res.* 1997; 776(1-2):204-13.
2. Adamson P, Hajimohammadreza I, Brammer MJ, Campbell IC, Meldrum BS. Pre-synaptic glutamate/quisqualate receptor: Effects on synaptosomal free calcium concentrations. *J Neurochem* 1990; 55:1850-4.
3. Aguzzi A, Heikenwalder M. Prion diseases: Cannibals and garbage piles. *Nature* 2003; 423(6936):127-9.
4. Aguzzi A, Heppner FL. Pathogenesis of prion diseases: a progress report. *Cell Death Differ.* 2000; 7(10):889-902.
5. Aguzzi A, Weissmann C. Prion diseases. *Haemophilia.* 1998a; 4(4):619-27.
6. Aguzzi A. Protein conformation dictates prion strain. *Nat Med.* 1998b; 4(10):1125-6.
7. Aguzzi A, Weissmann C. Prion research: the next frontiers. *Nature* 1997; 389:795-798.
8. Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid ? *Nature* 1967; 214:764-766.
9. Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse ME, Watt CJ, Udy HJ, MaWhinney S, Dunstan SP, Southwood TR, Wilesmith JW, Ryan JB, Hoinville LJ, Hillerton JE, Austin AR, Wells GA. Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 1996; 382:779-788.
10. Assaf SY, Chung SH. Release of endogenous Zn^{2+} from brain tissue during activity. *Nature* 1984; 308:734-736.

11. Atluri PP, Regehr WG. Determinants of the time course of facilitation at the granule cell to Purkinje cell synapse. *The Journal of Neuroscience* 1996; 16:5661-5671.
12. Baudier J, Haglid K, Haiech J, Gerard D. Zinc ion binding to human brain calcium binding proteins, calmodulin and S100b protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;114:1138-46.
13. Behrens A, Aguzzi A. Small is not beautiful: antagonizing functions for the prion protein PrP^C and its homologue Dpl. *Trends Neurosci.* 2002 Mar; 25(3):150-4.
14. Behrens A, Brandner S, Genoud N, Aguzzi A. Normal neurogenesis and scrapie pathogenesis in neural grafts lacking the prion protein homologue Doppel. *EMBO Rep.* 2001; 2(4):347-52.
15. Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY, Kascsak RJ, Cashman NR, Bolton DC. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology.* 1992; 42(1):149-56.
16. Biesaga M, Pyrzynska, K., Trojanowicz, M. Porphyrins in analytical chemistry. A review. *Talanta* 2000; 51:209-24.
17. Billeter M, Riek R, Wider G, Hornemann S, Glockshuber R, Wuthrich K. Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(14):7281-5.
18. Bleich S, Kropp S, Degner D, Zerr I, Pilz J, Gleiter CH, Otto M, Ruther E, Kretschmar HA, Wiltfang J, Kornhuber J, Poser S. Creutzfeldt-Jakob disease and oxidative stress. *Acta Neurol Scand.* 2000; 101(5):332-4.
19. Borchelt DR, Koliatsos VE, Guarnieri M, Pardo CA, Sisodia SS, Price DL. Rapid anterograde axonal transport of the cellular prion glycoprotein in the peripheral and central nervous systems. *J Biol Chem.* 1994; 269(20):14711-4.

20. Borchelt DR, Rogers M, Stahl N, Telling G, Prusiner SB. Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology* 1993; 3(4):319-29.
21. Brandner S, Klein MA, Frigg R, Pekarik V, Parizek P, Raeber A, Glatzel M, Schwarz P, Rulicke T, Weissmann C, Aguzzi A. Neuroinvasion of prions: insights from mouse models. *Exp Physiol*. 2000; 85(6):705-12.
22. Brandner S, Raeber A, Sailer A, Blattler T, Fischer M, Weissmann C, Aguzzi A. Normal host prion protein (PrP^C) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996a; 93(23):13148-51.
23. Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y, Marino S, Weissmann C, Aguzzi A. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature*. 1996b; 379(6563):339-43.
24. Brenner HR, Herczeg A, Oesch B. Normal development of nerve-muscle synapses in mice lacking the prion protein gene. *Proc Roy Soc Lond* 1992; 250:151-156.
25. Brown DR. Copper and prion diseases. *Biochem Soc Trans*. 2002a; 30(4):742-5.
26. Brown DR, Sassoon J. Copper-dependent functions for the prion protein. *Mol Biotechnol*. 2002b; 22(2):165-78.
27. Brown DR, Clive C, Haswell SJ. Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *J Neurochem*. 2001a; 76(1):69-76.
28. Brown DR. Copper and prion disease. *Brain Res Bull*. 2001b; 55(2):165-73.
29. Brown DR. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci*. 2001c; 24(2):85-90.
30. Brown DR. PrP^{Sc}-like prion protein peptide inhibits the function of cellular prion protein. *Biochem J*. 2000a; 352 Pt 2:511-8.

31. Brown DR, Hafiz F, Glasssmith LL, Wong BS, Jones IM, Clive C, Haswell SJ. Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance. *EMBO J.* 2000b; 19(6):1180-6.
32. Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J.* 1999a; 344 Pt 1:1-5.
33. Brown DR. Prion protein expression aids cellular uptake and veratridine-induced release of copper. *J Neurosci Res.* 1999b; 58(5):717-25.
34. Brown DR. Prion protein-overexpressing cells show altered response to a neurotoxic prion protein peptide. *J Neurosci Res.* 1998a; 54(3):331-40.
35. Brown DR, Besinger A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J.* 1998b; 334 Pt 2:423-9.
36. Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. A prion protein fragment primes type 1 astrocytes to proliferation signals from microglia. *Neurobiol Dis.* 1998c; 4(6):410-22.
37. Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia. *J. of Neurochemistry* 1998d; 70:1686-93.
38. Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. Prion protein fragment interacts with PrP-deficient cells. *J Neurosci Res.* 1998e; 52(3):260-7.
39. Brown DR, Besinger A, Herms JW, Kretzschmar HA. Microglial expression of the prion protein, *Neuroreport* 1998f; 9:1425-1431.
40. Brown DR, Schmidt B, Groschup MH, Kretzschmar HA. Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment. *Eur J Cell Biol.* 1998g; 75(1):29-37.
41. Brown DR, Qin K, Herms J, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser P, Kruck T, Av. Schulz-Schaeffer WJ, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 1997a; 390:684-7.

42. Brown DR, Schulz-Schaeffer WJ, Schmidt B, Kretzschmar HA. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol* 1997b; 146:104-112.
43. Brown DR, Kretzschmar HA. Microglia and prion disease: a review. *Histol Histopathol.* 1997c; 12(3):883-92.
44. Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells. *Int J Dev Neurosci.* 1997d; 15(8):961-72.
45. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997; 389:498-501.
46. Bruns D, Engers S, Yang C, Ossig R, Jeromin A, Jahn R. Inhibition of transmitter release correlates with proteolytic activity of tetanus toxin and botulinus toxin in individual cultured synapses of *Hirudo medicinalis*. *J Neurosci* 1997; 17:1898-910.
47. Budde T, Minta A, White JA, Kay AR. Imaging Free Zinc In Synaptic Terminals In Live Hippocampal Slices. *Neuroscience* 1997; 79(2):347-358.
48. Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 1992; 356:577-582.
49. Bush AI. Metals and neuroscience. *Curr Opin in Chem Biol* 2000; 4:184-91.
50. Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC, Bendheim PE. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell.* 1990; 61(1):185-92.
51. Caughey WS, Raymond LD, Horiuchi M, Caughey B. Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(21):12117-22.

52. Caughey B, Raymond GJ. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem.* 1991; 266(27):18217-23.
53. Chan AW, Minski MJ, Lai JC. An application of neuron activation analysis to small biological samples: simultaneous determination of thirty elements in rat brain regions. *Journal of Neuroscience Methods* 1983; 7:317-28.
54. Chavez-Crooker P, Garrido N, Ahearn GA. Copper transport by lobster hepatopancreatic epithelial cells separated by centrifugal elutriation: measurements with the fluorescent dye Phen Green. *J Exp Biol.* 2001; 204 Pt 8:1433-44.
55. Chishti MA, Strome R, Carlson GA, Westaway D. Syrian hamster prion protein is expressed in photoreceptor cells of the adult retina. *Neurosci Lett* 1997; 234:11-14.
56. Colburn RW, Maas JW. Adenosine triphosphate--metal--norepinephrine ternary complexes and catecholamine binding. *Nature* 1965; 208(5):37-41.
57. Colling SB, Collinge J, Jefferys JG. Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca(2+)-activated K⁺ currents. *Neurosci Lett.* 1996; 209(1):49-52.
58. Collinge J. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24:519-50.
59. Collinge J. Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet.* 1999; 354(9175):317-23.
60. Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 1994; 370:295-297.
61. Comfort A. Physiology, homeostasis and ageing. *Gerontologia* 1968; 14(4):224-232.
62. Comincini S, Foti MG, Tranulis MA, Hills D, Di Guardo G, Vaccari G, Williams JL, Harbitz I, Ferretti L. Genomic organization, comparative analysis, and genetic polymorphisms of the bovine and ovine prion Doppel genes (PRND). *Mamm Genome.* 2001; 12(9):729-33.

63. Creutzfeldt HG. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol Psychiatr* 1920; 57:1-18.
64. Cui T, Holme A, Sassoon J, Brown DR. Analysis of doppel protein toxicity. *Mol Cell Neurosci.* 2003; 23(1):144-55.
65. DeArmond SJ, Mobley WC, DeMott DL, Barry RA, Beckstead JH, Prusiner SB. Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology.* 1998; 50(1):1271-80; discussion 2.
66. DeArmond SJ, Mobley WC, DeMott DL, Barry RA, Beckstead JH, Prusiner SB. Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology* 1987; 37:1271-1280.
67. Del Rio E, Nicholls DG, Downes CP. Involvement of calcium influx in muscarinic cholinergic regulation of phospholipase C in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1994; 63(2):535-43.
68. Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 1990; 248(4951):73-6.
69. DiDonato M, Sarkar B. Copper transport and its alterations in Menkes and Wilson diseases. *Biochem Biophys Acta* 1997; 1360:3-16.
70. Dodelet VC, Cashman NR. Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood.* 1998; 91(5):1556-61.
71. Donnelly CA, Ghani AC, Ferguson NM, Anderson RM. Recent trends in the BSE epidemic. *Nature* 1997; 389:903.
72. Doreulee N, Yanovsky Y, Haas HL. Suppression of long-term potentiation in hippocampal slices by copper. *Hippocampus* 1997; 7:666-669.
73. Duchen MR, Biscoe TJ. Mitochondrial function in type I cells isolated from rabbit arterial chemoreceptors. *J Physiol* 1992; 450:13-31.

74. Dunkley PR, Heath JW, Harrison SM, Jarvie PE, Glenfield PJ, Rostas JAP. A rapid Percoll gradient procedure for isolation of synaptosomes directly from an S1-fraction: homogeneity and morphology of subcellular fractions. *Brain Res* 1988; 441:59-71.
75. Dunkley PR, Jarvie PE, Heath JW, Kidd GJ, Rostas JAP. A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradient. *Brain Res* 1986; 372:115-29.
76. Edenhofer F, Rieger R, Famulok M, Wendler W, Weiss S, Winnacker EL. Prion protein PrP^C interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J Virol* 1996; 70:4724-4728.
77. Eigen M. Prionics or The kinetic basis of prion diseases. *Biophysical Chemistry* 1996; 63:A1-A18.
78. Falk, JE. *Porphyryns and Metalloporphyryns*. New York, 1975: Elsevier.
79. Farquhar CF, Somerville RA, Bruce ME. Straining the prion hypothesis. *Nature* 1998; 391:345-346.
80. Fiedorowicz M, Galindo JR, Julliard M, Mannoni P, Chanon M. Efficient photodynamic action of Victoria blue BO against the human leukemic cell lines K-562 and TF-1. *Photochemistry and Photobiology* 1993; 58(3):356-361.
81. Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B, Brandner S, Aguzzi A, Weissmann C. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* 1996; 15(6):1255-64.
82. Flechsig E, Shmerling D, Hegyi I, Raeber AJ, Fischer M, Cozzio A, von Mering C, Aguzzi A, Weissmann C. Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron* 2000; 27(2):399-408.
83. Fournier JG, Escaig-Haye F, Grigoriev V. Ultrastructural localization of prion proteins: physiological and pathological implications. *Microsc Res Tech.* 2000; 50:76-88.

84. Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O. Ultrastructural Localization of cellular prion protein (PrP^C) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C R Acad Sci Paris, Sciences de la ve* 1995; 318:339-344.
85. Frausto da Silva JJR, Willimas RJP. *The Biological Chemistry of the Elements*. Oxford, 2001:Oxford University Press, 418-436.
86. Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB. Importance of Zinc in the Central Nervous System: The Zinc-Containing Neuron. *J Nutr* 2000; 130:1471S-3S.
87. Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:9097-101.
88. Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 1966; 209:794-6.
89. Garnett AP, Viles JH. Copper binding to the octarepeats of the prion protein. Affinity, specificity, folding and cooperativity; insights from circular dichroism. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:6795-802.
90. Giese A, Kretzschmar HA. Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2001; 253:203-17.
91. Giese A, Brown DR, Groschup MH, Feldmann C, Haist I, Kretzschmar HA. Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol.* 1998; 8(3):449-57.
92. Graham D, Lantos P. *Greenfields Neuropathology*. London, 1996: Arnold.
93. Griffith JS. Self-replication and scrapie. *Nature* 1967; 215:1043-4.
94. Groschup MH, Harmeyer S, Pfaff E. Antigenic features of prion proteins of sheep and of other mammalian species. *J Immunol Methods.* 1997; 207(1):89-101.
95. Groschup MH, Langeveld J, Pfaff E. The major species specific epitope in prion proteins of ruminants. *Arch Virol* 1994; 136:423-431.

96. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260:3440-50.
97. Gutteridge JM, Halliwell B. The role of superoxide and hydroxyl radicals in the degradation of DNA and deoxyribose induced by a copper-phenanthroline-complex. *Biochemical Pharmacology* 1982; 31(17):2801-05.
98. Hadlow WJ. Scrapie and kuru. *Lancet* 1959; 2:289-90.
99. Hajós F. The Structure of Cleft Material in Spine Synapses of Rat Cerebral and Cerebellar Cortices. *Cell Tissue Res.* 1980; 206:477-86
100. Harris DA, Falls DL, Johnson FA, Fischbach GD. A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991; 88(17):7664-8.
101. Hartmann HA, Evenson MA. Deficiency of copper can cause neuronal degeneration. *Med Hypotheses.* 1992; 38(1):75-85.
102. Hartter DE, Barnea A. Evidence for release of copper in the brain: depolarisation-induced release of newly taken-up ⁶⁷copper. *Synapse* 1988; 2:412-5.
103. Haughland RP. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals.* Leiden: Molecular Probes, 1996.
104. Herms JW, Tings T, Dunker S, Kretzschmar HA. Prion protein affects Ca²⁺-activated K⁺ currents in cerebellar purkinje cells. *Neurobiol Dis.* 2001; 8(2):324-30.
105. Herms JW, Korte S, Gall S, Schneider I, Dunker S, Kretzschmar H. Altered intracellular homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein-deficient mice. *J Neurochem* 2000; 75:1487-92.
106. Herms J, Tings T, Madlung A, Gall S, Schürmann P, Giese A, Siebert H, Windl O, Brose N, Kretzschmar HA. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* 1999; 15:8866-75.

107. Herms JW, Gall S, Tings T, Dunker S, Kretzschmar HA. Pathophysiological consequences of the loss of copper binding ability of Prnp^{0/0} mice at the neuronal membrane. *J Neuropathol* 1998a; 17:254.
108. Herms JW, Tings T, Dunker S, Kretzschmar HA. Prion protein modulates calcium activated potassium currents in cerebellar Purkinje cells. *Soc Neurosci Abstr* 1998b; 24.
109. Herms JW, Tings T, Madlung A, Gall S, Schürmann P, Giese A, Siebert, Windl O, Brose, Kretzschmar HA. The prion protein is predominantly localized in presynaptic membranes. *Neurobiol of Aging* 1998c; 19:299.
110. Herms JW, Madlung A, Brown DR, Kretzschmar HA. Increase of intracellular free Ca²⁺ in microglia activated by prion protein fragment. *Glia*. 1997; 21(2):253-7.
111. Herms JW, Kretzschmar HA, Titz S, Keller BU. Patch-Clamp Analysis of Synaptic Transmission to Cerebellar Purkinje Cells of Prion Protein Knockout Mice. *European Journal of Neuroscience* 1995; 7:2508-12.
112. Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, Duman RS, Nestler EJ. Induction of a Long-lasting AP-1 Complex Composed of Altered Fos-like Proteins In Brain by Chronic Cocaine and Other Chronic Treatments. *Neuron* 1994; 12:1235-44.
113. Hoppe W, Lohmann W, Markl H. *Biophysik*. Heidelberg, 1982:Springer.
114. Hopt A, Korte S, Fink H, Panne U, Niessner R, Jahn R, Kretzschmar H, Herms J. Methods for studying synaptosomal copper release. *J Neuroscience Methods* 2003; 128(1-2):159-72.
115. Hopt A, Neher E. Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy. *Biophys J*. 2001; 80(4):2029-36.

116. Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM, Lakey JH. Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: Structural studies using synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 1995a; 214:993-999.
117. Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM. Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995b; 207(2):621-9.
118. Howell GA, Welch MG, Frederickson CJ. Stimulation-induced uptake and release of zinc in hippocampal slices. *Nature* 1998; 308:736-738.
119. Hsiao K, Prusiner SB. Inherited human prion diseases. *Neurology*. 1990a; 40(12):1820-7.
120. Hsiao KK, Scott M, Foster D, Groth DF, DeArmond SJ, Prusiner SB. Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science*. 1990b; 250(4987):1587-90.
121. Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J, Prusiner SB. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*. 1989; 338(6213):342-5.
122. Hulet SW, Hess EJ, Debinski W, Arosio P, Bruce K, Powers S, Connor JR. Characterization and distribution of ferritin binding sites in the adult mouse brain. *J Neurochem* 1999; 72(2):868-874.
123. Huttner WB, Schiebler W, Greengard P, De Camilli P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *J Cell Biol* 1983; 96:1374-1388.
124. Igarashi S, Yotsuyanagi T. *Analytica Chimica Acta* 1993; 281:347-351.
125. Ikeda K, Kawada N, Wang YQ, Kadoya H, Nakatani K, Sato M, Kaneda K. Expression of cellular prion protein in activated hepatic stellate cells. *Am J Pathol* 1998; 153:1695-1700.

126. Jackson GS, Murray I, Hosszu LL, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001a; 98(15):8531-5.
127. Jackson GS, Collinge J. The molecular pathology of CJD: old and new variants. *Mol Pathol*. 2001b; 54(6):393-9.
128. Jakob A. Spastische Pseudosklerose. In: Jakob A. Die extrapyramidalen Erkrankungen. Berlin, 1923: Springer.
129. Jakob A. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch Z Nervenheilkd* 1921; 70:132-146.
130. Jefferys JG, Empson RM, Whittington MA, Prusiner SB. Scrapie infection of transgenic mice leads to network and intrinsic dysfunction of cortical and hippocampal neurones. *Neurobiol Dis*. 1994; 1(1-2):25-30.
131. Jensen PY, Bonander N, Horn N, Tumer Z, Farver O. Expression, purification and copper-binding studies of the first metal-binding domain of Menkes protein. *Eur J Biochem* 1999; 264:890-6.
132. Jimenez HR, Julve M, Faus J. A solution study of the protonation and deprotonation equilibria of 5,10,15,20-tetra(p-sulphonatophenyl)porphyrin. Stability constants of its magnesium(II), copper(II) and zinc(II) complexes. *J Chem Soc Dalton Trans* 1991; 8:1945-9.
133. Johnston AR, Fraser JR, Jeffrey M, MacLeod N. Synaptic plasticity in the CA1 area of the hippocampus of scrapie-infected mice, *Neurobiol Dis*. 1998; 5(3):188-95.
134. Johnston AR, Black C, Fraser J, MacLeod N. Scrapie infection alters the membrane and synaptic properties of mouse hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol*. 1997; 500:1-15.

135. Kannenberg K, Groschup MH, Sigel E. Cellular prion protein and GABAA receptors: no physical association? *Neuroreport* 1995; 7:77-80.
136. Kao JP. *Methods in Cell Biology*. New York, 1994: Academic Press.
137. Kardos J, Kovács I, Hajós F, Kálmán M, Simonyi M. Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability. *Neurosci Lett* 1990; 103:139-44.
138. Kimberlin RH, Millson GC, Bountiff L, Collis SC. A comparison of the biochemical changes induced in mouse brain cuprizone toxicity and by scrapie infection. *J Comp Pathol*. 1974; 84(2):263-70.
139. Kitamoto T, Doh-ura K, Muramoto T, Miyazono M, Tateishi J. The primary structure of the prion protein influences the distribution of abnormal prion protein in the central nervous system. *Am J Pathol*. 1992a; 141(2):271-7.
140. Kitamoto T, Shin RW, Doh-ura K, Tomokane N, Miyazono M, Muramoto T, Tateishi J. Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol*. 1992b; 140(6):1285-94.
141. Kramer ML, Kratzin HD, Schmidt B, Romer A, Windl O, Liemann S, Hornemann S, Kretzschmar H. Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J Biol Chem*. 2001; 276(20):16711-9.
142. Krasemann S, Groschup MH, Harmeyer S, Hunsmann G, Bodemer W. Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in Prnp^{0/0} mice. *Mol Medicine* 1996; 2:725-734.
143. Kretzschmar HA, Feiden W. Prionkrankheiten des Menschen. *Der Pathologe* 2002a; 23:241-51.
144. Kretzschmar HA, Lederer RM. Prionkrankheiten. *Ernährungs-Umschau* 2002b; 6:216-22

145. Kretzschmar HA. BSE und die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. Dt Ärzteblatt 2001; 98(40):A2576-83
146. Kretzschmar HA, Tings T, Madlung A, Giese A, Herms J. Function of PrP^C as a copper-binding protein at the synapse. Arch Virol Suppl. 2000; 16:239-49.
147. Kretzschmar HA. Molecular pathogenesis of prion diseases. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci. 1999; 249 Suppl 3:56-63.
148. Kretzschmar H, Giese A, Zerr I, Windl O, Schulz-Schaeffer W, Skworc K, Poser S. The German FFI cases. Brain Pathol. 1998a; 8(3):559-61.
149. Kretzschmar H. Transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases)--molecular principles and in vitro models. Wien Med Wochenschr. 1998b; 148(4):67-73.
150. Kretzschmar HA, Giese A, Brown DR, Herms J, Keller B, Schmidt B, Groschup M. Cell death in prion disease. J Neural Transm Suppl. 1997; 50:191-210.
151. Kretzschmar HA, Neumann M, Stavrou D. Codon 178 mutation of the human prion protein gene in a German family (Backer family): sequencing data from 72-year-old celloidin-embedded brain tissue. Acta Neuropathol (Berl). 1995; 89(1):96-8.
152. Kretzschmar HA. Neuropathology of human prion diseases (spongiform encephalopathies). Dev Biol Stand. 1993a; 80:71-90.
153. Kretzschmar HA. Human prion diseases (spongiform encephalopathies). Arch Virol Suppl. 1993b; 7:261-93.
154. Kretzschmar HA, Kufer P, Riethmuller G, DeArmond S, Prusiner SB, Schiffer D. Prion protein mutation at codon 102 in an Italian family with Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome. Neurology. 1992; 42(4):809-10.
155. Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. Am J Pathol. 1986a; 122(1):1-5.

156. Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, Dearmond SJ. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA*. 1986b; 5(4):315-24.
157. Kristensson K, Feuerstein B, Taraboulos A, Hyun WC, Prusiner SB, Dearmond SJ. Scrapie prions alter receptor-mediated calcium responses in cultured cells. *Neurology*. 1993; 43(11):2335-41.
158. Kubista M, Sjöback R, Eriksson S, Albinsson B. Experimental Correction for the Inner-filter Effect in Fluorescence Spectra. *Analyst* 1994; 119:417-9.
159. Kuhn MA, Hoyland B, Carter S, Zhang C, Haugland RP. Fluorescent Ion Indicators for Detecting Heavy Metals. *Proc. SPIE-Intl. Soc. Opt. Eng* 1995; 2388:238.
160. Kumar R, Prasad R. Functional characterization of purified zinc transporter from renal brush border membrane of rat. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1509:429-39.
161. Kurschner C, Morgan JI. Analysis of interaction sites in homo- and heteromeric complexes containing Bcl-2 family members and the cellular prion protein. *Mol Brain Res* 1996; 37:249-258.
162. Kurschner C, Morgan JI. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Mol Brain Res* 1995; 30:165-167.
163. Lakowicz, JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York, 1999: Kluwer Academic.
164. Landthaler M, Szeimies RM, Hohenleutner U. Laser therapy of skin tumors. *Recent Results Cancer Res* 1995; 139:417-21.
165. Lattanzio FA Jr, Bartschat DK. The effect of pH on rate constants, ion selectivity and thermodynamic properties of fluorescent calcium and magnesium indicators, *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 177(1):184-91.

166. Lattanzio FA. The effects of pH and temperature on fluorescent calcium indicators as determined with Chelex-100 and EDTA buffer systems. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 171(1):102-8.
167. Li N, Li KA, Tong SY. Fluorometric determination for micro amounts of albumin and globulin fractions without separation by using alpha, beta, gamma, delta-tetra(4'-carboxyphenyl)porphin. *Analytical Biochemistry* 1996; 233:151-155.
168. Linder. *Biochemistry of copper.* New York: Plenum.
169. Link E, Edelmann L, Chou JH, Binz T, Yamasaki S, Eisel U, Baumert M, Sudhof TC, Niemann H, Jahn R. Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992; 189(2):1017-23.
170. Llano I, Marty A, Armstrong CM, Konnerth A. Synaptic- and agonist-induced excitatory currents of Purkinje cells in rat cerebellar slices. *J Physiol* 1991; 434:183-213.
171. Lledo PM, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB, Nicoll RA. Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc Nat Acad Sci USA* 1996; 93:2403-2407.
172. Loeffler DA, Le Witt PA, Juneau PL, Sima AA, Nguyen HU, De Maggio AJ, Brickman CM, Brewer GJ, Dick RD, Troyer MD, Kanaley L. Increased regional brain concentration of coerulein in neurodegenerative disorders. *Brain Res.* 1996; 738:265-74.
173. Loftus B, Rogers M. Characterization of a prion protein (PrP) gene from rabbit; a species with apparent resistance to infection by prions. *Gene.* 1997; 184(2):215-9.
174. Lovell MA, Robertson JD, Teesdale WJ, Campbell JL, Markesbery WR. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques. *Journal of Neurological Sciences* 158; 1998:47-52.

175. Lu P, Sturman JA, Bolton DC. Altered GABA distribution in hamster brain is an early molecular consequence of infection by scrapie prions. *Brain Res.* 1995; 681(1-2):235-41.
176. Lührs T, Riek R, Guntert P, Wuthrich K. NMR structure of the human doppel protein. *J Mol Biol.* 2003; 326(5):1549-57.
177. Manson JC, Hope J, Clarke AR, Johnston A, Black C, MacLeod N. PrP gene dosage and long term potentiation. *Neurodegeneration* 1995; 4:113-115.
178. Manson JC, Clarke AR, Hooper ML, Aitchison L, McConnell I, Hope J. 129/C1a mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol Neurobiol* 1994; 8:121-127.
179. Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis ? *Development* 1992; 115(1):117-22.
180. Marcotte EM, Eisenberg D. Chicken prion tandem repeats form a stable, protease-resistant domain. *Biochemistry* 1999; 38:667-76.
181. Martell AE, Hancock RD. Metal complexes in aqueous solution. NY, 1996: Plenum.
182. Martinez A, Vitorica J, Satrustegui J. Cytosolic free calcium levels increase with age in rat brain synaptosomes. *Neuroscience Letters* 1988; 88:336-342.
183. Martins VR, Graner E, Garcia-Abreu J, de Souza SJ, Mercadante AF, Veiga SS, Zanata SM, Neto VM, Brentani RR. Complementary hydrophathy identifies a cellular prion protein receptor. *Nature Medicine* 1998; 3:1376-82.
184. Mash DC, Pablo J, Flynn DD, Efang SM, Weiner WJ. Characterization and distribution of transferrin receptors in the rat brain. *J Neurochem* 1990; 55(6):1972-9.
185. Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms

- of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain*. 1981; 104:559-88.
186. McArthur AJ, Gillette MU, Prosser RA. Melatonin directly resets the rat suprachiasmatic circadian clock in vitro. *Brain Res* 1991; 565 :158-61.
187. McHattie SJ, Brown DR, Bird MM. Cellular uptake of the prion protein fragment PrP106-126 in vitro. *J Neurocytol*. 1999; 28(2):149-59.
188. McKenzie D, Bartz J, Mirwald J, Olander D, Marsh R, Aiken J. Reversibility of scrapie inactivation is enhanced by copper. *J Biol Chem*. 1998; 273(40):25545-7.
189. McKintosh E, Tabrizi SJ, Collinge J. Prion diseases. *J Neurovirol*. 2003; 9(2):183-93.
190. McMahon HT, Nicholls DG. Transmitter glutamate release from isolated nerve terminals: evidence for biphasic release and triggering by localized Ca^{2+} . *J Neurochem* 1991; 56:86-94.
191. Meggendorfer F. Klinische und genealogische Beobachtungen bei einem Fall von spastischer Pseudosklerose. *Z Ges Neurol Psychiatr* 1930; 128:337-41.
192. Minta A, Kao JP, Tsien RY. Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J Biol Chem* 1989; 264:8171-8.
193. Miura T, Hori-i A, Mototani H, Takeuchi H. Raman spectroscopic study on the copper(II) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence. *Biochemistry*. 1999; 38(35):11560-9.
194. Miura T, Hori-i A, Takeuchi H. Metal-dependent alpha-helix formation promoted by the glycine-rich octapeptide region of prion protein. *FEBS Lett* 1996; 396:248-252.
195. Mo H, Moore RC, Cohen FE, Westaway D, Prusiner SB, Wright PE, Dyson HJ. Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(5):2352-7.

196. Moe MC, Berg-Johnsen J, Roste GK, Vinje ML. Stimulated increase in free cytosolic Ca(2+) and protein kinase C activity in human cerebrocortical synaptosomes. *Brain Res.* 2002; 924(1):116-9.
197. Molina-Hernandez A, Nunez A, Sierra JJ, Arias-Montano JA. Histamine H(3) receptor activation inhibits glutamate release from rat striatal synaptosomes. *Neuropharmacology* 2001; 41(8):928-34.
198. Moore RC, Lee IY, Silverman GL, Harrison PM, Strome R, Heinrich C, Karunaratne A, Pasternak SH, Chishti MA, Liang Y, Mastrangelo P, Wang K, Smit AF, Katamine S, Carlson GA, Cohen FE, Prusiner SB, Melton DW, Tremblay P, Hood LE, Westaway D. Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J Mol Biol.* 1999; 292(4):797-817.
199. Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 1995; 14:509-517.
200. Mühleisen H, Gehrman J, Meyermann R. Reactive microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1995; 21(6):505-17.
201. N.N. Fact Sheet 180. New York, 2002: WHO.
202. Nam SC, Hockberger PE. Divalent ions released from stainless steel hypodermic needles reduce neuronal calcium currents. *Pflügers Arch* 1992; 420:106-108.
203. Nicholson EM, Mo H, Prusiner SB, Cohen FE, Marqusee S. Differences between the prion protein and its homolog Doppel: a partially structured state with implications for scrapie formation. *J Mol Biol.* 2002; 316(3):807-15.
204. Nishikawa T, Lee IS, Shiraishi N, Ishikawa T, Ohta Y, Nishikimi M. Identification of S100b protein as copper-binding protein and its suppression of copper-induced cell damage. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(37):23037-41.

205. Oesch B, Teplow DB, Stahl N, Serban D, Hood LE, Prusiner SB. Identification of cellular proteins binding to the scrapie prion protein, *Biochemistry* 1990; 29:5848-55.
206. Orena SJ, Goode CA, Linder MC. Binding and uptake of copper from ceruloplasmin. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 139:822-9.
207. Owen F, Poulter M, Lofthouse R, Collinge J, Crow TJ, Risby D, Baker HF, Ridley RM, Hsiao K, Prusiner SB. Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*. 1989; 1(8628):51-2.
208. Oxenkrug GF, Requintina PJ. The effect of MAO-A inhibition and cold-immobilization stress on N-acetylserotonin and melatonin in SHR and WKY rats. *J Neuronal Transm Suppl* 1998; 52:330-336.
209. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(23):10962-6.
210. Pan KM, Stahl N, Prusiner SB. Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Sci*. 1992; 1(10):1343-52.
211. Parchi P, Zou W, Wang W, Brown P, Capellari S, Ghetti B, Kopp N, Schulz-Schaeffer WJ, Kretzschmar HA, Head MW, Ironside JW, Gambetti P, Chen SG. Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(18):10168-72.
212. Parchi P, Capellari S, Chen SG, Petersen RB, Gambetti P, Kopp N, Brown P, Kitamoto T, Tateishi J, Giese A, Kretzschmar H. Typing prion isoforms. *Nature*. 1997; 386(6622):232-4.
213. Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, Farlow M, Dickson DW, Sima AA, Trojanowski JQ, Petersen RB, Gambetti P. Molecular basis

- of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol.* 1996; 39(6):767-78.
214. Pattison IH, Jebbett JN. Histopathological similarities between scrapie and cuprizone toxicity in mice. *Nature.* 1971; 230(5289):115-7.
215. Pauly PC, Harris DA. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Bio Chem* 1998; 273:33107-10.
216. Peoc'h K, Volland H, De Gassart A, Beaudry P, Sazdovitch V, Sorgato MC, Creminon C, Laplanche JL, Lehmann S. Prion-like protein Doppel expression is not modified in scrapie-infected cells and in the brains of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *FEBS Lett.* 2003; 536(1-3):61-5.
217. Petrat F, Rauen U, de Groot H. Determination of the chelatable iron pool of isolated rat hepatocytes by digital fluorescence microscopy using the fluorescent probe, phen green SK. *Hepatology* 1999; 29(4):1171-9
218. Piccardo P, Safar J, Ceroni M, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. Immunohistochemical localization of prion protein in spongiform encephalopathies and normal brain tissue. *Neurology.* 1990; 40(3 Pt 1):518-22.
219. Poeck K, Hacke W. *Neurologie.* Berlin,1998:Springer
220. Price DL, Borchelt DR, Sisodia SS. Alzheimer disease and the prion disorders amyloid beta-protein and prion protein amyloidoses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(14):6381-4.
221. Priola SA, Raines A, Caughey WS Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds. *Science* 2000; 287(5457):1503-6.
222. Priola SA, Caughey B, Caughey WS. Novel therapeutic uses for porphyrins and phthalocyanines in the transmissible spongiform encephalopathies, *Curr Opin Microbiol.* 1999; 2(5):563-6.

223. Prusiner SB. Shattuck lecture--neurodegenerative diseases and prions. *N Engl J Med.* 2001; 344:1516-26.
224. Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998a; 95(23):13363-83.
225. Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE. Prion protein biology. *Cell.* 1998b; 93(3):337-48.
226. Prusiner SB. The prion diseases. *Brain Pathol.* 1998c; 8(3):499-513.
227. Prusiner SB, Scott MR. Genetics of prions. *Annu Rev Genet.* 1997; 31:139-75.
228. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie, *Science* 1982; 216:136-44
229. Puig S, Thiele DJ. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution, *Curr. Opinion Chem Biol* 2002; 6:171:80.
230. Purrello R, Gurrieri S, Lauceri R. Porphyrin assemblies as chemical sensors. *Coordination Chemistry Reviews* 1999; 190-192:683-706.
231. Qin K, Coomaraswamy J, Mastrangelo P, Yang Y, Lugowski S, Petromilli C, Prusiner SB, Fraser PE, Goldberg JM, Chakrabartty A, Westaway D. The PrP-like protein Doppel binds copper. *J Biol Chem.* 2003; 278(11):8888-96.
232. Qin K, Yang DS, Yang Y, Chishti MA, Meng LJ, Kretzschmar HA, Yip CM, Fraser PE, Westaway D. Copper(II)-induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular PrP. Effect of protein age and deamidation. *J Biol Chem.* 2000; 275(25):19121-31.
233. Raeber AJ, Brandner S, Klein MA, Benninger Y, Musahl C, Frigg R, Roeckl C, Fischer MB, Weissmann C, Aguzzi A. Transgenic and knockout mice in research on prion diseases. *Brain Pathol.* 1998; 8(4):715-33.
234. Rajan KS, Colburn RW, Davis JM. Distribution of metal ions in the subcellular fractions of several rat brain areas. *Life Sciences* 1976; 18:423-32.

235. Regehr WG, Atluri PP. Calcium Transients In Cerebellar Granule Cell Presynaptic Terminals. *Biophysical Journal* 1995; 68:2156-2170.
236. Rieger R, Edenhofer F, Lasmezas CI, Weiss S The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nature Med* 1998; 3:1383-8.
237. Riek R, Lührs T. Three-dimensional structures of the prion protein and its doppel. *Clin Lab Med*. 2003; 23(1):209-25.
238. Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* 1996; 382(6587):180-2.
239. Riesner D. Molecular basis of prion diseases. *J Neurovirol*. 2002; 8 Suppl 2:8-20.
240. Riesner D. The prion theory: background and basic information. *Contrib Microbiol*. 2001; 7:7-20.
241. Riesner D. Prions and their biophysical background. *Biophys Chem*. 1997; 30; 66(2-3):259-68.
242. Rover Junior L, Fernandes JC, de Oliveira Neto G, Kubota LT, Katekawa E, Serrano SH. Study of NADH stability using ultraviolet-visible spectrophotometric analysis and factorial design. *Anal Biochem* 1998; 260(1):50-5.
243. Sabatini BL, Regehr WG. Optical Measurement of Presynaptic Calcium Currents. *Biophysical Journal* 1998; 74:1549-63.
244. Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB. Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations. *Nat Med*. 1998; 4(10):1157-65.

245. Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem.* 1993a; 268(27):20276-84.
246. Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci.* 1993b; 2(12):2206-16.
247. Safar J, Wang W, Padgett MP, Ceroni M, Piccardo P, Zopf D, Gajdusek DC, Gibbs CJ Jr. Molecular mass, biochemical composition, and physicochemical behavior of the infectious form of the scrapie precursor protein monomer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990a; 87(16):6373-7.
248. Safar J. Scrapie isoform of scrapie-associated protein. *J Am Vet Med Assoc.* 1990b; 196(10):1681.
249. Sailer A, Bueler H, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C. No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* 1994; 7(7):967 – 8.
250. Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, Okada H, Hasegawa S, Miyamoto T, Noda T. LOCs of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 1996; 380(5):528-531.
251. Sales N, Rodolfo K, Hassig R, Faucheux B, Di Giamberardino L, Moya KL. Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci* 1998; 10:2464-71.
252. Samman I, Schulz-Schaeffer WJ, Wohrle JC, Sommer A, Kretzschmar HA, Hennerici M. Clinical range and MRI in Creutzfeldt-Jakob disease with heterozygosity at codon 129 and prion protein type 2. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1999; 67(5):678-81.

253. Sanner T. Formation of transient complexes in the glutamate dehydrogenase catalyzed reaction. *Biochemistry* 1975; 14(23):5094-8.
254. Schätzl HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol.* 1997; 265(2):257.
255. Schätzl HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol.* 1995; 245:362-374.
256. Schwaninger M, Winter R, Hacke W, von Kummer R, Sommer C, Kiessling M, Schulz-Schaeffer WJ, Kretschmar HA. Magnetic resonance imaging in Creutzfeldt-Jakob disease: evidence of focal involvement of the cortex. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1997; 63(3):408-9.
257. Settanni G, Hoang TX, Micheletti C, Maritan A. Folding pathways of prion and doppel. *Biophys J.* 2002; 83(6):3533-41.
258. Shaked Y, Hijazi N, Gabizon R. Doppel and PrP^C do not share the same membrane microenvironment. *FEBS Lett.* 2002; 530(1-3):85-8.
259. Sharonova IN, Vorobjev VS, Haas HL. High-affinity copper block of GABA - receptor-mediated currents in acutely isolated cerebellar Purkinje cells of the rat. *Eur J Neurosci* 1998; 10:522-523.
260. Shyng SL, Heuser JE, Harris DA. A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J Cell Biol* 1994; 125:1239-1250.
261. Shyng SL, Huber MT, Harris DA. A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 1993; 268(21):15922-8.
262. Smith, C. A persistent activity-dependent facilitation in chromaffin cells is caused by Ca²⁺ activation of protein kinase C. *J. Neurosci.* 1999; 19:589 –598.
263. Smith CB, Betz WJ. Simultaneous independent measurement of endocytosis and exocytosis. *Nature* 1996; 380:531-4.

264. Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 1997; 51:229-240.
265. Stöckel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein selectively binds copper (II) ions. *Biochem* 1998; 37:7185-93.
266. Streleckova E, Kodetova D, Pouckova P, Zadinova M, Lukas E, Rokyta R, Jirsa M. Meso-tetra-(4-sulfonatophenyl)-porphine of low neurotoxicity. *Sb Lek.* 1995; 96(1):7-13.
267. Subbarao NK, MacDonald RC. Experimental method to correct fluorescence intensities for the inner filter effect. *Analyst* 1993; 118(7):913-6.
268. Sumudhu W, Perera S, Hooper NM. Ablation of the metal-ion induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region. *Curr Biol* 2001; 11:519-523.
269. Tan YP, Llano I, Hopt A, Wurriehausen F, Neher E. Fast Scanning and Efficient Photodetection in a Simple Two-Photon Microscope. *Journal of Neuroscience Methods* 1999; 92:123-35.
270. Tanaka, M. Kinetics of metalloporphyrin formation with particular reference to the metal ion assisted mechanism. *Pure Appl Chem* 1983; 55:151-8.
271. Taraboulos A, Jendroska K, Serban D, Yang SL, DeArmond SJ, Prusiner SB. Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89(16):7620-4.
272. Thackray AM, Knight R, Haswell SJ, Bujdoso R, Brown DR. Metal imbalance and compromised antioxidant function are early changes in prion disease. *Biochem J.* 2002; 362(Pt 1):253-8.
273. Thellung S, Florio T, Villa V, Corsaro A, Arena S, Amico C, Robello M, Salmona M, Forloni G, Bugiani O, Tagliavini F, Schettini G. Apoptotic cell death and impairment of l-type voltage-sensitive calcium channel activity in rat cerebellar granu-

- le cells treated with the prion protein fragment 106-126. *Neurobiol Dis* 2000; 7:299-309.
274. Tings T, Herms J, Dunker S, Kretzschmar HA. Rescue of Ca²⁺-activated K⁺-currents in cerebellar Purkinje cells of transgenic mice overexpressing the prion protein on a knock-out background. *Clin Neuropathol* 1998; 17:254.
275. Tobler I, Deboer T, Fischer M. Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J Neurosci* 1997; 17:1869-79.
276. Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 1996; 380:639-642.
277. Turay J, Hambright P. Activation parameters and a mechanism for metal-porphyrin formation reactions. *Inorg Chem* 1980; 19:562-4.
278. Vassallo N, Herms JW. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J Neurochem* 2003; im Druck.
279. Verkhratsky A, Toescu FC. Calcium and neural ageing. *TINS* 1998; 21(1):2-7.
280. Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE, Dyson HJ. Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96:2042-7.
281. Vitorica J, Satrustegui J. Involvement of Mitochondria in the Age-Dependent Decrease in Calcium Uptake of Rat Brain Synaptosomes. *Brain Research* 1986; 378:36-48.
282. Wadsworth JD, Hill AF, Joiner S, Jackson GS, Clarke AR, Collinge J. Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat Cell Biol.* 1999; 1(1):55-9.

283. Waggoner DJ, Drisaldi B, Bartnikas TB, Casareno RLB, Prohaska JR, Gitlin JD, Harris DA. Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J Biol Chem* 2000; 275:7455-8.
284. Waggoner DJ, Bartnikas TB, Gitlin JD. The role of copper in neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis* 1999; 6:221-30.
285. Wang JK. Cu^{2+} induces Ca^{2+} -dependent neurotransmitter release from brain catecholaminergic nerve terminals. *Eur J Pharmacol* 1999; 373(2-3):163-9.
286. Weissmann C, Enari M, Klohn PC, Rossi D, Flechsig E. Transmission of prions. *J Infect Dis.* 2002a; 186 Suppl 2:S157-65.
287. Weissmann C, Enari M, Klohn PC, Rossi D, Flechsig E. Transmission of prions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002b; 99 Suppl 4:16378-83.
288. Weissmann C, Enari M, Klohn PC, Rossi D, Flechsig E. Molecular biology of prions. *Acta Neurobiol Exp (Warsz).* 2002c; 62(3):153-66.
289. Weissmann C. Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies: an introduction. *J Toxicol Sci.* 2002d; 27(2):69-77.
290. Weissmann C, Aguzzi A. Perspectives: neurobiology. PrP's double causes trouble. *Science.* 1999a; 286(5441):914-5; 286(5447):2086.
291. Weissmann C. Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. *J Biol Chem.* 1999b;274(1):3-6.
292. Weissmann C, Aguzzi A. Bovine spongiform encephalopathy and early onset variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Curr Opin Neurobiol.* 1997; 7(5):695-700.
293. Weissmann C, Fischer M, Raeber A, Bueler H, Sailer A, Shmerling D, Rulicke T, Brandner S, Aguzzi A. The use of transgenic mice in the investigation of transmissible spongiform encephalopathies. *Int J Exp Pathol.* 1996a; 77(6):283-93.
294. Weissmann C. PrP effects clarified. *Curr Biol* 1996b; 6:1359.

295. Weissmann C, Bueler H, Fischer M, Sailer A, Aguzzi A, Aguet M. PrP-deficient mice are resistant to scrapie. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 724:235-40.
296. Westaway D Carlson GA. Mammalian prion proteins: enigma, variation and vaccination. *Trends Biochem Sci.* 2002; 27(6):301-7.
297. Whatley SA, Powell JF, Politopoulou G, Campbell IC, Brammer MJ, Percy NS. Regulation of intracellular free calcium levels by the cellular prion protein, *Neuroreport* 1995; 6:2333-7.
298. White AR, Bush AI, Beyreuther K, Masters CL, Cappai R. Exacerbation of copper toxicity in primary neuronal cultures depleted of cellular glutathione. *J Neurochem.* 1999; 72(5):2092-8.
299. Whittington MA, Sidle KC, Gowland I, Meads J, Hill AF, Palmer MS, Jefferys JG, Collinge J. Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nature Genet* 1995; 9:197-207.
300. WHO, 2002 → s. N.N. Fact Sheet 180.
301. Whyte SM, Sylvester ID, Martin SR, Gill AC, Wopfner F, Schatzl HM, Dodson GG, Bayley PM. Stability and conformational properties of doppel, a prion-like protein, and its single disulfide mutant. *Biochem J.* 2003, im Druck.
302. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet.* 1996; 347:921-5.
303. Wirth PL, Linder MC. Distribution of Copper among components of human serum. *J Natl Cancer Inst* 1985; 75:277-87.
304. Wong BS, Chen SG, Colucci M, Xie Z, Pan T, Liu T, Li R, Gambetti P, Sy MS, Brown DR. Aberrant metal binding by prion protein in human prion disease. *J Neurochem.* 2001a; 78(6):1400-8.

305. Wong BS, Brown DR, Sy MS. A Yin-Yang role for metals in prion disease. *Panminerva Med.* 2001b; 43(4):283-7.
306. Wong BS, Venien-Bryan C, Williamson RA, Burton DR, Gambetti P, Sy MS, Brown DR, Jones IM. Copper refolding of prion protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 276(3):1217-24.
307. Wong K, Qiu Y, Hyun W, Nixon R, VanCleave J, Sanchez-Salazar J, Prusiner SB, DeArmond SJ. Decreased receptor-mediated calcium response in prion-infected cells correlates with decreased membrane fluidity and IP₃ release. *Neurology* 1996; 47(3):741-50.
308. Wopfner F, Weidenhofer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T, Schatzl HM. Analysis of 27 mammalian and 9 avian prion proteins reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol* 1999; 289(5):1163 – 78.
309. Yehiely F, Bamborough P, Da Costa M, Perry BJ, Thinakaran G, Cohen FE, Carlson GA, Prusiner SB. Identification of candidate Proteins binding to prion. *Neurobiol Dis.* 1997; 3(4):339-55.
310. Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wuthrich K. NMR solution structure of the human prion protein. *PNAS* 2000; 97(1):145-150.
311. Zhou Z, Neher E. Calcium permeability of nicotinic acetylcholine receptor channels in bovine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 1993a; 425(5-6):511-7.
312. Zhou Z, Neher E. Mobile and immobile calcium buffers in bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol* 1993b; 469:245-73.

8. Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Abteilung für Neuropathologie der Georg-August-Universität zu Göttingen begonnen und am Institut für Neuropathologie der Ludwig-Maximilian-Universität zu München fertiggestellt.

Mein besonderer Dank für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit gilt meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Hans Kretzschmar. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Jochen Herms und Herrn Dr. Stefan Korte, die mich bei der Anfertigung der Arbeit mit Rat und Tat unterstützt haben.

Herrn Peter Schürmann, Göttingen, gilt mein Dank für die Assistenz bei der Präparation der Synaptosomen.

Für die zahlreichen anregenden Diskussionen und das angenehme Arbeitsklima bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung Neuropathologie, Göttingen, und des Instituts für Neuropathologie, München.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Niessner und Herrn Dr. Herbert Fink vom Institut für Wasserchemie und chemische Balneologie der Technischen Universität München sei vielmals gedankt; sie haben mir die Messungen am Massen- und Röntgenspektrometer ermöglicht.

Den Mitarbeitern der Abteilung Neurobiologie am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen gebührt der Dank für die Bereitstellung der Geräte zur Messung der Glutamat-Ausschüttung und des LS-50-Spektrometers, sowie des Botulinus-Toxins, hier sei besonders Herrn Prof. Dr. Reinhard Jahn und Herr Dr. Martin Margittai erwähnt.

Danke sage ich für die Bereitstellung des Spektrometers der Abteilung für Immunchemie am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, Göttingen. Ein weiteres Dankeschön für die Nutzung des konfokalen Mikroskops der Firma Zeiss und die Bereitstellung der Chromaffinzellen gilt schließlich meinem ehemaligen Lehrer, Herrn Prof. Dr. Erwin Neher.

9. Lebenslauf

PERSÖNLICHE ANGABEN:

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Geburtsdatum: 31.12.1974

Geburtsort: Bad Hersfeld

Eltern: Annelie Hopt, geb. Pelzel, und Dr. Reiner Hopt

ANGABEN ZUM WERDEGANG

1.8.1980	Grundschule Lisperhausen
1984-1993	Jakob Grimm Schule Rotenburg/F
15.6.1993	Abitur
1.10.1993	Immatrikulation an der Georg August-Universität zu Göttingen in den Fächern Physik (Diplom) und Medizin
1.7.1995	Vordiplom in Physik
1.4.1996	Ärztliche Vorprüfung
1.4.1997	Beginn der Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Abteilung Membranbiophysik, unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. E. Neher
1.10.1997	1. Medizinisches Staatsexamen
3.9.1998	Beginn der Doktorarbeit in Medizin am Klinikum der Universität Göttingen, Abteilung Neuropathologie, unter der Anleitung von

Herrn Prof. Dr. H. Kretzschmar

- 24.11.1998 Diplomabschluss in Physik
- 1.4.2000 2. Medizinisches Staatsexamen
- 16.10.2000 – 1. Tertial des praktischen Jahres am Zentralkrankenhaus Ost in
4.2.2001 Bremen, Fachgebiet Psychiatrie
- 5.2.2001 – 2. Tertial des praktischen Jahres am Universitätskrankenhaus der
27.5.2001 föderativen Universität von Santa Catarina (UFSC), Florianópolis,
Brasilien, Fachgebiet Chirurgie
- 28.5.2001 – 3. Tertial des praktischen Jahres am Universitätskrankenhaus der
16.9.2001 föderativen Universität von Santa Catarina (UFSC), Florianópolis,
Brasilien, Fachgebiet Innere Medizin
- 30.10.2001 3. Medizinisches Staatsexamen
- 1.3.2002 Beginn der AiP-Zeit am Universitätsklinikum Charité, Berlin, Kli-
nik für Neurologie
- seit 1.9.2003 Beschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Universitäts-
klinikum Charité, Berlin, Klinik für Neurologie
- 7.11.2003 Approbation als Arzt