

Aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Hans A. Kretzschmar

Prionerkrankungen: Analyse von Aggregationsprozessen des Prionproteins auf Einzelmolekülebene

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Johannes Martin Levin

aus
Göttingen

Jahr
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H.A. Kretschmar

2. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Koszinowski

Mitberichtersteller: Prof. Dr. E. Meinel
Prof. Dr. J. Tatzelt

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. Armin Giese

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2007

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Proteinaggregation bei neurodegenerativen Krankheiten	6
1.2. Prionkrankheiten (Transmissible spongiforme Enzephalopathien)	6
1.3. Das TSE-Agens und die Prionhypothese	8
1.4. Das Prionprotein (PrP)	12
1.5. Pathologische Umfaltungen des Prionproteins	14
1.6. Prionprotein und Metallionen	17
1.7. Konfokale Einzelmolekülspektroskopie	19
1.8. Fragestellung der Arbeit	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Materialien	23
2.2. FCS und SIFT	27
2.2.1. FCS, Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie	27
2.2.2. SIFT, „Scanning for intensely fluorescent targets“	28
2.2.3. Messaufbau	29
2.2.4. Messbedingungen und Justage	30
2.2.5. Evaluationsverfahren	31
2.2.5.1 Autokorrelationsanalyse	31
2.2.5.2 Kreuzkorrelationsanalyse	35
2.2.5.3 FIDA und 2D-FIDA	36
2.2.5.4 SIFT Auswertung	39
2.3. Proteinexpression & Aufreinigung	40
2.4. Fluoreszenzmarkierung	41
2.4.1. Markierungsansatz	41
2.4.2. Qualitätskontrolle und Charakterisierung der markierten Proteine	42
2.5. <i>de novo</i> Aggregationsassay	44
2.6. Aufreinigung von humanen Prionen	45
2.7. Aggregationsassay mit Prion-Rods	45
2.8. CD-Spektroskopie	46
2.9. Thioflavin-T Fluoreszenz	47

2.10. Proteinase-K-Verdau und Prion Detektion im Western-Blot	47
3. Ergebnisse	49
3.1. Etablierung eines <i>de novo</i> Aggregations Ansatzes	49
3.1.1 Abhängigkeit der Aggregation von rPrP von SDS	49
3.1.2 Vergleich der Aggregation von rPrP Oligomeren und <i>de novo</i> Aggregation	50
3.1.3 Einfluss des Methionin / Valin Polymorphismus an Codon 129	53
3.2 Metallionen im SDS System	55
3.2.1 Einfluss von Metallionen auf die Aggregation von PrP	55
3.2.2 Effekt von Metallionen auf die Konformation des Prionproteins	58
3.2.3 Amyloidcharakter der rPrP Aggregate im SDS System	60
3.2.4 Proteinase K-Resistenz der metallinduzierten Aggregate	61
3.2.5 Stabilität der rPrP Aggregate	63
3.2.6 Durch Mangan induzierte Multimere	65
3.2.7 Rolle von Kupferbindestellen bei manganinduzierter Aggregation von PrP	69
3.3. Aggregation unter Seeding mit humanen Prionen	70
3.3.1 Seeding von rPrP Aggregation durch humane Prionen	70
3.3.2 Einfluss von Metallionen auf die PrP ^C - PrP ^{Sc} Interaktion	71
4 Diskussion	73
4.1. SDS gesteuerte <i>in vitro</i> Aggregation von rPrP als Modellsystem zur Analyse der PrP-Konversion	73
4.3 Einsatz und Möglichkeiten von FCS und SIFT	75
4.4 Rolle von Metallionen in der PrP- Aggregation und Konversion	76
4.3.1 Rolle von Kupfer in der PrP- Aggregation und Konversion	76
4.3.2 Rolle von Mangan in der PrP- Aggregation und Konversion	79
4.3.3 Modell zur kombinierten Wirkung von Kupfer und Mangan	80
4.4. Bedeutung meiner Ergebnisse für die Auswirkungen von Metallionen auf Proteinaseresistenz von PrP und Prionkrankheiten <i>in vivo</i>	81
5 Zusammenfassung	84

6	Abkürzungsverzeichnis	86
7	Abbildungsverzeichnis	88
8	Tabellenverzeichnis	90
9	Literaturverzeichnis	91
10	Lebenslauf	107
11	Danksagung	111

1. Einleitung

1.1 Proteinaggregation bei neurodegenerativen Krankheiten

Die steigende Prävalenz neurodegenerativer Erkrankungen in der Bevölkerung stellt schon heute ein bedeutendes gesundheitspolitisches Problem dar. Durch die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung ist zu erwarten, dass dieses Problem weiter an Bedeutung gewinnen wird (2;3).

Alle häufigen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Morbus Alzheimer, der M. Parkinson, der M. Huntington und die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien sind durch die Bildung und Ablagerung jeweils krankheitsspezifischer amyloidartiger Proteinaggregate gekennzeichnet. Die Aggregate selbst, ihre Entstehung oder Aggregationsintermediate werden für die Nervenzellschädigung, die im Zentrum der Pathogenese dieser Erkrankungen steht, verantwortlich gemacht (4-10).

Über Mutationen, die zu pathologischer Aggregation von Proteinen führen, involvierte biochemischen Modifikationen und Veränderungen in den Expressionsmustern der betroffenen Proteine existieren inzwischen umfangreiche Daten. Die genauen molekularen und strukturellen Prozesse jedoch, die der Aggregatbildung zugrunde liegen, sind gegenwärtig noch unzureichend geklärt (11).

1.2 Transmissible spongiforme Enzephalopathien (Prionkrankheiten)

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind übertragbare neurodegenerative Krankheiten bei Menschen und Tieren, die bevorzugt das Gehirn befallen. Sie werden durch sogenannte „Prionen“ verursacht (siehe 1.3). Im Krankheitsverlauf kommt es zu einer charakteristischen vakuolären Auflockerung des Hirngewebes, die als spongiforme Veränderung bezeichnet wird mit Nervenzellverlusten und astrozytärer Gliose. Prionkrankheiten führen nach einer zum Teil jahrelangen Inkubationszeit innerhalb von wenigen Monaten durch progrediente neurologische Störungen zum Tode (12-16).

Die erste beschriebene TSE ist die seit Jahrhunderten in Großbritannien und Deutschland bekannte Schafkrankheit Scrapie. Sie war auch die erste Krankheit aus

der Gruppe der transmissiblen spongiformen Enzephalopathien, von der erkannt wurde, dass es sich bei Prionkrankheiten grundsätzlich um übertragbare Krankheiten handelt (17).

Weitere Prionkrankheiten bei Tieren sind die bei Rindern vorkommende Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE), die „transmissible mink encephalopathy“ (TME) bei Nerzen, „feline spongiforme encephalopathy“ (FSE) bei Katzen und „chronic wasting disease“ (CWD) bei Hirschen (18). Darüber hinaus lassen sich zahlreiche weitere Tierarten experimentell mit transmissiblen spongiformen Enzephalopathien infizieren (14;15;19).

Unter den Prionerkrankungen des Menschen lassen sich nach ihrer Ätiologie idiopathische, hereditäre und erworbene Fälle unterscheiden. Die in den frühen 20er Jahren des vergangenen Jahrhunderts erstmals beschriebene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit („Creutzfeldt-Jakob disease“, CJD) (20;21) tritt überwiegend sporadisch ohne erkennbare Infektionsquelle auf (22;23). Sie ist mit einer weltweiten Häufigkeit von ca. 1,4 Fällen pro einer Million Einwohner die häufigste Prionerkrankung des Menschen. Fünf von sechs CJD Fällen sind sporadische CJD Fälle (23-26).

Das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (27;28) und die tödliche familiäre Insomnie (29;30) sind als hereditäre Erkrankungen mit bestimmten Mutationen im Prionprotein-Gen assoziiert. Auch ein kleinerer Teil der CJD Fälle ist genetisch bedingt (25;31;32).

Erworbene Prionerkrankungen mit weitgehend gesicherter Erregerquelle sind Kuru und die so genannte „neue Variante“ der CJD (vCJD). Die Kuru-Krankheit, die durch rituellen Kannibalismus im Volksstamm der Fore in Papua-Neuguinea übertragen wurde, ist von besonderer wissenschaftshistorischer Bedeutung, da sie die erste experimentell auf Versuchstiere übertragene Prionerkrankung des Menschen darstellt (33;34).

Besonderes Aufsehen erregte das Auftreten einer neuen Form der Prionerkrankungen des Menschen, vCJD, von der inzwischen mehr als 150 Fälle überwiegend in Großbritannien beschrieben wurden (25;26;35;36). Aufgrund epidemiologischer, biochemischer und tierexperimenteller Untersuchungen muss davon ausgegangen werden, dass die vCJD als Folge einer Infektion mit dem BSE-Erreger auftritt (37-39).

Das Auftreten einiger CJD Fälle lässt sich anamnestisch auf eine Übertragung von Mensch zu Mensch im Rahmen medizinischer Eingriffe zurückführen, wie sie

insbesondere nach Therapie mit menschlichen Hypophysenhormonen, nach neurochirurgischen Eingriffen und nach Dura mater- oder Cornea- Transplantationen beschrieben wurden (40-42). Besorgniserregende medizinische Fallberichte aus Großbritannien beschreiben, dass die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit möglicherweise durch eine Bluttransfusion übertragen werden kann (43;44). Ebenso wie Scrapie und die erworbenen Formen von Prionkrankheiten sind auch die sporadische CJD und die genetisch bedingten Prionerkrankungen des Menschen auf Versuchstiere übertragbar (45-47).

1.3 Charakterisierung des TSE-Agens und die Prionhypothese

Transmissible spongiforme Enzephalopathien sind übertragbare Krankheiten. Bei dem Versuch, den Erreger zu isolieren und zu charakterisieren, zeigte sich, dass das TSE-Agens eine ungewöhnlich hohe Resistenz gegenüber üblichen Desinfektions- und Sterilisationsverfahren sowie Nukleinsäure zerstörenden Behandlungen besitzt (48;49). Außerdem ist der TSE-Erreger, wie aus Bestrahlungsexperimenten mit UV- und Gamma-Strahlung geschlossen wurde, sehr klein. Daher wurde zunächst angenommen, dass es sich um ein Virus handle. Dieses „Virus“ verhält sich hinsichtlich seiner Inaktivierbarkeit anders als konventionelle Viren. Es ist deutlich resistenter (50;51). Trotz intensiver Bemühungen konnte bis heute weder ein als TSE-Agens in Frage kommendes Virus noch eine erregerassoziierte Nukleinsäure isoliert werden (52-54).

Angesichts der zahlreichen ungewöhnlichen Eigenschaften des TSE-Agens wurde schon in den sechziger Jahren spekuliert, ob es sich bei TSE um ein neuartiges Prinzip von Infektionen handelt, die ohne die Beteiligung von Nukleinsäuren, dem Träger von Erbinformation, auskommen und ob stattdessen ein Protein als infektiöses und vermehrungsfähigen Agens wirkt (55;56).

Ausgehend von der Hypothese, dass die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien tatsächlich durch ein Protein und ohne Beteiligung von Nukleinsäuren übertragen werden, führte Stanley B. Prusiner den Begriff „Prion“ für den TSE Erreger ein. „Prion“ ist eine Kurzform der englischen Bezeichnung „proteinaceous infectious agent“ (49). Mitte der 80er Jahre konnte die Arbeitsgruppe um Prusiner ein Protein isolieren, das der wesentliche oder sogar einzige Bestandteil

des TSE-Agens ist (57-60). Dieses Protein wird seitdem Prionprotein (PrP) genannt (vgl. auch 1.4).

Der Kern der Prionhypothese ist, dass das Prionprotein in zwei verschiedenen Formen vorkommen kann. Die physiologische Form wird unter Normalbedingungen besonders von Zellen des Zentralnervensystems gebildet und wird im Folgenden PrP^C genannt. Die krankheitsassoziierte Form wird als PrP^{Sc} bezeichnet. Die Bezeichnung PrP^{Sc} leitet sich von PrP Scrapie ab (siehe 1.2) (19). Beide Formen des Prionproteins unterscheiden sich in ihrer Konformation (61;62).

Der Prionhypothese zufolge entstehen und verbreiten sich TSE, indem PrP^{Sc} mit PrP^C in Wechselwirkung tritt und dabei PrP^C in einem autokatalytischen Prozess, der nur von dem Prionprotein selbst abhängt und ohne direkte Beteiligung von Nukleinsäuren abläuft, in PrP^{Sc} umwandelt. Das auf diese Weise neu entstandene PrP^{Sc} kann seinerseits auf PrP^C einwirken und dieses ebenfalls in PrP^{Sc} umwandeln (19). Dieser Prozess kann grundsätzlich durch eine Zufuhr von PrP^{Sc} von außen in Gang gesetzt werden. PrP^{Sc} verhält sich in diesem Fall wie ein vermehrungsfähiger Infektionserreger. Alternativ ist auch eine spontane Krankheitsentstehung in Folge einer stochastischen Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} möglich. Dies ist im Rahmen der Prionhypothese der Weg zur sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (63).

Den familiären Prionerkrankungen des Menschen liegen verschiedene pathogene Mutationen im Prionprotein-Gen zugrunde, welche die Konformationsänderung von PrP^C zu PrP^{Sc} erleichtern und damit zu hereditären Prionerkrankungen führen können (14;19;27;31;64).

Mäuse, denen das PrP Gen entfernt wurde (Prnp0/0-Mäuse), sind in ihrem Verhalten und in ihrem Phänotyp weitgehend normal (siehe 1.4). Da diese Mäuse jedoch resistent gegen die Infektion mit Maus-Scrapie sind (65), gilt als bewiesen, dass die Expression von PrP^C eine notwendige Voraussetzung für eine Infektion mit Prionkrankheiten ist (66). Darüber hinaus scheint die Expression von PrP^C die Suszeptibilität gegenüber einer neurotoxischen Wirkung von PrP^{Sc} zu beeinflussen, da in Zellkultur Nervenzellen aus Prnp0/0-Mäusen resistent gegenüber der zytotoxischen Wirkung von PrP^{Sc} und eines neurotoxischen PrP-Peptidfragmentes sind (67-69). Auch tolerieren Mäuse, die wenig PrP exprimieren, mehr PrP^{Sc} Ablagerungen im Gewebe, bis Krankheitssymptome auftreten. Bei Mäusen, die PrP überexprimieren, gilt das Gegenteil (70;71). Prnp0/0-Mäuse, die in ihrem Gehirn ein Transplantat aus PrP-exprimierendem Hirngewebe tragen, das in der Lage ist, nach

Scrapieinfektion PrP^{Sc} zu bilden, zeigen nur im Nervenzelltransplantat selbst einen Nervenzellverlust nicht aber im angrenzenden Hirngewebe ohne PrP^C Expression. Dies ist besonders bemerkenswert, da auch im nicht PrP exprimierenden Hirngewebe PrP^{Sc} Ablagerungen nachweisbar sind (72).

Nicht nur die Menge des exprimierten PrP ist wichtig für den Krankheitsverlauf, auch die Effizienz der Übertragung einer TSE zwischen verschiedenen Tierarten wird wesentlich durch die Ähnlichkeit des Prionproteins bestimmt. Dies ist dadurch zu erklären, dass für eine erfolgreiche Übertragung geeignetes wirtseigenes PrP^C mit dem zugeführten PrP^{Sc} in Wechselwirkung treten muss (73;74).

Weiterhin ungeklärt bleibt die Frage, über welche Mechanismen es im Krankheitsprozess zur Neurodegeneration kommt. Zum Beleg der Prionhypothese ist zu fordern, dass PrP^{Sc} in seiner Rolle als Erreger nicht nur vermehrungsfähig, sondern auch direkt oder indirekt Ursache für die beobachtete krankheitsassoziierte Neurodegeneration ist.

Es wurden zwei grundsätzlich verschiedene Modelle entwickelt, die den während der Krankheit ablaufenden Untergang von Nervenzellen erklären könnten. In dem einen Modell, der „*gain of function*“-Hypothese, wirkt PrP^{Sc} direkt oder mittelbar neurotoxisch. Das andere Modell, die „*loss of function*“-Hypothese, geht davon aus, dass die PrP^{Sc} induzierte Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} zu einer Reduktion der verfügbaren Menge an funktionstüchtigem PrP^C führt und hierdurch die Neuronen schädigt. Es wird davon ausgegangen, dass sich beide Möglichkeiten nicht gegenseitig ausschließen (75;76).

Ein toxischer Effekt von PrP^{Sc} und einem neurotoxischen PrP Fragment konnte im Sinne der „*gain of function*“-Hypothese in neuronalen Zellkulturen gezeigt werden (77;78). Eine wesentliche Rolle scheinen dabei Mikrogliazellen zu spielen (68;69;79). *In vitro* Experimente brachten wesentliche Argumente für die Prionhypothese. Konversionsexperimente zeigen, dass PrP^C durch Zugabe von PrP^{Sc} spezifisch in eine PrP^{Sc} ähnliche, proteaseresistente Form, PrP^{res}, umgefaltet werden kann. Auf diese Weise kann die Menge von PrP^{res} *in vitro* vermehrt werden. Unklar war bei diesem Vorgang jedoch, ob die Umfaltung allein von der autokatalytische Funktion des PrP^{Sc} abhängt, oder ob das neugebildete PrP^{res} seinerseits über autokatalytische Aktivität verfügt (80-82). Weiterführende Experimente konnten zeigen, dass das neugebildete PrP^{res} tatsächlich seinerseits in der Lage ist, PrP^C in PrP^{res} umzuwandeln. Damit kann die Existenz der in der Prionhypothese geforderten

autokatalytischen Selbstvermehrung von PrP^{res} als bewiesen gelten (83). Jüngst wurde beschrieben, dass auf diesem Weg künstliche Prionen erzeugt werden konnten, die auch das Kriterium der Infektiosität erfüllen (84;85).

Es konnte gezeigt werden, dass es unter besonderen denaturierenden Bedingungen möglich ist, *in vitro* aus rekombinantem PrP infektiöse Prionen zu erzeugen (86). Diese verursachen in Mäusegehirnen ein spezifisches Läsionsmuster (87). Diese „synthetischen Prionen“ haben im Gegensatz zu authentischem PrP^{Sc} eine vergleichsweise lange Inkubationszeit und benötigen eine große Infektionsdosis, was darauf hindeutet, dass unter diesen *in vitro* Bedingungen eine *in vivo* verfügbare Komponente fehlt, welche die Entstehung von Infektiosität erleichtert, oder dass diese künstlichen Prionen nicht vollständig wie natürliche Prionen geformt sind. Dennoch belegt dieses Experiment die zentrale Forderung der Prionhypothese, dass das infektiöse Element der Prionkrankheiten tatsächlich nur aus Prionprotein besteht. Eine Herausforderung für die Prionhypothese ist das Auftreten von Erregerstämmen mit biochemisch unterschiedlichen PrP^{Sc} Isoformen, die zudem in der Lage sind, ihre spezifischen Eigenschaften in einem *in vitro*-Konversionsansatz auf neugebildetes PrP^{Sc} zu übertragen (88-90).

Die verschiedenen Prion-Erregerstämme unterscheiden sich bei der Passage in Wirten mit identischem Prionprotein konstant in Eigenschaften wie Inkubationszeit, klinischen Symptomen, Läsionsmuster im Gehirn und Übertragbarkeit auf andere Spezies (88;91;92). Im Rahmen der Prionhypothese bedeutet das Auftreten dieser voneinander verschiedenen Erregerstämme in Tieren mit gleicher PrP-Aminosäuresequenz, dass mehrere stabile Formen von PrP^{Sc} existieren müssen, die PrP^C in eine ihnen entsprechende Variante der pathologischen Form umwandeln können.

Auch das humane Prionprotein-Gen existiert in zwei wichtigen Allelen, die an Codon 129 entweder für Methionin oder für Valin mit Allelhäufigkeiten von 0,63 und 0,37 kodieren (31). Dieser Polymorphismus ist eine Schlüsseldeterminante für die Empfindlichkeit des Genträgers für sporadische und erworbene Prionkrankheiten und könnte Auswirkungen auf das Erkrankungsalter der Patienten haben (93-95). Parchi und andere identifizierten sechs verschiedene klinisch-pathologische Varianten von sCJD, welche mit unterschiedlichen phänotypischen Krankheitsausprägungen assoziiert sind und sich hauptsächlich durch den Genotyp an Codon 129 und die Größe des Proteinase-K-resistenten Fragmentes von PrP^{Sc} unterscheiden (96-98).

Eine Analyse einer großen Zahl von sCJD Fällen zeigte, dass Krankheitsdauer und neuropathologischer Phänotyp der Erkrankung mit dem Genotyp an Codon 129 in Verbindung zu bringen sind (99). Weitere Hinweise darauf, dass das Vorkommen verschiedener Erregerstämme mit der Existenz verschiedener PrP^{Sc}-Formen erklärbar sein könnte, ergeben sich aus der Analyse des Glycosylierungsmusters (38;97;100;101) und aus Untersuchungen mittels konformationsabhängiger Antikörperbindung (102).

1.4 Das Prionprotein (PrP)

Das Prionprotein (PrP) wurde zum ersten Mal aus dem Gehirn scrapieinfizierter syrischer Goldhamster isoliert. Es war der Hauptbestandteil von stark angereicherten Erregerpräparationen (58;60). Die Ansequenzierung dieses Proteins und anschließende Identifizierung der für dieses Protein kodierenden Nukleinsäuresequenz zeigte, dass das Prionprotein kein viral codiertes Produkt, sondern ein körpereigenes Protein ist (103;104), das hochkonserviert im Genom aller bisher untersuchten Säugetiere vorkommt (105;106). Es wird während der Entwicklung und auch im adulten Individuum von vielen Körperzellen exprimiert (107-111). Auch bei Vögeln (112;113), Reptilien (114), Fischen (115;116) und sogar in Hefen konnte ein homologes Protein nachgewiesen werden (117).

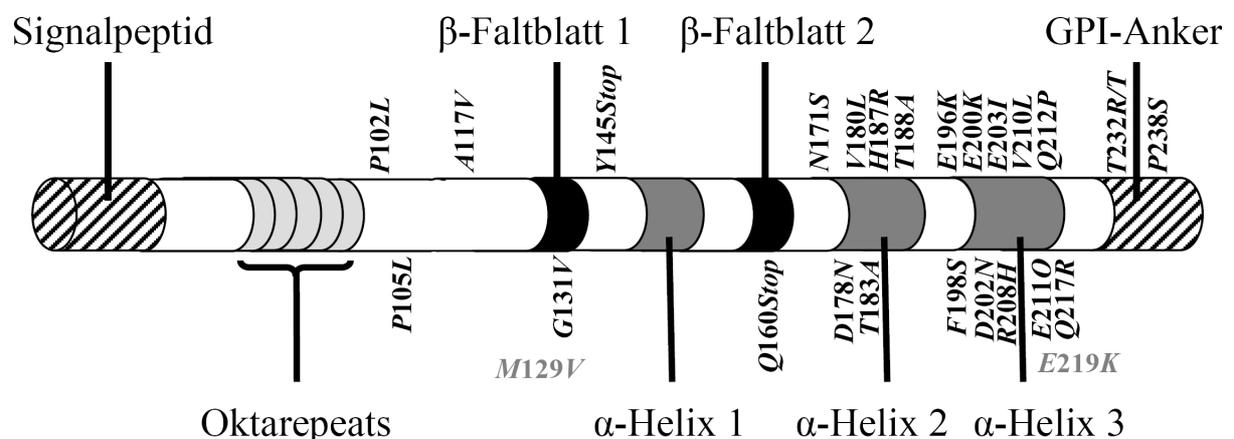


Abb. 1.1: Die kodierende Region des humanen PrP-Gens. Die Grundstruktur des PrP ist weiß, die Oktarepeat Region hellgrau dargestellt. Die β-Faltblatt Strukturen im Protein sind durch schwarze, die α-Helices durch dunkelgraue Abschnitte repräsentiert. Die Signalpeptide (gestreift) werden während des Reifungsprozesses des zellulären Prionproteins abgespalten. Mutationen, die mit vererblichen Prionkrankheiten einhergehen, sind schwarz, nicht pathogene Polymorphismen mit grauer Schrift geschrieben

Das Prionprotein-Gen des Menschen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 20. Der offene Leserahmen umfasst 759 Basenpaare und codiert für 253 Aminosäuren (118;119). Die ersten 22 Aminosäuren dienen als Signalpeptid zur Ausschleusung aus dem Zellplasma in das endoplasmatische Retikulum. Die letzten 23 Aminosäuren sind eine Signalsequenz zur Kopplung des C-Terminus an einen Glykosylphosphatinositol-(GPI)-Anker, mit dem das reife PrP in der Zellmembran verankert wird. Die N- und C-terminalen Aminosäuren mit Signalfunktion fehlen dem reifen Protein, das dann 208 Aminosäuren groß ist (120-123) (siehe Abb. 1.1).

In der C-terminalen Hälfte des Prionproteins finden sich zwei Asparagin-Reste, die Zuckerseitenketten tragen können. Der größte Teil der reifen Proteinmoleküle ist an diesen Stellen zweifach glycolysiert (124). Zusätzlich finden sich im C-Terminus zwei Cystein-Reste, die der Ausbildung einer Disulfidbrücke dienen (14).

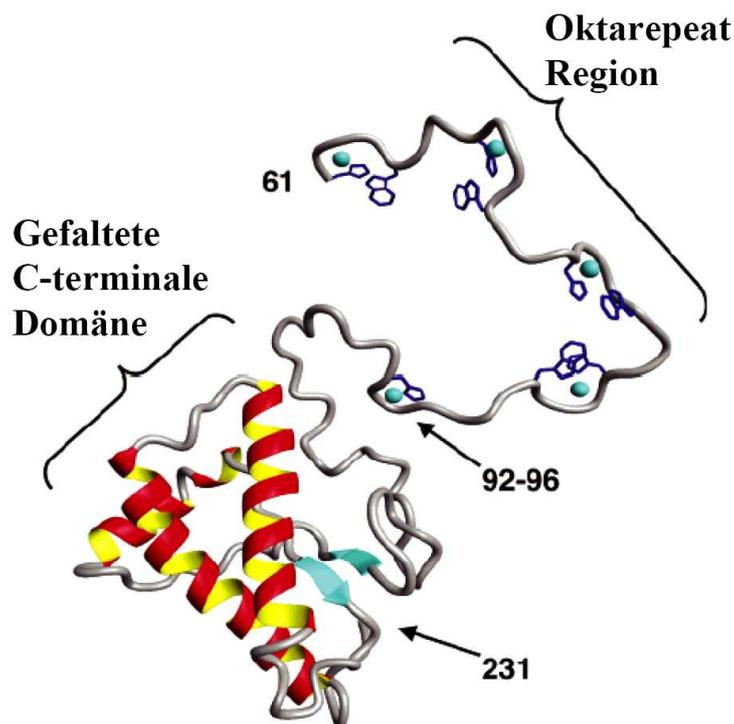


Abb.1.2. Die räumliche Struktur von PrP^C mit seinen fünf Kupferbindestellen modifiziert nach (1). Die α -Helices sind deutlich als rot-gelbe Spiralen zu erkennen und β -Faltblattstrukturen als hellblaue Pfeile. Auch die fünf gebundenen Kupferionen (hellblaue Kugeln) und die Histidin- und Tryptophanreste (blau) der Kupferbindestellen werden gezeigt.

Für das PrP^C verschiedener Spezies, z.B. von Mensch, Maus und Hamster existieren NMR-Daten über deren räumlichen Struktur. Die C-terminale Hälfte des Prionproteins

besteht nach diesen Daten aus drei α -helikalen Abschnitten und einem kurzen Abschnitt mit antiparalleler β -Faltblatt-Struktur (125;126). Die N-terminale Hälfte des Prionproteins erscheint in diesen Untersuchungen flexibel und ohne feste Struktur (127) (siehe Abb. 1.2).

Im unstrukturierten N-Terminus tritt eine Aminosäuresequenz auf, in der eine Sequenz aus acht Aminosäuren in Folge vierfach wiederholt vorkommt. Direkt N-terminal von diesem Abschnitt liegt eine sehr ähnliche Abfolge von neun Aminosäuren. Es konnte gezeigt werden, dass dieser in der Evolution besonders hoch konservierte Abschnitt, der auch als „Oktarepeatregion“ bezeichnet wird, eine kupferbindende Domäne mit vier Kupferbindestellen ist (128-131). Die Bedeutung der Kupferbindung wird dadurch unterstrichen, dass der unstrukturierte N-Terminus durch Kupferbindung in der Oktarepeatregion strukturell stabilisiert wird (132). Eine weitere Kupferbindestelle liegt weiter C-terminal zwischen den Aminosäuren 92-96 (133). Allen Kupferbindestellen des PrP ist jeweils ein Histidinrest als Ligand zur Kupferbindung gemeinsam (siehe Abb. 1.2).

Die physiologische Form des Prionproteins, PrP^C, und die TSE-assoziierte Form, PrP^{Sc}, haben identische Aminosäuresequenzen, unterscheiden sich aber in der Konformation (134). Während PrP^C einen hohen Anteil an α -helikalen Abschnitten enthält, weist PrP^{Sc} größere Abschnitte mit β -Faltblattstruktur auf (61). Es neigt zur Bildung großer, unlöslicher Aggregate (59). Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen PrP^C und PrP^{Sc} besteht in ihrer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber Proteinase-K. Während PrP^C durch Proteinase-K vollständig abgebaut werden kann, wird PrP^{Sc} nur partiell verdaut. Bei dem Abbau von PrP^{Sc} entsteht ein Fragment, das in glycosylierter Form etwa 27-30 kDa groß ist und deshalb auch als PrP27-30 bezeichnet wird (57;135;136).

1.5 Die pathologische Umfaltung des Prionproteins

Im Gegensatz zur Strukturanalyse des löslichen PrP^C ist die Strukturanalyse von PrP^{Sc} deutlich komplizierter. Mit den bisher gängigen Verfahren zur Strukturanalyse mit atomarer Auflösung war die Strukturauflösung von PrP^{Sc} nicht möglich. Ein aktuelles Modell geht davon aus, dass PrP Multimere in ihrer PrP^{Sc} Formation aus im

Dreieck angeordneten β -Helices aufgebaut sind. Über die strukturellen Details dieser

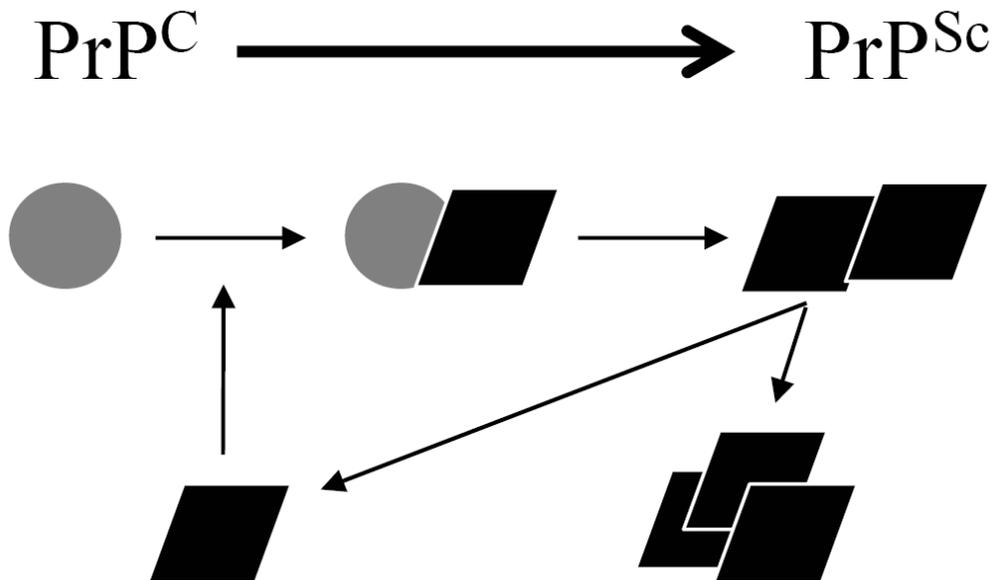


Abb. 1.3. Das Heterodimer Modell der autokatalytischen Umfaltung von PrP^{C} (rund, grau) in PrP^{Sc} (rhombisch, schwarz). Zur Umfaltung kommt es durch räumlichen Kontakt zwischen PrP^{C} und PrP^{Sc} . Nach der Umfaltung kann das neu entstandene PrP^{Sc} seinerseits andere PrP^{C} Moleküle umfalten, oder aber es kommt durch einen Aggregationsprozess zur Fibrillenbildung.

Konfiguration herrscht aber weiterhin Unklarheit (137-139).

Zum Mechanismus der Konformationsänderung von PrP^{C} zu PrP^{Sc} gibt es zwei wichtige Theorien. Das erste Modell, das sogenannte *Heterodimer* Modell oder auch „*template-directed refolding model*“ geht von einem bimolekularen autokatalytischen Prozess aus. In Rahmen dieses Prozesses ist ein Protein in der Lage, die strukturelle Veränderung eines anderen Proteins zu induzieren (siehe Abb. 1.3) (63;140).

Das zweite Modell, das aus dem Nukleationsmechanismus der Aggregation des A β -Peptids der Alzheimerschen Erkrankung abgeleitet ist, wird *Seeded Aggregation Model* genannt. Es geht von einem Aggregationskeim aus, der aus mehreren monomeren Einheiten des pathologischen Prionproteins aufgebaut ist. Die PrP-Konversion erfolgt unter Anlagerung von PrP^{C} an einen solchen Aggregationskeim. In diesem Modell existieren PrP^{C} und PrP^{Sc} in einem Gleichgewicht, das in gesunden Individuen stark auf der Seite des monomeren PrP^{C} liegt. Kommt es trotzdem zu einer Aggregation, dann wird ab einer kritischen Aggregatgröße die Assoziation neuer PrP Monomere an das Aggregat wahrscheinlicher als dessen Dissoziation. Im Krankheitsfall bilden hochorganisierte PrP^{Sc} Aggregate die infektiösen Einheiten,

welche als Aggregationskeim wirken und immer mehr PrP Moleküle in das Aggregat rekrutieren (siehe Abb. 1.4). Im Verlauf dieser Aggregation findet die Umfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc} statt (141-143).

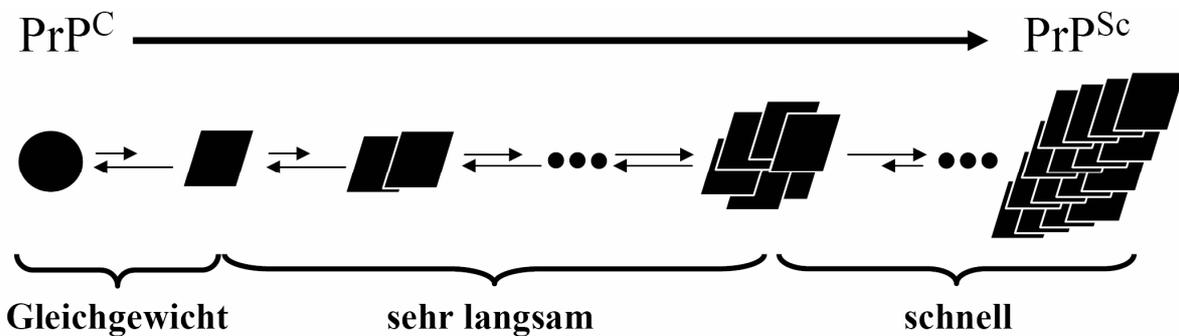


Abb. 1.4. Das „Seeded Aggregation Model“ nach Lansbury. Das α -helikale PrP^C (rund) liegt im Gleichgewicht mit einer Isoform, die einen hohen β -Faltblattanteil (rhombisch) enthält. Die β -Isoform wird durch Aggregation stabilisiert und bildet schließlich ein PrP^{Sc} Aggregat. Im physiologischen Zustand findet die Umfaltung und Aggregation sehr langsam statt. Das Gleichgewicht liegt zunächst stark auf der Seite der Aggregatauflösung. Ab einer kritischen Aggregatgröße nimmt die Wahrscheinlichkeit der Aggregatauflösung stark ab, und die Aggregationsgeschwindigkeit zu.

Die experimentelle Befunde weisen eher auf das *Seeded Aggregation Model* hin (144). Um dieses Problem weiter zu untersuchen, muss man sich eingehend mit der Aggregation von PrP und dem strukturellen Übergang in die β -Faltblatt Formation beschäftigen. Dazu eignen sich gut kontrollierbare *in vitro* Bedingungen.

In einem von der Arbeitsgruppe Riesner in Düsseldorf entwickelten System, lässt sich die Umfaltung von α -PrP in β -PrP (s.u.) mit Hilfe des Detergens Sodiumdodecylsulfat (SDS), gut unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* nachvollziehen. Wenn man rekombinantes PrP (rPrP) in einer Lösung mit 0,2% SDS löst, liegt es dort, ähnlich dem physiologischen PrP^C, in einer primär α -helikalen Form vor (α -PrP). Verdünnt man das SDS aus der Lösung heraus, kommt es zu einer Konformationsänderung, bei der sich erst rPrP-Oligomere mit einer von β -Faltblatt dominierten Struktur bilden (β -PrP) und schließlich kommt es, unter Beibehaltung der β -Faltblatt-Struktur, zur Bildung von unlöslichen größeren Aggregaten. Interessanterweise sind diese Aggregate bei sehr niedrigen Proteinase-K Konzentrationen teilweise proteaseresistent (145;146). Dies ist eine wichtige Eigenschaft, die es mit dem authentischem PrP^{Sc} teilt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass das Erlangen der Eigenschaften β -Faltblattstruktur und PK-Resistenz nicht zur Bildung von Infektiosität ausreicht (147;148).

Durch Variieren der SDS-Konzentration ist die α - β -Umwandlung und Aggregatbildung von PrP sehr direkt steuerbar, was erlaubt unter diesen definierten Bedingungen die Konformationsänderung von PrP^C in PrP^{Sc} zu beobachten. Die SDS gesteuerte Umfaltung und Aggregation von rPrP ist von der Arbeitsgruppe Riesner intensiv validiert worden (145;146) und stellt die Basis vieler Experimente der vorliegenden Arbeit dar.

1.6 Prionprotein und Metallionen

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass zweiwertige Metallionen in der Pathogenese von Prionkrankheiten, aber auch in physiologischen Funktion von PrP, eine besondere Rolle spielen.

PrP ist ein kupferbindendes Membranprotein, dessen physiologische Funktion trotz seines hohen Konservierungsgrades in allen Wirbeltierklassen bisher nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte (siehe 1.4). Da die chemische Analyse von Prnp^{0/0}-Mäusehirnen Verschiebungen im Kupfergehalt zeigte (128) und PrP^C bei physiologischem pH von 7,4 insgesamt fünf Cu²⁺ Ionen kooperativ bindet (149;150), ist es plausibel anzunehmen, dass die physiologische Funktion von PrP^C die Bindung von Cu²⁺ einschließt.

PrP-Knockout-Mäuse (Prnp^{0/0}-Mäuse) zeigen unter Laborbedingungen keinen offensichtlichen Phänotyp (151;152). Dies könnte auf funktionelle Redundanz mit anderen neuronalen Proteinen zurückzuführen sein.

Es konnte gezeigt werden, dass PrP^C, das Cu²⁺ gebunden hat, über eine Superoxyddismutaseaktivität verfügt (153). Gleichzeitig weisen Prnp^{0/0}-Mäuse eine reduzierte Aktivität der Kupfer-abhängigen Superoxid-Dismutase (Cu/Zn-SOD) und Prnp^{0/0}-Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress auf (154). Der unauffällige Phänotyp der Prnp^{0/0}-Mäuse könnte deshalb u.a. durch eine konstitutionell bedingt hohe Aktivität an Mangan-abhängiger Superoxyddismutase erklärt werden (154).

Es gibt vielfältige weitere Theorien über die Funktion von PrP (155). Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass sowohl Kupfer als auch Zink die Clathrin-abhängige Endozytose von PrP^C stimulieren, was darauf hindeutet, dass PrP^C eine Rolle in der Kupfer- und Zink-Homöostase des ZNS spielt (156-159).

Wie Kupfer und Zink treten auch Mangan und Nickel in Wechselwirkungen mit PrP^C. Zweiwertiges Mangan, Nickel und Zink können wie Kupfer, allerdings mit einer etwa zehn Größenordnungen schwächeren Affinität, an PrP^C gebunden werden (130).

Neben der deutlichen, aber im Detail noch unklaren Beziehung von Metallionen zur physiologischen Funktion von PrP, gibt es vielfältige Hinweise, dass Metallionen eine wichtige Rolle im Umfaltungsprozess von PrP^C zu PrP^{Sc} und damit in der Pathogenese und Verbreitung von Prionkrankheiten spielen.

Besonders der Einfluss von Kupfer auf verschiedene Vor- und Zwischenstufen der Umfaltung, PrP^{Sc} selbst und den Krankheitsprozess scheinen vielfältig und komplex zu sein.

Die Bedeutung der Kupferbindung für den Krankheitsprozess wird durch Untersuchungen der hereditären CJD Formen unterstrichen. So machen Mutanten des PrP-Gens, die für zusätzliche Oktarepeats kodieren, anfällig für die familiäre Form von CJD (64). Die Prionpathologie scheint darüber hinaus zu Störungen der Metallhomöostase zu führen, denn in den Gehirnen an CJD verstorbener Patienten fanden sich um 50% verminderte Cu²⁺- und 10fach erhöhte Mangan-Spiegel. Auch der Zinkgehalt des Gehirns war verändert (160).

Der Einfluss der Oktarepeatregion wird im Tierversuch unterstrichen. Prnp0/0 Mäuse, denen ein Prion-Gen ohne Oktarepeatregion in das Genom eingefügt wurde, zeigen eine deutlich verlängerte Inkubationszeit bis zur Entwicklung einer typischen Scrapie Symptomatik. Interessanterweise zeigen sie in der histopathologischen Untersuchung eine atypische Hirnpathologie. In den Mäusehirnen fehlen die typischen spongiformen Veränderungen. Trotzdem ist der für die Krankheit ursächliche Neuronenverlust deutlich ausgeprägt (161).

Auch die Kupferspiegel in Nahrung und Gewebe scheinen eine Rolle im Krankheitsverlauf zu spielen. Scrapieinfizierte Mäuse, denen Cu²⁺ zur Nahrung hinzugefügt wurde, blieben länger gesund, als Vergleichstiere, die mit der Nahrung eine normale Cu²⁺-Menge erhalten hatten. Auch in Zellkultur sammelte sich in Gegenwart von Kupfer weniger PrP^{Sc} in infizierten Neuroblastomzellen an (162). Im Kontrast zu diesen Ergebnissen berichtet eine weitere Arbeitsgruppe, dass scrapieinfizierte Mäuse im Tierversuch später symptomatisch wurden, wenn diese nach der Infektion mit Kupferchelatoren, die der Nahrung Kupfer entziehen, behandelt wurden (163).

Experimente mit isolierten Prionen belegen den Einfluss von Kupfer auf deren Struktur. Infektiosität und Proteinase-K-Resistenz von PrP^{Sc} kann durch Denaturierung mit Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl) stark vermindert werden. Nach Herausverdünnung des GdnHCl werden diese beiden Qualitäten teilweise wiedererlangt. In Gegenwart von Cu²⁺ werden Infektiosität und PK-Resistenz von denaturiertem PrP^{Sc} deutlich effektiver wiederhergestellt (164).

Es wurde publiziert, dass PrP nach Inkubation mit Cu²⁺ Proteinase K resistente Aggregate bildet, in denen das Prionprotein eine β -Faltblattform angenommen hat (165;166). Außerdem stabilisiert Cu²⁺ präformierte Amyloidfibrillen aus PrP gegen PK-Verdau (167).

Andere Untersuchungen zeigen, dass Cu²⁺ die Entstehung von amyloiden Fibrillen aus rPrP verhindert. Strukturuntersuchungen ergaben, dass dies auf eine Stabilisierung von PK-resistentem, nicht amyloidenen α -PrP zurückzuführen ist (167).

Neben Kupfer zeigt vor allem Mangan interessante Wirkungen auf PrP. Bei -4°C für 2 Wochen mit Mangan inkubiertes PrP entwickelte im Gegensatz zu Parallelproben, die mit Kupfer inkubiert wurden, PK-Resistenz. Gleichzeitig bewahren die mit Cu²⁺ inkubierten PrP-Proben ihre Superoxyddismutaseaktivität, wohingegen die Mn²⁺-Proben ihre Aktivität nach 2 Wochen verloren, was als weiterer Hinweis für die durch Mangan verursachte strukturelle Veränderung des PrP gelten kann. In der selben Versuchsreihe wurde auch von einem Effekt von Nickel berichtet, das in diesem Fall ähnlich wie Mn²⁺, aber schwächer wirkt (168).

1.7 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Die fluoreszenzbasierte Einzelmolekülspektroskopie wurde konzeptionell vor mehr als 30 Jahren zur Analyse chemischer Reaktionen und Messung von Diffusionsprozessen entwickelt (169;170). Durch die Messungen wird die Signalfuktuation erfasst und analysiert, die durch eine kleine Anzahl von Molekülen im Messvolumen ausgelöst wird.

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) basiert technisch auf einem konfokalen Mikroskop, in dem Laserlicht in ein Fokusbereich von ca. 10⁻¹⁵ Liter fokussiert wird (171;172). Im Fokus angeregte Fluorophore senden Photonen aus,

die mit einem hochempfindlichen Detektor erfasst werden (siehe 2.2.1). Erst dieser Aufbau ermöglichte die Anwendung des theoretischen Konzeptes auf die Detektion und Analyse einzelner Moleküle.

Mit FCS sind fluoreszenzmarkierte Teilchen in vielen Parametern wie Anzahl, Helligkeit und lateralem Diffusionskoeffizienten erfassbar (171). Dies ermöglicht eine Vielzahl von Anwendungen im Bereich der angewandten und Grundlagenforschung, so dass sich die FCS im Lauf der späten 90er Jahre zunehmend als Methode zur Untersuchung dynamischer Prozesse bei kleinsten, d.h. submikromolaren, Konzentrationen etablierte (173).

Die Entwicklung der zwei-Farben-FCS eröffnete weitere Möglichkeiten (172;173). Sie wird eingesetzt, um die Hybridisierung von DNA, Enzymkinetiken und Aggregationskinetiken zu verfolgen. Außerdem wurde sie auch zu einer Screeningmethode für homogene Assays weiterentwickelt (174;175). Typischerweise wird die FCS benutzt, um die Eigenschaften von kleinen monomeren Proteinen und Polynukleotiden bei nano- bis picomolaren Konzentrationen zu messen (176). Dabei wird der Messbereich durch die Konzentration der messbaren Teilchen in der Messlösung limitiert. Ein weiterer limitierender Faktor, der vor allem bei Messungen mit vergleichsweise großen Proteinaggregaten eine Rolle spielt, ist die mit steigender Partikelgröße sinkende Diffusionsgeschwindigkeit. Dadurch finden Fokusdurchtritte der Teilchen seltener statt.

Um auch große, seltene Teilchen erfassen zu können, wurde die SIFT-Technik (Scanning for Intensely Fluorescent Targets) entwickelt, mit der helle Teilchen auch in weit subpicomolaren Konzentrationen erfasst werden können (177). Durch Scannen der Probe mit einer Fokusgeschwindigkeit von 1-10 mm/s, wird die Teilchenanzahl, die den Fokus passiert, gegenüber der statischen Messung deutlich erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode bei der Detektion von PrP^{Sc} mit Antikörpern sensitive und hoch spezifische Ergebnisse liefert (178).

Die nach Adaptation der Technik an dieses Arbeitsfeld erreichte gute Detektierbarkeit von Prionen und die große Zahl an erfassbaren Parametern zeigen, dass FCS und SIFT für den Einsatz bei der Untersuchung von Wechselwirkungen und Aggregationsprozessen von Proteinen besonders geeignete Methoden sind. Diese Aggregationsprozesse spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, zu denen neben CJD zum Beispiel auch die Alzheimersche Erkrankung und der Morbus Parkinson gehören. FCS und SIFT sind

die für die vorliegende Arbeit zentralen Untersuchungsmethoden. Die theoretischen Grundlagen sowie die technische Realisierung sind unter Punkt 2.2. ausführlich dargestellt.

1.8 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Mechanismen und Bedingungen näher zu charakterisieren, die zur *de novo* Aggregation von Prionprotein, bzw. zur Anlagerung von rekombinantem Prionprotein an PrP^{Sc} Aggregate führen. Besonderes Gewicht wurde dabei auf die Untersuchung der Einflüsse von Metallionen auf diese Prozesse gelegt. Damit sollte dazu beigetragen werden, den Mechanismus der Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} aufzuklären und die Pathogenese von Prionkrankheiten besser zu verstehen.

Folgende Fragestellungen sollten untersucht werden:

- Zunächst sollte das Aggregationsverhalten von rekombinantem humanem Volllänge PrP im SDS System untersucht werden, um dies mit den publizierten Eigenschaften des gut untersuchten PrP⁹⁰⁻²³¹ zu vergleichen.
- Die konfokale Einzelmolekülspektroskopie sollte auf ihre Eignung zur Bearbeitung der Fragestellung evaluiert werden.
- Es sollte eine funktionelle Charakterisierung des SDS Systems erfolgen. Insbesondere die Frage, ob der Aggregationsbeginn ausgehend von monomerem PrP oder von PrP-Oligomeren günstiger für die Aggregation ist, sollte im Hinblick auf die in 1.5 genannten Hypothesen zu Prionpropagation untersucht werden. Außerdem sollte die funktionelle Charakterisierung der entstehenden Aggregate eine Untersuchung auf Amyloidbildung und PK-Resistenz der entstehenden Aggregate umfassen.
- Es sollte untersucht werden, ob der Methionin- Valin- Polymorphismus der Aminosäure 129 des Prionproteins einen Einfluss auf die *de novo* Aggregation hat.

- Der Einfluss von Schwermetallionen in Lösung auf die *de novo* Aggregation und die Sekundärstruktur von rekombinantem Prionprotein sollte untersucht werden. Dabei sollte der Konzentrationsbereich, bei dem eine funktionelle Interaktion stattfindet eingegrenzt werden.
- Die manganinduzierten PrP Aggregate sollten auf Bedingungen unter denen sie entstehen, Bedingungen unter denen sie zerfallen, und die Rolle, welche die Histidin-abhängigen Kupferbindestellen in ihrer Entstehung spielen, charakterisiert werden.
- Schließlich sollten die gewonnenen Ergebnisse in Beziehung zur Pathogenese von Prionkrankheiten in vivo und speziell zur Interaktion von rPrP und Prion Rods gesetzt werden, und die Frage bearbeitet werden, ob Schwermetallionen und EDTA einen Einfluss auf die Anlagerung von rekombinantem Prionprotein an *Prion-Rods* haben.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

Im Folgenden sind die Bezugsquellen der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Materialien und Proteine aufgeführt. Alle verwendeten Chemikalien besaßen die höchste kommerziell erhältliche Reinheit. Einmal verwendbare Materialien (Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) wurden vor Verwendung autoklaviert. Basis der verwendeten Lösungen war mit einem Milli-Q Synthesis A10 System (Millipore, MA, USA) aufbereitetes Wasser.

Chemikalien	Firma
Acrylamid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
APS (Ammoniumpersulfat 10%)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, Deutschland)
CoCl ₂	Sigma (St. Louis, USA)
CPD-Star Chemilumineszenz System	Tropix (Bedford, USA)
CuCl ₂	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DOSPA (2,3-Dioleoyloxy- <i>N</i> -[2(spermine-carboxamido)ethyl]- <i>N,N</i> -dimethyl-1-propanaminium Trifluoracetat)	GibcoBRL (Gaithersburg, USA)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycin	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Harnstoff	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Imidazol	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
IPGT (Isopropyl β-D-1-Thiogalaktopyranosid)	PeQlab (Erlangen, Deutschland)
K ₂ HPO ₄	Merck (Darmstadt, Deutschland)
KH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt, Deutschland)
MES (2-[<i>N</i> -Morpholino]ethansulfonsäure)	Sigma (St. Louis, USA)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)

MgCl ₂	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Milchpulver Blotting Grade	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
MnCl ₂	Merck (Darmstadt, Deutschland)
MOPS (3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Na ₂ CO ₃	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Na ₂ HPO ₄	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaCl	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NaH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natronlauge (NaOH)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
NiCl ₂	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NP-40	Calbiochem, Nottingham (UK)
PBS (10mM Phosphatpuffer, pH 7,4; 140mM NaCl; 2,7 mM KCl)	Calbiochem, EMB Biosciences (San Diego, USA)
PMSF (Phenylmethylsulphonylfluorid)	Sigma (St. Louis, USA)
Saccharose	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Salzsäure (HCl)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sarkosyl (N-Laurylsarkosin Natriumsalz)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Sephadex G15	Pharmacia Biotech (Schweden)
Sephadex G25	Pharmacia Biotech (Schweden)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin)	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)
TRIS-(2-Carboxyethyl)-Phosphine-Hydrochlorid	Fluka-Chemie (Buchs, Schweiz)
Triton X-100	Sigma (St. Louis, USA)
Tween-20	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
ZnCl ₂	Merck (Darmstadt, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (Steinheim, Deutschland)

Materialien

Assay Chip 24	Evotec Technologies (Hamburg, Deutschland)
Bioplate-384	Evotec Technologies

Bioplate-96	Evotec Technologies
GB 004 Gel-Blotting-Papiere	VWR (Ismaning, Deutschland)
Hyperfilm ECL	Amersham Pharmacia (Piscataway, USA)
Microspin Säulen	MoBiTec (Göttingen, Deutschland)
Nitrocellulosemembran (0,45µm)	Bio-Rad (Hercules, USA)
Polyprep Säulen	Bio-Rad (Hercules, USA)
Quarzküvetten	Perkin Elmer (Wellesley, USA)
Reaktionsgefäß 1500 µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäß 200 µl	Kisker (Steinfurt, Deutschland)
Röhrchen, 15 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Röhrchen, 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
TESAFilm	TESA (Hamburg, Deutschland)
Gelelektrophorese-Apparatur: Owl P8DS	VWR (Ismaning, Deutschland)
Blot-Apparatur: Semiphor Transphor	Amersham Pharmacia (Piscataway, USA)
Entwicklungsmaschine: Optimax TR	MS Laborgeräte (Wiesloch, Deutschland)

Fluoreszenzfarbstoffe

Alexa488 (Alexa Fluor-488-O-Succinimidylester)	Molecular Probes (Eugene, USA)
Alexa647 (Alexa Fluor-647-O-Succinimidylester)	Molecular Probes (Eugene, USA)
ThT (Thioflavin T)	Sigma (St. Louis, USA)

Biologische Materialien

Antikörper 3F4 (monoklonaler muriner AK)	(179)
Antikörper L42 (monoklonaler muriner AK)	R-Biopharm (Darmstadt, Deutschland)
Anti-Maus IgG, AP-gekoppelt, Ziege, monoklonal	Dianova (Hamburg, Deutschland)
CDP-Star Substrat-Lösung	Roche (Mannheim, Deutschland)
Molekulargewichtsstandard: Prestained SDS-PAGE standard – broad range	Bio-Rad (Hercules, USA)

Proteinase K

Merck (Darmstadt, Deutschland)

Puffer für die rPrP Markierungsreaktion

KPi	10mM Kaliumphosphatpuffer pH=7,2
NaPi NP40	10mM Natriumphosphatpuffer pH=6 mit 0,1% NP40

Puffer für die rPrP *in vitro* Konversion, FCS- und CD-Messungen

NaPi	10mM Natriumphosphatpuffer pH=7,2
NaPi+	10mM Natriumphosphatpuffer pH=7,2 mit 0,2% SDS

Lösungen und Puffer zur Western Blot-Analyse

5× Probenpuffer	15 % SDS, 40 % Saccharose, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 6,8, 20 % β-Mercaptoethanol, 0,2 % Bromphenolblau
Block-Puffer	3 % Magermilchpulver, 0,1 % Tween in PBS
Blotting-Puffer	0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS, 20 % Methanol
CLZ-Puffer	20 mM Tris/HCl pH 9,8, 1 mM Magnesiumchlorid
Laufpuffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS
PBST	PBS mit 0,1 % Tween
Sammelgel	5 % Acrylamid, 0,125 M Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS und 0,07 % TEMED
Trenngel	10 % Acrylamid, 0,375 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,035 % TEMED

Alle im Weiteren aufgeführten Formen des rekombinanten Prionproteins wurden von Dr. Uwe Bertsch und Brigitte Kraft vom Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU München hergestellt. Die Hirngewebeproben zur Gewinnung von humanem PrP²⁷⁻³⁰ wurden mir von der Brain Bank München zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigung der humanen Prionen war nur durch Anleitung von Frau Dr. Petra Weber möglich und erfolgte nach einem Protokoll von Safar et al. (102). Das gereinigte murine PrP^{Sc} erhielt ich von Herrn Niklas Piening (Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU München).

Prion Protein

Humanes Prion Protein 23-231 129 V	ZNP, LMU München, Deutschland
------------------------------------	-------------------------------

Humanes Prion Protein 23-231 129 M	ZNP, LMU München, Deutschland
Murines Prion Protein 23-231	ZNP, LMU München, Deutschland
Humanes PrP ²⁷⁻³⁰ (=prion rods)	ZNP, LMU München, Deutschland
Murines PrP ^{Sc} (Strain: ME7)	ZNP, LMU München, Deutschland

2.2 FCS und SIFT

FCS (Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie) und SIFT (Scanning for Intensely Fluorescent Targets, Messmethoden zur Detektion von Einzelmolekülen und Aggregaten), sind die zentralen Messmethoden dieser Arbeit. Das theoretische Konzept der FCS wurde von P. Schwille ausführlich beschrieben (180). Die theoretische Basis der SIFT-Technik findet sich in allen Einzelheiten bei Bieschke und Giese (177).

2.2.1 FCS, Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Die FCS beruht auf einer Intensitätsanalyse des Fluoreszenzsignals aus einem offenen Volumenelement, das durch die konfokale Abbildung eines oder mehrerer in einem Fokus gebündelter Anregungslaser definiert wird. Die FCS erfasst fluoreszierende Teilchen in Lösung mit einem stationären Fokus. Die Auswertung des gemessenen Signals kann mit verschiedenen Analyseverfahren wie Autokorrelationsanalyse (siehe 2.2.5.1) und Kreuzkorrelationsanalyse (siehe 2.2.5.2) durchgeführt werden. Auf diese Weise können aus nur einer Messung Informationen zu Teilchenanzahl, Diffusionsgeschwindigkeit und spezifischer Helligkeit der Teilchen in Lösung gewonnen werden. Anhand der Anzahl der in der Messlösung detektierten Teilchen kann deren Konzentration bestimmt werden. Diffusionsgeschwindigkeit und spezifische Helligkeit der Einzelpartikel lassen einen u.a. Schluss auf die Größe der Teilchen zu (siehe 2.2.5).

2.2.2 SIFT (Scanning for intensely fluorescent targets)

Für das SIFT-Verfahren wird ein mobiler Fokus verwendet, der pro Messung einmal durch das Messgefäß mäandriert. Im verwendeten Insight II Reader wird dieses Ziel durch einen Beams Scanner realisiert (181;182). Durch den mobilen Fokus wird das untersuchte Volumen erheblich erhöht. Dies erhöht die Sensitivität der Messtechnik gegenüber sehr großen, seltenen und langsamen Teilchen, wie zum Beispiel Proteinaggregaten, stark. Die untere Detektionsgrenze von SIFT liegt bei Konzentrationen im femtomolaren Bereich. Die Detektionsgrenze hängt stark von der Helligkeit der gesuchten Teilchen ab und liegt für sehr helle Teilchen sogar im attomolaren Bereich (177;178).

Das Fluoreszenz-Signal wird in sukzessive aufgezeichnete Zeitintervalle konstanter Länge (im Mikro- bis Millisekundenbereich), sogenannten „bins“ unterteilt. Anhand der Intensitätsverteilung kann das hochintense Signal der mehrfach markierten Zielmoleküle vom Hintergrundsignal analytisch abgetrennt werden. Für die großen, sehr langsam diffundierenden Zielmoleküle wird die mittlere Aufenthaltsdauer im Fokus nicht mehr durch die Diffusionszeit (τ_{Diff}), sondern im Wesentlichen durch die Scangeschwindigkeit bestimmt, weswegen alle Zielmoleküle auf der gleichen Zahl bins abgebildet werden. Daher ist die Anzahl hochintenser bins ein direktes Maß für die Konzentration hochmarkierter Zielmoleküle.

Außerdem erlaubt der Insight II Reader zwei Farben SIFT, die simultane Analyse zweier im selben Volumenelement messbarer, in verschiedenen Wellenlängen fluoreszierender Sonden. In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten wurden die so gewonnenen Daten in ein entsprechend zweidimensionales Array geschrieben und als Intensitätshistogramm dargestellt, in dem die Zahl der bins mit gleichzeitig hohen Werten für beide Farben ein Maß für die Zahl und Konzentration spezifisch mit zwei unabhängigen Sonden markierter Zielmoleküle ist. Dies lässt sich zum Beispiel einsetzen um die relative Bindung zweier verschiedener Sonden in einem homogenen Assay unter definierten Pufferbedingungen zu ermitteln und unter geeigneten Bedingungen jeweils charakteristische Werte für verschiedene Zielmolekültypen zu gewinnen. Das mit dem mobilen Fokus aufgenommene Signal lässt sich mit der Kreuzkorrelationsanalyse (siehe 2.2.5.2), der FIDA Analyse (siehe 2.2.5.3) und der SIFT Auswertung (siehe 2.2.5.4) analysieren.

2.2.3 Messaufbau

Alle Messungen dieser Arbeit, die auf konfokaler Einzelmolekülspektroskopie basieren, wurden mit Insight II Readern der Firma Evotec OAI aus Hamburg, Deutschland, durchgeführt. Mit diesen Geräten sind FCS- und SIFT-Messungen durchführbar. Diese Reader sind im Grundaufbau konfokale Mikroskope. In ihnen wird Laserlicht, in diesem Fall Licht eines Argon-Ionen-Lasers der Wellenlänge 488nm und eines Helium-Neon-Lasers der Wellenlänge 633nm, im Messgefäß des Probenträgers zu einem Fokusvolumen von etwa einem Femtoliter fokussiert.

Die in den Insight II Readern verwendeten Probenträger, 24-Well Probenträger sowie 96- und 384-Well Platten der Firma Evotec, besitzen einen Glasboden und sind mit einem Metallrahmen zum Schutz gegen Verformungen ausgestattet. Die in den Probenträgern befindlichen Messgefäße fassen ein Volumen von jeweils 30µl.

Zur optischen Kontrolle der Position des Laserfokus sind die FCS-Reader mit einer über Spiegel mechanisch zuschaltbaren Videokamera ausgestattet. Mit dieser wird der Focus auf seine Idealposition, die sich ca. 150µm über dem Glasboden der Probeträger in der Messlösung befindet, eingestellt.

Die Brennpunkte beider Laser bilden das offene Messvolumen der FCS. Aus physikalischen Gründen ist der Radius des roten Fokus etwas größer als der Radius des grünen. Die Mittelpunkte beider Foci weichen um ca. 50nm voneinander ab. Damit liegt der grüne Fokus noch vollständig innerhalb des roten Fokus.

Die im Fokusvolumen angeregten fluoreszierenden Teilchen senden Photonen aus, die über zwei dichroische Spiegel und ein 70µm großes Pinhole zu zwei Einzelphotonendetektoren, sogenannten Avalanche-Photo-Dioden (APD), geleitet werden (siehe Abb. 2.1).

Die APDs liegen bis 1000kHz Gesamthelligkeit in einem Bereich, in dem sie lineare Messergebnisse liefern. Um eine gute Auswertbarkeit der Messungen zu gewährleisten, sollte dieser Bereich nicht verlassen werden.

Die Messapparatur ist über die Steuerungssoftware FCS+plus_control der Firma Evotec steuerbar. Mit ihr kann man sowohl der mobile Probenträgere Tisch, als auch über Schrittmotoren das Pinhole bewegen.

Da die Insight II Reader Wasserimmersionsobjektive verwenden, besitzen sie eine zeitgesteuerte automatische Immersionswasserzufuhr.

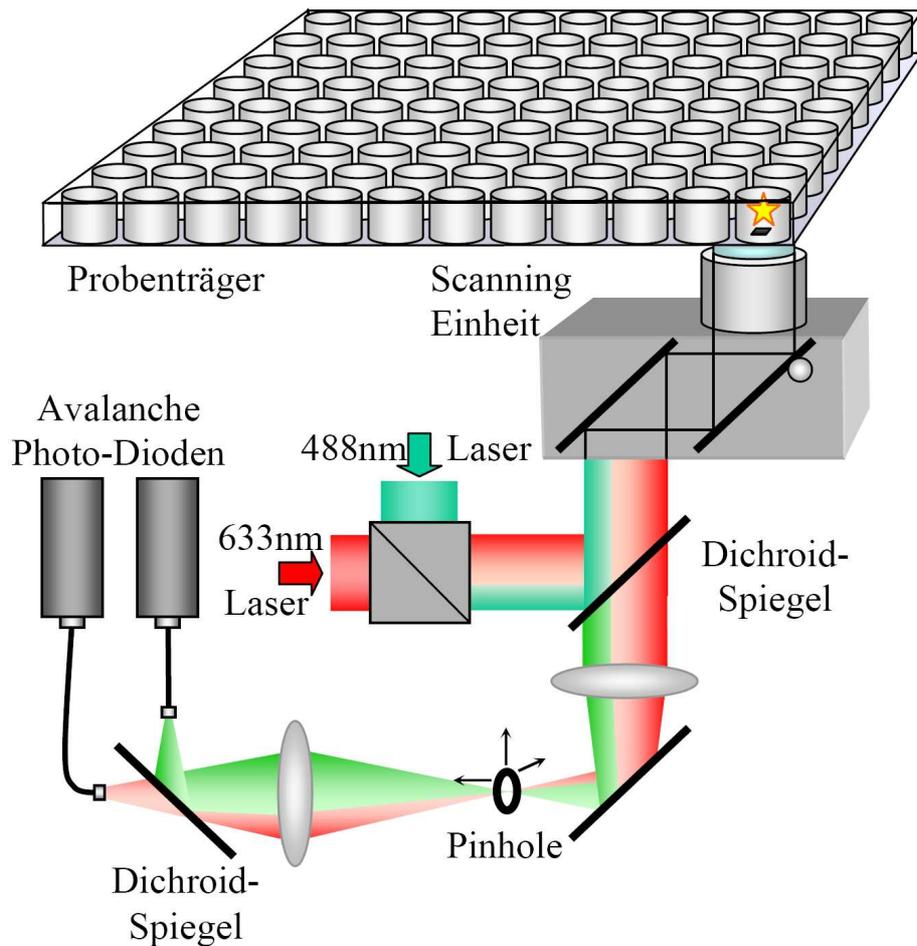


Abb. 2.1. Messaufbau eines zwei-Farben-FCS-Readers mit Scanning Einheit für SIFT Messungen und einem Multiwell-Probenträger. Das Laserlicht wird über einen Dichroic-Spiegel, der nur Licht einer bestimmten Wellenlänge reflektiert, und die Optik eines konfokalen Mikroskopes in die Probe fokussiert. Das Fluoreszenzlicht kommt über den selben Weg zurück, passiert jedoch den zweifarbenen Spiegel und wird über ein Pinhole zu Photonendetektoren, den Avalanche-Photo-Dioden, geleitet.

2.2.4 Messbedingungen und Justage

Für die Inbetriebnahme und Justage der Reader wurde stets nach einem festen Schema vorgegangen.

Die Laser wurden 20 Minuten vor Beginn der Justage eingeschaltet, weil sie erst nach dieser Aufwärmungszeit ihre Anregungsenergie stabil halten. Um die Messungen im linearen Detektionsbereich der APDs durchführen zu können (siehe 2.2.3), wurden für alle Messungen Anregungsenergien von $200\mu\text{W}$ für den 488nm Laser und von $300\mu\text{W}$ für den 633nm Laser gewählt.

Neben der Überprüfung der Laserleistung ist die Justage des Pinholes und der Glasfaserleitungen der wichtigste Teil der Justage. Sie müssen vor jeder Messung neu justiert werden. Zur Justage wurde eine Messlösung aus freiem Farbstoff mit

bekannten Messparametern verwendet. Anhand des Vergleiches mit diesen Parametern wurde die Pinholeposition und die Position der Glasfaserleitungen manuell oder mit Hilfe des Kontrollprogrammes (siehe 2.2.1) so eingestellt, dass man eine optimale Fokusabbildung erzielt.

Ein für die Readereichung bedeutender Kontrollparameter ist die CPP, „counts per particle“, ein Wert, der die Helligkeit der Farbstoffmoleküle beschreibt (siehe 2.2.5.1), und daher unabhängig von der jeweiligen Farbstoffkonzentration der Eichlösung ist.

Anhand der Diffusionsgeschwindigkeit (siehe 2.2.5.1) lässt sich die Abbildungsschärfe des Fokus beurteilen, da Teilchen scheinbar langsamer durch den Fokus diffundieren, wenn dieser unscharf abgebildet wird.

Die Axis Ratio (siehe 2.2.5.1) drückt die Fokusform des Laserstrahlfokus im Verhältnis Länge zu Breite aus. Zu große oder zu kleine Werte der Axis Ratio weisen auf eine schlechte Justage des Messgerätes hin.

Nach jeder Inbetriebnahme und Justage des Messgerätes wurde eine Justagemessung mit der bekannten Farbstofflösung durchgeführt. Die Messwerte wurden zu Kontrollzwecken notiert.

Für die Messung selbst wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Chemikalien mit Ausnahme der Fluoreszenzfarbstoffe nicht fluoreszierten. Für die Messdauer wurde, um eine gute Auswertbarkeit der Daten zu gewährleisten, darauf geachtet, dass sie nicht weniger als das Tausendfache der Diffusionszeit der langsamsten Teilchen beträgt. Für alle FCS-, SIFT- und Justagemessungen dieser Arbeit wurden Messzeiten von 20 Sekunden verwendet. Ausnahmen sind die unter 2.7 beschriebenen Messungen mit Prion-Rods, die mit Messzeiten von 15 Sekunden durchgeführt wurden, sowie die Messungen in 3.1.8, die zur besseren zeitlichen Auflösung der Kinetik eine Messzeit von 10 Sekunden hatten.

2.2.5 Auswertungsverfahren

2.2.5.1 Autokorrelationsanalyse

Das Prinzip der Autokorrelation ist das Folgende: Die Messzeit jeder Einzelmessung wird in Zeitfenster von 50ns unterteilt. Diese Zeitfenster können entweder den Zahlenwert 1 oder den Zahlenwert 0 annehmen, je nachdem ob ein oder mehrere

Photonen detektiert wurden oder nicht. Man erhält also eine Zahlenreihe von aufeinanderfolgenden Einsen und Nullen. Jede dieser Einsen und Nullen enthält für ein Zeitfenster von 50ns die Aussage „mindestens ein Photon detektiert“ = 1, oder „kein Photon detektiert“ = 0. Für den Selbstvergleich, „auto-“ Korrelation, wird jedes Zeitfenster mit anderen Zeitfenstern, die in Zeitabständen aus Vielfachen des kleinsten Abstandes von 50ns entfernt liegen, multipliziert. Die verwendeten Zeitabstände nennt man Korrelationszeiten. Die Multiplikation der Zeitfenster wird mit verschiedenen Korrelationszeiten über den gesamten Datensatz durchgeführt. Dabei variieren die Korrelationszeiten von 50ns, bei denen also benachbarte Zeitfenster multipliziert werden, bis zu mehreren Sekunden. Die Ergebnisse der Multiplikationen werden für jede Korrelationszeit einzeln addiert. Diese Summe gibt die Häufigkeit, mit der in einer Korrelationszeit Photonen detektiert werden, wieder. Nach Normierung der Werte auf die durchschnittliche Häufigkeit, mit der pro Korrelationszeit Photonen detektiert werden, werden die Ergebnisse auf der Y-Achse eines Graphen, der die Korrelationszeiten auf der X-Achse trägt, aufgetragen. Die X-Achse dieses Graphen wird typischerweise logarithmisch angezeigt.

Zur weiteren Auswertung wird an die Autokorrelationsfunktion eine andere, mathematisch bekannte, Kurve angepasst. Die aus der Autokorrelationsfunktion zu berechnenden Parameter sind für diese Kurve bekannt. Die angepasste Kurve wird im Englischen „Fit“ genannt, im Folgenden werde ich diese Nomenklatur übernehmen.

Bei der Angabe der aus der Autokorrelationsfunktion berechneten Parameter wird angenommen, dass diese mit der Kurve des Fits identisch ist. Kontrolliert wurde diese Annahme bei der Auswertung anhand des Qualitätsparameters χ^2 , der den Unterschied zwischen Daten und Fit und damit die Glaubwürdigkeit der Parameter angibt. χ^2 wird als Residualkurve angezeigt, die idealer Weise zufällig um Null verteilt liegt (siehe Abb. 2.2).

Die anhand des Fit aus der Autokorrelationsfunktion bestimmten Parameter sind unter anderem die mittlere Diffusionszeit der Partikel, die mittlere Helligkeit der Partikel, genannt CPP (= counts per particle), und die Partikelzahl. Die Gesamthelligkeit der Probe I_{tot} wird unabhängig von der Autokorrelationsfunktion bestimmt.

Die mittlere Diffusionszeit (τ_{Diff}) der Partikel ist definiert als der halbmaximaler Wert der an die Autokorrelationsfunktion angefitzten Kurve auf der Y-Achse (s.o.). Für

globuläre Partikel gleicher Dichte, wie es Proteinmoleküle näherungsweise sind, lässt sich aus der mittleren Diffusionszeit lässt sich so die ungefähre Masse der Partikel berechnen. Dabei gilt $\tau_{\text{Diff}} \sim \sqrt[3]{M}$. Auf diese Weise kann also das Molekulargewicht (M) aus der Autokorrelationsfunktion berechnet werden, wobei aus der Formel hervorgeht, dass sich die Masse eines Moleküls bei doppelter Diffusionszeit verachtfacht. Bei Aggregationsprozessen lassen sich auf diese Weise die Anzahl der Monomere in einem Aggregat abschätzen.

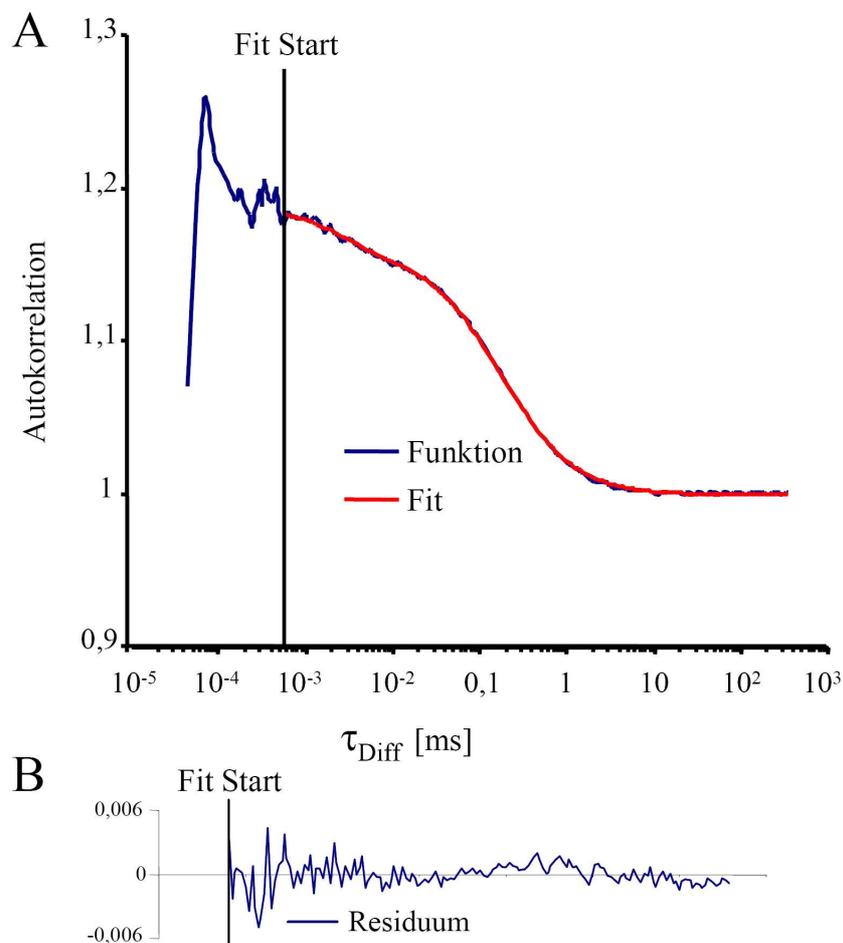


Abb. 2.2. A: Typische Autokorrelationsfunktion einer FCS Messung. Die Y-Achse zeigt die Autokorrelationswerte und die X-Achse die Korrelationszeiten an. Die rote Kurve stellt den Fit dar. B: Zeigt die Residualkurve, welche die Abweichung der Autokorrelationsfunktion vom Fit darstellt.

Die Partikelzahl (N) ist besonders für Aggregationsstudien ein interessanter Wert, da die Teilchenanzahl während der Aggregation abnimmt, wohingegen die Parameter für die Teilchengröße wie CPP (s.u.) und Diffusionsgeschwindigkeit zunehmen. Die inverse Amplitude der Autokorrelationsfunktion entspricht nach Einführung einer Normalisierungskonstante der Partikelzahl (siehe Abb. 2.2).

Die Gesamtintensität I_{tot} ist ein Wert, der sich direkt aus dem vom Einzelphotonendetektor gemessenen Wert hervorgeht. Die Intensität ist der in Kilohertz (kHz) angegebene Mittelwert der Photonenzählrate des verwendeten Detektors.

CPP (Counts Per Particle) ist ein Wert zur Beschreibung der mittleren Helligkeit der einzelnen Partikel. Er berechnet sich aus der Intensität des gemessenen Signals pro Anzahl der Partikel. Die CPP ist besonders für die Eichung des Messgerätes ein wichtiger Parameter, da die CPP von den Farbstoffkonzentrationen in der Eichlösung weitgehend unabhängig ist und sich daher gut mit Vorwerten vergleichen lässt.

Ein weiterer wichtiger Signalanteil ist die Triplet-Fraktion. Die Herkunft der Triplet Fraktion erklärt sich anhand der Vorgänge bei der Entstehung Fluoreszenz. Fluoreszenz entsteht, wenn eines der Elektronen des fluoreszierenden Moleküls durch die Energie des Laserstrahls angeregt seine Elektronenschale verlässt, in eine höher gelegene Elektronenschale angehoben wird, und bei der Rückkehr auf das Ausgangsenergieniveau die überschüssige Energie u.a. in Form eines Photons wieder abgibt. Das energetische Zurückfallen findet sehr schnell, im Mittel nach nur 1-6 ns, statt, so dass ein Molekül, während es sich im Fokus befindet, viele tausend Anregungszyklen durchlaufen kann. Die dabei ausgesendeten Photonen haben eine etwas geringere Energie und eine etwas größere Wellenlänge als die für die Anregung benötigte Laserenergie. Diesen Unterschied nennt man Stokes-Shift. Er ist für jeden Fluoreszenzfarbstoff hinsichtlich benötigter Anregungsenergie und schließlich ausgesandten Photonen charakteristisch. Statt regulär in die höhere Elektronenschale angehoben zu werden, kann das Elektron jedoch mit einer unter anderem von der Anregungsintensität und den Eigenschaften des Fluoreszenzfarbstoffes abhängigen Wahrscheinlichkeit in den sogenannten Triplet – Zustand übergehen. Er dauert mit ca. 2- 10 μ s in etwa tausend mal länger an als der normale Anregungszustand. Die mittlere Verweildauer der Elektronen im Triplet-Zustand nennt man Triplet-Zeit (T_{trip}). Beim Verlassen des Triplet-Zustandes wird kein Photon ausgesendet, also ist der Fluoreszenzfarbstoff während dieser Zeit dunkel.

Anhand des Fittes lässt sich auch die Fokusform der Laser und damit das Messvolumen beschreiben. Dies geschieht mit der Axis Ratio (AR). Die Axis Ratio ist das Verhältnis der Längsachse zur Querachse des länglichen Fokus. Die AR ist ein Parameter zur Beurteilung der Justage des Messgerätes.

Neben einem Fit für nur eine Komponente kann man als Berechnungsgrundlage auch annehmen, dass die Probe mehrere Teilchenspezies (=Komponenten) enthält. Aus einem Mehrkomponenten-Fit erhält man pro Komponente eine eigene Diffusionszeit und ihren prozentualen Anteil an der Gesamtmenge der Teilchen. Die Summen der Prozentwerte aller Teilchenspezies eines Mehrkomponenten-Fit ergeben somit immer 100% (169;176;183-186).

2.2.5.2 Kreuzkorrelationsanalyse

Die Kreuzkorrelationsanalyse ist besonders geeignet, um sensitiv die Entstehung oder Auflösung von Aggregaten quantitativ zu verfolgen (187). Beide, das mit stationärem Fokus detektierte Signal und das SIFT-Signal in gescannten Messungen, können mit Kreuzkorrelationsanalyse evaluiert werden. Dabei bieten sich gescannte Messungen wegen der größeren Sensitivität für große Moleküle mit niedriger Diffusionsgeschwindigkeit, wie Proteinaggregate, an.

Im Gegensatz zu der oben dargestellten Autokorrelationsanalyse (siehe 2.2.5.1) besteht die Zwei-Farben-Kreuzkorrelationsanalyse nicht aus dem Selbstvergleich eines Signals, sondern im Vergleich unabhängig voneinander detektierter Signale zweier verschiedenartig markierter Partikelspezies. Signalmuster. Dieses Analyseverfahren führt zu einer sehr hohen Detektionsspezifität für Aggregate und reduziert Messartefakte.

Da der Übergang von Elektronen in den Triplettzustand zufällig und daher unabhängig in beiden Signalspuren stattfindet, hat das Kreuzkorrelationssignal keinen Triplettanteil.

Die Kreuzkorrelation kann analog zur Autokorrelation als Graph aufgetragen werden. Die Amplitude dieser Kurve auf der Y-Achse, die Kreuzkorrelationsamplitude, ist unter der Annahme, dass sich die Gesamthelligkeit im Verlauf der Messung nicht ändert, direkt proportional zu der Konzentration doppelmarkierter Teilchen, die durch den Fokus diffundieren (siehe Abb. 2.3). Bei Kenntnis der Amplituden der Autokorrelationsfunktionen der beiden einzelmarkierten Teilchenspezies, $G_1(t)$ und $G_2(t)$, und damit ihrer Konzentrationen, lässt sich aus der Kreuzkorrelationsamplitude, $G_X(t)$, die absolute Konzentration der doppelt markierten Teilchen in Lösung berechnen.

Aufgrund der hervorragenden Eignung dieser Methode für die von mir bearbeitete Fragestellung wurden die Aggregationsprozesse des Prionproteins zum überwiegenden Teil durch Messung der Kreuzkorrelationsamplitude charakterisiert (173;184;187).

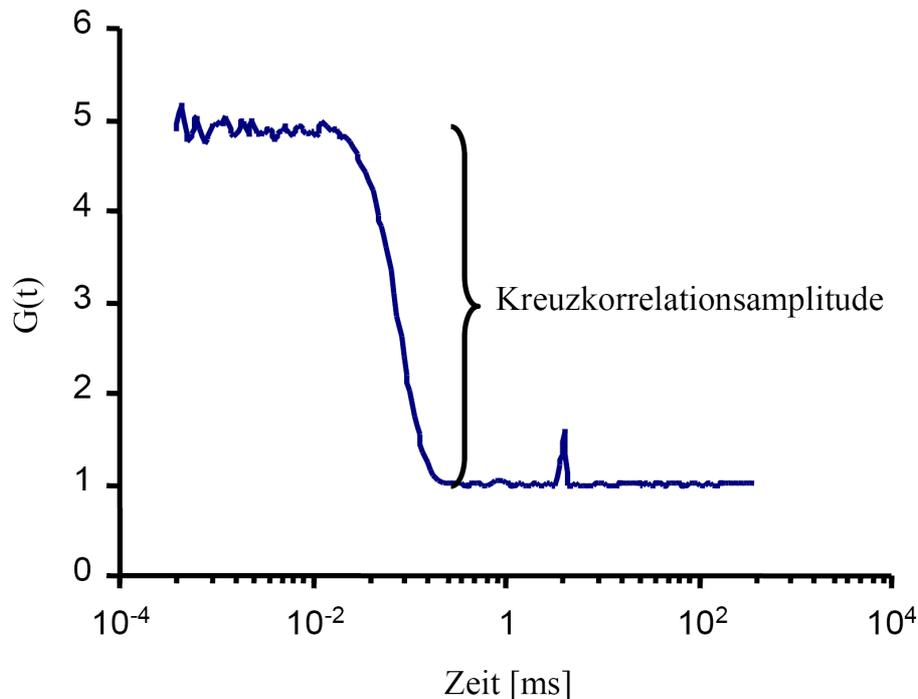


Abb. 2.3. Typische Kreuzkorrelationsfunktion. Die X-Achse gibt die Kreuzkorrelation $G(t)$ an. Die Y-Achse gibt die Zeit in Millisekunden an. Besonderen Stellenwert für meine Arbeit hat die mit der Schweifklammer gezeigte Kreuzkorrelationsamplitude. Der Kehrwert der Kreuzkorrelationsamplitude ist direkt proportional zur Anzahl der zweifarbig markierten Aggregate in der gemessenen Probe. Daher ist die Kreuzkorrelationsamplitude ein hervorragender Parameter, um Aggregationsprozesse von mit zwei verschiedenen Farben markierten Teilchen zu verfolgen.

2.2.5.3 FIDA und 2D-FIDA

FIDA (Fluorescence Intensity Distribution Analysis) ist eine Methode zur Analyse der spezifischen Helligkeit einzelner fluoreszierender Moleküle in Proben mit heterogenen Helligkeitsprofilen. Wir benutzten FIDA um mit SIFT (siehe 2.2.2) gewonnene Daten zu analysieren, da sich die mit dem mobilen Fokus ermittelten Daten nicht sinnvoll mit der Autokorrelationsanalyse auswerten lassen.

Die Basis der FIDA Analyse ist die statistische Analyse von Photonenzahlen, die in Zeitfenstern von typischerweise $40\mu\text{s}$ während der Messung erfasst werden. Diese Zeitfenstern werden im Folgenden "bins" genannt (siehe 2.2.2).

Aus allen detektierten Photonen werden durch einen FIDA Multikomponentenfit verschieden fluoreszierende Partikelspezies aufgelöst.

Die Identifikation der einzelnen Partikelspezies wird auf der Basis der unterschiedlichen spezifischen molekularen Helligkeiten der Partikel erreicht. Für jede Komponente des Partikelgemisches gilt: I_x ist die Intensität der Fluoreszenz [kHz], c_x ist die Konzentration, also die durchschnittliche Anzahl der Teilchen im Fokusvolumen, und q_x ist die spezifische Helligkeit [kHz] der molekularen Fluoreszenz, also die von jedem einzelnen Teilchen verursachte mittlere Fluoreszenz. Daraus folgt, dass jede Partikelart, die eine charakteristische von den anderen verschiedene Fluoreszenz zeigt, im Fit nach ihrer spezifischen Helligkeit (q) und Konzentration (c) charakterisiert wird (siehe Abb. 2.4). Dabei entspricht die spezifische Helligkeit der CPP und die Konzentration der Partikelzahl der Autokorrelationsanalyse (2.2.5.1).

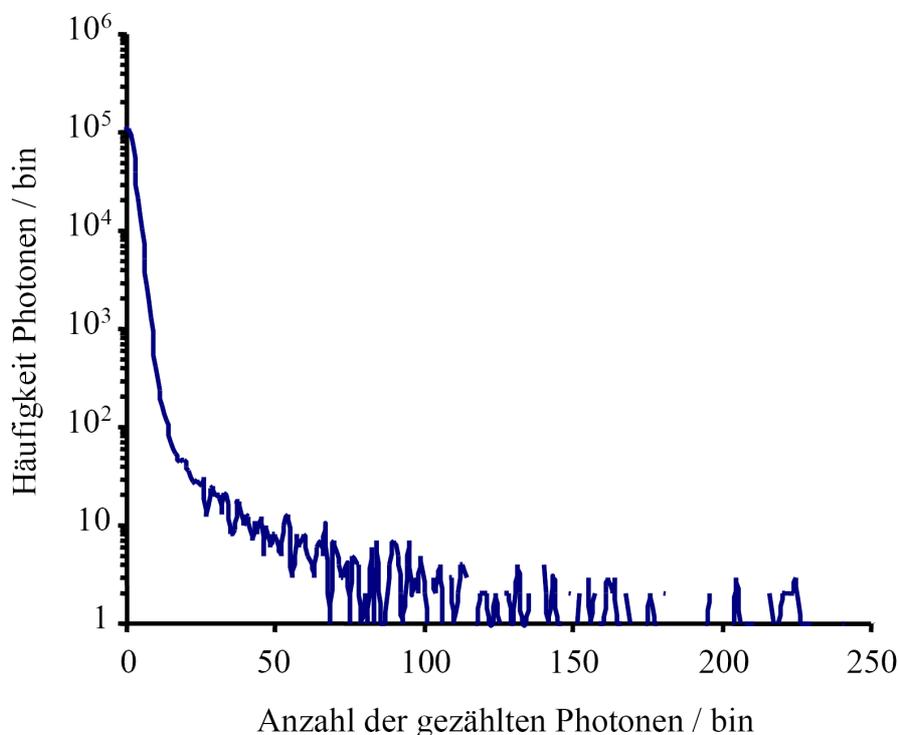


Abb. 2.4. Typische FIDA Kurve einer Messung mit Beams scanner. Die X-Achse zeigt die Anzahl der pro $40\mu\text{s}$ detektierten Photonen, und die Y-Achse die Häufigkeit dieser Ereignisse an. An der Kurve selbst erkennt man, dass die Probe einige Aggregate enthält, für die bis über 200 Photonen pro Bin detektiert sind.

Die zur Analyse der Daten verwendete Auswertungssoftware, FCS+plus_Eval 2.0 der Firma Evotec OAI, erlaubt die gleichzeitige Auswertung von bis zu vier hinsichtlich mittlerer Konzentration und Helligkeit verschiedenen Partikelspezies.

Der Qualitätsparameter χ^2 gibt, wie auch in der Autokorrelationsanalyse, die Übereinstimmung der Daten mit dem Fit an und damit, ob die durchgeführte Datenanalyse aussagekräftig ist. Je kleiner χ^2 ist, desto besser ist der Fit. Ein idealer Fit hat in FIDA den χ^2 Wert 1, aber auch Werte bis 2 sind generell akzeptabel. Nur bei Messungen sehr inhomogener Lösungen sollte man χ^2 Werte bis zu 10 erwarten. Die Abweichungen vom Fit im Einzelnen wird, wie am Beispiel der Autokorrelationsfunktion gezeigt, in der sogenannten Residualkurve unter dem Fit dargestellt (siehe Abb. 2.2). Bei einem guten Fit sollte sie zufällig um Null verteilt liegen. Dies wurde bei meinen Datenanalysen stets beachtet

2D-FIDA ist der FIDA Auswertung sehr ähnlich, hat aber den Vorteil, dass die Daten aus dem roten und dem grünen Kanal gleichzeitig in die Auswertung eingehen. Dies schafft durch den Vergleich beider Kanäle eine weitere Informationsquelle, so dass 2D-FIDA der Detektion der spezifischen Helligkeit von diffundierenden, fluoreszierenden Molekülen in beiden Detektionskanälen dient. Der 2D-FIDA Auswertung liegt die verbundene statistische Analyse der detektierten Photonenzahlen aus beiden Detektoren, die gleichzeitig in Zeitfenstern von ca. 40 μ s (Bins) gesammelt werden, zugrunde. Die Gesamtfluoreszenz I_{tot} wird dafür in ihre Anteile der Fluoreszenz aus den beiden, roten und grünen, Kanälen aufgeteilt. Die Fluoreszenzcharakteristik einer Partikelspezies wird anhand der verschiedenen Helligkeiten in beiden Kanälen ermittelt. So wird die Konzentration jeder Teilchenspezies, die eine von anderen verschiedene Fluoreszenzcharakteristik zeigt, bestimmt. Die auf diese Weise gewonnenen Daten kann man auch als Intensitätshistogramm darstellen, wobei x- und y-Achse die gezählten Photonen der beiden Detektoren anzeigen. Die durch verschiedene Farben dargestellte z-Achse zeigt die Häufigkeit gleichartiger Ereignisse an. Mit dieser Darstellungstechnik entstehen Punktwolken, die einen guten Eindruck über die während der Aggregation ablaufenden Prozesse und die Qualität der Messungen vermitteln (siehe Abb. 2.5) (183;188-190).

2.2.5.4 SIFT Auswertung

Die durch 2D-FIDA generierten Punktwolken werden für die SIFT (*Scanning for Intensely Fluorescent Targets*) Auswertung mit dem 2D-SIFT Softwaremodul (Evotec-Technologies, Hamburg, Germany) weiter analysiert. Zur Datenanalyse mit diesem Verfahren wird zuerst die Größe des Punktwolkenanteiles, der aus nicht aggregiertem PrP besteht anhand von Parallelproben, die nicht aggregiertes Protein enthalten, festgelegt. Dieser in der linken unteren Ecke der Punktwolkendarstellung gelegene Bereich (siehe Abb. 2.5), dessen Größe auch automatisch von der

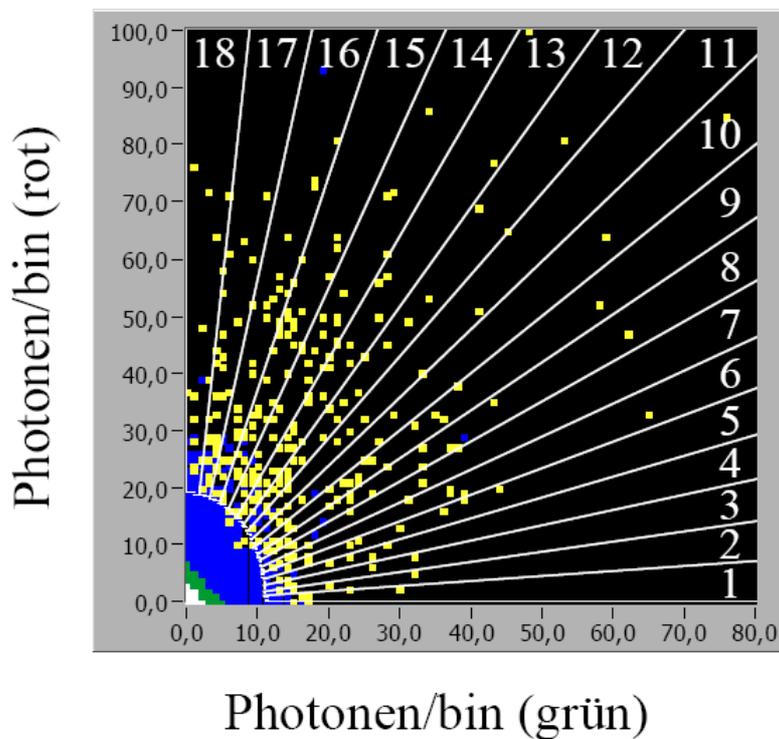


Abb. 2.5. Intensitätshistogramm einer SIFT Auswertung. Die Fläche ist in 18 gleich große Abschnitte unterteilt. Ein 19. Abschnitt definierbarer Größe in der linken unteren Ecke grenzt die dunkelsten Partikel ab. Die Y-Achse zeigt die Photonenanzahl / bin für den roten Kanal bis zu einem Maximum von 100 Photonen und die X-Achse die Photonen / Bin für den grünen Kanal bis max. 80 Photonen an. Die einzelnen Ereignisse werden je nach Helligkeit und Farbverteilung nach Häufigkeit farbcodiert als Punkt dargestellt.

Software festgelegt werden kann, wird in der Weiteren Analyse als separater Sektor betrachtet. Danach wird der verbliebene Teil der 2D-FIDA Punktwolkendarstellung in gleich große Segmente unterteilt, und die Anzahl der Punkte in jedem einzelnen dieser Segmente von der Software aufsummiert. Für die Analysen im Rahmen dieser

Arbeit wurden die Histogramme typischerweise in 18 Segmente unterteilt (siehe Abb. 2.5). Neben einer einfachen Aufsummierung der im Segment enthaltenen Punkte kann man auch eine photonengewichtete oder eine distanzgewichtete Summe errechnen lassen. Dabei wird berücksichtigt, dass Punkte, die peripherer im Segment liegen, mehr Photonen repräsentieren, also durch größere Aggregate verursacht wurden. Die größte erfassbare Photonenzahl pro Teilchen ist mit 255 Photonen pro 40µs in beiden Kanälen gleich. Die Häufigkeit der identifizierten Teilchenspezies wird anhand ihrer Fluoreszenzcharakteristik ermittelt. Die Anzahl hochintensiver bins ist ein direktes Maß für die Anzahl und Konzentration großer Aggregate (siehe 2.2.2). Bei einer homogenen Population von Zielmolekülen ist das Markierungsverhältnis für alle detektierten Partikel ähnlich, in dem zweidimensionalen Intensitätshistogramm streuen daher die hochintensiven Signalpunkte um eine Gerade, deren Steilheit von der relativen Bindung und Helligkeit der zwei analysierten Sondenmoleküle bestimmt wird. Bei der Analyse eines anderen Typs von Zielmolekül mit abweichenden Bindungseigenschaften ergibt sich entsprechend ein anderes Markierungsverhältnis.

2.3 Proteinexpression & Aufreinigung

Die Expression des rekombinanten Prionproteins 23-231 wurde im Wesentlichen so durchgeführt, wie sie in der Literatur beschrieben ist (191). Abweichend davon wurde die Expression in *E. coli* Bakterien BL21DE3 RIL (Novagen) durchgeführt. Die Bakterien wurden für humanes PrP23-231 M129 mit dem Plasmid pET17b-HsPrP23-231WT81, für humanes PrP23-231 V129 mit pET17b-HsPrP23-231WT93 und für murines PrP23-231 mit pET17b-MmPrP23-231WT31 transfiziert und bei 37°C unter konstantem, kräftigem Schütteln inkubiert, bis die optische Dichte bei 600nm 0,5 erreichte. Die PrP-Expression wurde durch Zugabe von 1mM IPTG gestartet und die Inkubation für weitere 2 Stunden fortgeführt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und durch Zugabe von 0,5% Triton X-100 zum Lysepuffer und 30 minütige Inkubation bei 37°C lysiert. Die Gel-filtration des Proteins wurde durch Nickel-Chelat Affinitätschromatographie ersetzt. Die finale Kationen Austauschchromatographie wurde nicht durchgeführt.

Das mit Ionenaustauschchromatographie vorgereinigte PrP wurde wie beschrieben oxidiert und die Oxidation durch Zugabe von 0,1mM EDTA und Einstellung des pH

auf ca. pH 6 beendet. Nach Zugabe von 0,1mM NiCl₂ wurden bis zu 50mg PrP zu 2ml chelatierender Sepharose gegeben, die gemäß den Herstellerempfehlungen mit NiCl₂ vorgeladen und mit Puffer (8M Harnstoff, 10mM MOPS pH=7,0) präequilibriert wurde. Die Bindung des PrP an die Nickel-Chelat-Matrix dauerte wenigstens 3 Stunden und erfolgte bei Raumtemperatur unter ständigem Rühren der Lösung. Anschließend wurde die Matrix auf eine Polyrep-Säule (BioRad) übertragen und von der Flüssigkeit getrennt. Mit 5 ml Puffer (8M Harnstoff, 10mM MOPS pH=7,0, 500mM NaCl) wurde die Säule zweimal gewaschen und dann sequentiell mit 6 mal 5ml Puffer (7,2M Harnstoff, 10mM MOPS pH=7,0, 150mM NaCl, 50mM Imidazol) eluiert. Die PrP enthaltenden Fraktionen wurden gemischt, mit einer Centriprep Anlage konzentriert und zum Schluss für die Rückfaltung 1:50 in 10mM MES pH=6,0 verdünnt (181;192). Die Konzentration wurde mit dem Spektralphotometer „BioPhotometer“ der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) bestimmt, das Protein wurde in 50% Glycerin bei -20° C gelagert.

2.4 Fluoreszenzmarkierung des rekombinanten Prionproteins

2.4.1 Der Markierungsansatz

Im Markierungsansatz wurde 10µg Prionprotein pro 50µl Lösung verwendet. Da die Markierungsreaktion in 10mM Kaliumphosphatpuffer pH=7,2 mit 0,1% NP40 stattfand, musste das Protein vor der Markierungsreaktion umgepuffert werden. Zu diesem Zweck wurden mit dem gewünschten Puffer präequilibrierte mit Sephadex G15 (Pharmacia Biotech, Schweden) gefüllte Mikrospinsäulen (MoBiTec, Göttingen) verwendet. Sephadex zur Säulchenherstellung wurde zuerst zum Quellen in Kaliumphosphatpuffer gegeben, anschließend wurden die Säulchen mit einer flüssigen Mischung aus Sephadex und Puffer gefüllt. Durch Zentrifugation bei 700rcf für eine Minute wurde überschüssiger Puffer abzentrifugiert. Nach drei Waschschritten mit 300µl Puffer, einminütiger Abzentrifugation des Puffers und abschließender Trockenzentrifugation bei 700rcf für 2 Minuten, wurde die eigentliche Umpufferung durchgeführt. Unter Austausch des Glycerins gegen den in den Säulchen vorhandenen Kaliumphosphatpuffer, wurde das PrP durch Zentrifugation

durch die Säulchen gedrückt. Dabei wurden 50µl rPrP-Lösung auf die Säule gegeben und für zwei Minuten bei 700rcf zentrifugiert.

Anschließend wurde, um den für die Färbereaktion notwendigen leicht alkalischen pH von 8,3 zu erreichen, 0,1M Na₂CO₃ im Volumenverhältnis von 1/10 in die Lösung gegeben.

Als Farbstoffe für die Markierungsreaktion wurden die oben beschriebenen Fluoreszenzfarbstoffe (vgl. 2.1.2) Alexa Fluor-488-O-succinimidylester und Alexa Fluor-647-O-succinimidylester verwendet. Es handelt sich dabei um aminoreaktive Succinimidylester, die kovalent an primäre Aminogruppen von Lysinen in Proteinen binden. Während der ersten Markierungsversuche zeigte sich, dass ein Mischungsverhältnis von 1:3 von rPrP zu Farbstoff die besten Markierungsergebnisse liefert.

Nach Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur und in Dunkelheit, wurden ungebundene Fluorophore durch zwei Gelfiltrationsschritte in mit Sephadex G25 gefüllten und mit 10mM Natriumphosphatpuffer pH=7,2 mit 0,1% NP40 (NaPi NP40) präequilibrierten „Microspin Columns“ (MoBiTec, Germany) von markierten rPrP getrennt. Die dafür notwendigen Säulchen wurden nach dem oben beschriebenen Verfahren für die Säulchenherstellung angefertigt. Da nach dem ersten Trennungsschritt ein großer Teil des markierten rPrP in den Säulen blieb, wurden die Säulen im Anschluss noch einmal mit 50µl NaPi NP40 Puffer gespült.

Die Ergebnisse der Markierungsreaktion wurden auf Aggregate und Gehalt an freiem Farbstoff untersucht. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Anteil von freiem Fluoreszenzfarbstoff unter 10% lag. Proben mit zu viel freiem Farbstoff, oder Aggregaten, die sich in 0,2% SDS nicht lösten, wurden verworfen.

Nach einer ersten Beurteilung der einzelnen Säulchenfraktionen mit FCS und SIFT (siehe 2.4.2) wurden die geeigneten Proben gepoolt und in 5µl Aliquots tiefgefroren bei -80°C gelagert. Eine Charakterisierung des Markierungsverhältnisses von Fluoreszenzfarbstoffen pro markiertem Prionprotein erfolgte aus gefrorenen Proben.

2.4.2 Qualitätskontrolle und Charakterisierung der markierten Proteine

Zur Charakterisierung und Qualitätskontrolle des markierten Prionproteins wurde jede einzelne Säulchenfraktion des Markierungsansatzes 1/100 in NaPi+ Puffer

(siehe 2.1) verdünnt und jeweils mit FCS und SIFT gemessen. Mit der FCS Messung wurde die Diffusionszeit und die Partikelzahl des markierten PrP sowie die Partikelzahl des freien Farbstoffes in einem Zwei-Komponenten-Fit bestimmt. Für diesen Fit wurde die bekannte Diffusionszeit des freien Farbstoffs für den Fit vorgegeben. Für diesen festgelegten Wert wurde der prozentuale Anteil am Gesamtsignal bestimmt. Die Diffusionszeit des markierten Proteins und weitere Parameter, wie die Partikelzahlen, wurden anschließend anhand des Fittes berechnet. Die Diffusionszeit zeigte an, dass das Protein während der Markierungsreaktion nicht degradiert war. Die Partikelzahlen lassen sich näherungsweise in Konzentrationen in nM übertragen (siehe 2.2.5.1). Die Tabelle 2.9 zeigt ein Beispiel.

Partikelzahl	Tdiff Farbstoff	%Farbstoff	Tdiff PrP	%PrP	CPP	Itot
0,82	190	8,72	978	91,28	25,23	20,68
3,4	190	6,86	960	93,14	25,19	85,54
2,02	190	6,72	993	93,28	25,14	50,89
3,69	190	9,37	1010	90,63	24,91	91,83

Tab. 2.9. Qualitätskontrolle der PrP Färbereaktion für verschiedene Fraktionen.

Mit der SIFT Messung wurde der Gehalt an nicht SDS löslichen Aggregaten beurteilt. Waren Aggregate in der Lösung detektierbar, oder wich die Diffusionszeit vom Erwartungswert ab, wurde die betreffende Säulchenfraktion verworfen. Auch der Gehalt an freiem Farbstoff von über 10% aller fluoreszierender Teilchen führte zum Verwerfen der betreffenden Lösung (siehe 2.4.1).

Der letzte Schritt der Charakterisierung bestand in der Bestimmung der Anzahl der Farbstoffmoleküle pro PrP-Molekül. Dazu wurden je ein Aliquot jeder Farbe aufgetaut und jeweils eine Hälfte mit 0,1mg /ml Proteinase K für eine Stunde bei 37°C und unter ständigem Schütteln verdaut. Danach wurde die verdaute und die unverdaute Lösung mit 10mM NaPi+ im Verhältnis 1 /100 verdünnt und mit FCS gemessen. Bei der anschließenden Auswertung waren zwei Parameter besonders wichtig: Die Diffusionsgeschwindigkeit, um den Erfolg des Verdaus, bzw. die Unversehrtheit des unverdauten Proteins zu überprüfen, und die Partikelzahl, um durch Division der Partikelzahl der verdauten Lösung durch die Partikelzahl der unverdauten Lösung die Anzahl der Farbstoffmoleküle pro PrP zu berechnen.

Das Markierungsverhältnis sollte über 1 und unter 1,5 liegen. Diesen Werten liegt die Überlegung zugrunde, dass mit der verwendeten Messmethode nicht unterschieden werden kann, ob pro Protein genau ein Farbstoffmolekül gebunden hat, oder ob viele rPrP noch unmarkiert vorliegen, da man nur fluoreszenzmarkierte Teilchen detektieren kann. Auf der anderen Seite sollten die physiologischen Eigenschaften des rPrP möglichst wenig verändert werden, so dass ein Maximalwert von im Mittel 1,5 Farbstoffmolekülen pro rPrP-Molekül festgelegt wurde. Markierungsverhältnisse von 1:1,3 zeigten sich als gut realisierbar (siehe Tabelle 2.10).

	vor Verdau		nach Verdau		Ratio
	Partikelzahl	Tdiff	Partikelzahl	Tdiff	
rPrP A488	0,92	725	0,98	237	1,07
rPrP A647	1,54	910	2,02	340	1,31

Tab. 2.10. Bestimmung der Markierungsrate des fluoreszenzmarkierten PrP

2.5 *de novo* Aggregationsassay

Für *de novo* Aggregationsuntersuchungen wurde das markierte, rekombinante PrP in zwei Schritten verdünnt. Zunächst wurde aus den tiefgefrorenen PrP Aliquots eine gegenüber der angestrebten Endkonzentration 10x konzentrierte Vorverdünnung mit einem SDS-Gehalt von 0,2% hergestellt, die dann in der Messplatte auf die für die Messung erforderliche Konzentration herunterverdünnt wurde.

In diesem ersten Schritt wurde das PrP Aliquot in 10mM NaPi+ gegeben. Die Lösung des PrP bei hoher SDS-Konzentration reicht aus, um eventuell vorhandene, präformierte Aggregate aufzulösen und das gesamte PrP in einen monomeren Zustand zu überführen (siehe 3.1.2). Gleichzeitig wurde in diesem ersten Verdünnungsschritt die Partikelzahlen des grün- und rotmarkierten PrP auf N=10 für grün und N=20 für rot eingestellt, um ein ausgewogenes Verhältnis der Konzentrationen des markierten PrP beider Farben zu erreichen. Dass die detektierten Partikelzahlen nicht deren wirkliches 1:1 Verhältnis widerspiegeln, liegt daran, dass der rote Fokus ein in etwa doppelt so großes Volumen hat wie der grüne. Damit entspricht ein gemessenes Verhältnis der Partikelzahlen von N=10 (Grün) zu N=20 (Rot) einem wahren stöchiometrischen Verhältnis von 1:1.

Die Kontrolle der Partikelzahlen sowie der Aggregatfreiheit erfolgte durch 1/10 Verdünnung der einzustellenden Lösung in 10 mM NaPi+ und Messung im FCS-Reader. Nach erfolgreicher Partikelzahleinstellung und Verifizierung der Aggregatfreiheit der Lösung wurden am Ende des ersten Verdünnungsschrittes weitere Komponenten, wie z.B. Schwermetallionen in gegenüber der Zielkonzentration 10-facher Konzentration zu dem konzentrierten PrP-Mix hinzugegeben.

Die Aggregationsreaktion wurde durch den zweiten Verdünnungsschritt mit 10mM NaPi, das je nach gewünschter SDS-Endkonzentration verschiedene SDS-Konzentrationen enthielt, gestartet. Dieser Verdünnungsschritt fand direkt in 96 Well Glasbodenplatten zur Messung im FCS-Readers statt, so dass ein unmittelbarer Beginn der Aggregationsmessungen möglich war. Die Konzentration des PrP in der Messplatte betrug somit ca. 5nM. Da bei den kleinen Messvolumina von 20µl mit Verdunstung gerechnet werden muss, wurden die gefüllten Wells abschließend mit Tesafilm versiegelt.

2.6 Aufreinigung von humanen Prionen

Humane Prionen wurde aus Gehirnen von an CJD verstorbener Patienten aus der Brain Bank München nach dem Protokoll von Safar aufgereinigt (102). Das Pellet, das am Ende des letzten Zentrifugationsschrittes des Aufreinigungsprotokolls entsteht, wurde in 1x PBS mit 0,1% Sarkosyl resuspendiert, anschließend 1/5 mit Puffer (20mM Kalium Phosphat Puffer bei pH=6 mit 0,1% Nonidet P40) verdünnt und in Aliquots von 100µl in einem Wasserbadsonikator (Sonorex 52H Bandelin) für 60 Sekunden sonifiziert. Durch Zentrifugation für eine Minute bei 1000rpm wurden gröbere Teilchen abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand für die Essaykonzentration 1 / 100 im oben genannten Puffer verdünnt und war damit wie unter 2.7 beschrieben einsetzbar (192).

2.7 Aggregationsassay mit Prion-Rods

Zuerst wurde eine Mischung von mit Alexa488 grün markiertem murinem rPrP und mit Alexa647 rot markiertem monoklonalen murinem Antikörper L42 auf ein 1:1

Verhältnis von grün zu rot eingestellt und auf Aggregatfreiheit überprüft (siehe 2.4.1). Die Endkonzentrationen von Antikörper und rPrP lagen bei stabilem 1:1 Verhältnis bei jeweils ca. 2-6nM.

In einem Essayvolumen von 20 μ l wurden zunächst 8 μ l rPrP- Antikörper- Mix mit 2 μ l 10x konzentrierter Metallionenlösung gemischt, bevor 10 μ l verdünnte PrP^{Sc}-Lösung dazugegeben wurden. Die Proben wurden daraufhin in 384 bzw. 98 Well Glasbodenplatten der Firma Evotec gefüllt, diese mit Klebefolien versiegelt und anschließend in einem Insight Reader in SIFT Technik gemessen.

Die Funktionsweise des Assays beruht auf der unterschiedlichen Affinität des Antikörpers L42 zu murinem und humanem PrP. Während dieser Antikörper gut an humanes PrP bindet und es in diesen Experimenten rot markiert, bindet er nicht an murines PrP. Mit seiner Hilfe kann man also die humanen Prionen durch rote Fluoreszenzmarkierung sichtbar machen und kann gleichzeitig unabhängig davon die Bindung von grün fluoreszenzmarkiertem murinem rPrP an das PrP^{Sc} beobachten. Bei Zugabe verschiedener Substanzen lässt sich so eine Aussage über den Einfluss dieser Substanzen auf die rPrP-PrP^{Sc}-Interaktion machen. Die Auswertung erfolge nach der unter 2.2.5.3 beschriebenen Methode für SIFT-Messungen, wobei besonders die ersten fünf im grünen Bereich gelegenen Sektoren für die Beurteilung der Interaktion von Bedeutung waren, da man hier im wesentlichen die an Prion-Rods gebundenen grün markierten rPrP sehen kann. Als Kontrolle wurde wir das kationische Lipid DOSPA (2,3-Dioleoyloxy-*N*-[2(sperminocarboxamido)ethyl]-*N,N*-dimethyl-1-propanaminium Trifluoracetat) verwendet, welches schon bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen eine starke und verlässliche Hemmung der Bindung von PrP^C zu PrP^{Sc} bewirkt (192).

2.8 CD-Spektroskopie

Die CD (Circular Dichroism) Spektren wurden mit einem Jasco J715 Spektropolarimeter unter Verwendung einer Quarzplatte mit 1mm Flüssigkeitsschichtdicke bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Aggregation wurde durch Verdünnen des SDS Gehaltes der Proteinlösungen von der Ausgangskonzentration von 0,2% SDS auf 0,03% SDS oder 0,02% SDS gestartet. Testsubstanzen, wie Metallionen, wurden vor diesem Verdünnungsschritt in die Lösungen gegeben. Die finale

Proteinkonzentration während der Messung betrug 400µM. Vor Beginn der Messungen wurden die Lösungen 100 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. Es wurden jeweils fünf Aufnahmen bei Wellenlängen von 195- 250nm, einer Aufnahmegeschwindigkeit von 50nm pro Minute und einer Auflösung von 1nm gesammelt. Für jede verwendete Lösung wurde ein Leerspektrum aufgenommen und dieses von dem dazugehörigen PrP Spektrum abgezogen. Alle Messungen wurden in 10mM Natriumphosphatpuffer bei pH 7,2 und SDS Konzentrationen von 0,2%, 0,03% und 0,02% durchgeführt (146;193).

2.9 Thioflavin T Fluoreszenz Messungen

Für Thioflavin T Fluoreszenz Messungen wurden Quarz-Cuvetten (Perkin Elmer) mit 1cm Anregungsstrecke in einem LS-55 Lumineszenz-Spektrometer (Perkin Elmer), das zur Anregung mit einer Xenonlampe ausgestattet ist, verwendet. Für jede Probe wurde bei Raumtemperatur ein komplettes, kontinuierliches Spektrum zwischen den Lichtwellenlängen von 450nm – 550nm aufgenommen. Von jedem Probenwert wurde jeweils ein Leerwert vom Puffer mit Thioflavin T ohne rPrP abgezogen. In die Auswertung gingen nur die Werte der Wellenlänge von 490nm ein. Alle Messungen wurden in 10mM Natriumphosphatpuffer bei pH 7,2 und SDS Konzentrationen von 0,2% und 0,02% durchgeführt. Die Testsubstanzen wurden 10-fach konzentriert vor dem Verdünnungsschritt zu den am Ende auf 0,02% SDS verdünnten Proben zugegeben. Alle Proben enthielten eine Proteinkonzentration von 75mM und wurden nach Verdünnung und vor der Messung 30 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Thioflavin T wurde in einer Endkonzentration von 10µM direkt vor der Messung hinzugegeben (182;194-196).

2.10 Proteinase-K-Verdau und PrP Detektion im Western-Blot

Für den Proteinase-K-Verdau wurden die Proben für eine Stunde bei 37°C mit 50µg /ml, 20µg /ml oder 3µg /ml Proteinase-K inkubiert. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 5mM PMSF und Kochen im Elektrophoresepuffer [3% (wt /vol) SDS in 60mM Tris, pH 6,8] beendet. Im Anschluss wurden Proben von je 10µl Volumen auf

einem 12,5% SDS PAGE laufen gelassen. Nach Elektrotransfer auf eine Nitrocellulosemembran (0,45µm; Bio-Rad) wurde das Prionprotein mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 in einer 1:2000 Verdünnung und einem Ziege-anti-Maus IgG, an den alkalische Phosphatase gebunden war, detektiert. Die Enzymaktivität wurde mit dem CDP-Star Chemilumineszenz System (Tropix, Bedford, MA) und Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia) gemäß Herstellerempfehlungen sichtbar gemacht (83;177;197).

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines *de novo* Aggregations Ansatzes

3.1.1 Abhängigkeit der Aggregation von rPrP von SDS

Zur Etablierung eines *de novo* Aggregations Ansatzes wurde zunächst die Zeit- und SDS-Abhängigkeit der Aggregation von Vollängen-PrP unter Kontrollbedingungen untersucht. Dafür wurde ein Modell gewählt, in dem verschiedene Konzentration des Detergens Sodiumdodecylsulfat (SDS) verwendet werden, um die Aggregation von rPrP und den strukturellen Übergang von α -helikalem Prionprotein (PrP^α) zu β -Faltblatt reichem PrP (PrP^β) zu induzieren. Dieses Modell wurde von der Gruppe um D. Riesner in Düsseldorf entwickelt und unter Verwendung von rPrP^{90-231} weitreichend experimentell bearbeitet (145;146). Im Unterschied zur Arbeitsgruppe Riesner wurde Prion Protein in voller *in vivo* exprimierter Länge, rPrP^{23-231} , verwendet. Wie schon für rPrP^{90-231} beschrieben, lag auch rPrP^{23-231} in Gegenwart von 0,2% SDS in einem nicht aggregierten Zustand vor (siehe Abb. 3.1) (145;146). Nach Verdünnung des SDS-Anteiles unter 0,05% SDS zeigte der Anstieg der Kreuzkorrelationsamplitude den Beginn der Aggregation an (siehe 2.2.5.2).

Insgesamt wurden SDS-Konzentrationen von 0,05% bis 0,0125% untersucht. Bei diesen SDS Konzentrationen wurde ein Plateau der Kreuzkorrelationsamplitude typischerweise innerhalb von 100 Minuten nach der Verdünnung der SDS-Konzentration von 0,2% auf den jeweiligen Zielwert erreicht. Die Höhe des erreichbaren Plateaus der Kreuzkorrelationsamplitude erwies sich dabei als von der SDS-Endkonzentration abhängig (siehe Abb. 3.1). Hochintense Fluoreszenzsignale, die große Aggregate anzeigen, wurden durch SIFT Messungen (siehe 2.3) bei 0,0125% SDS und gelegentlich auch bei 0,02% SDS detektiert. Dies zeigt, dass große Aggregate nur bei niedrigen SDS Konzentrationen entstehen, und dass der Anstieg der Kreuzkorrelationsamplitude zwischen 0,05% und 0,02% SDS auf die Bildung von PrP-Oligomeren zurückzuführen ist.

Die Diffusionszeiten dieser Oligomere in Kreuzkorrelationsmessungen mit stationärem Fokus waren typischerweise 2,5-3 mal länger als die Diffusionszeiten von nicht aggregiertem rPrP. Da sich die Diffusionszeit proportional zur dritten Potenz der Masse des Moleküls verhält (180), ist dies ein Hinweis dafür, dass diese

rPrP Oligomere im Durchschnitt aus ca. 20 rPrP Monomeren zusammengesetzt sind. Diese Ergebnisse mit Vollängen-rPrP gleichen somit der gut charakterisierten SDS abhängigen Aggregation von rPrP⁹⁰⁻²³¹ (145;146).

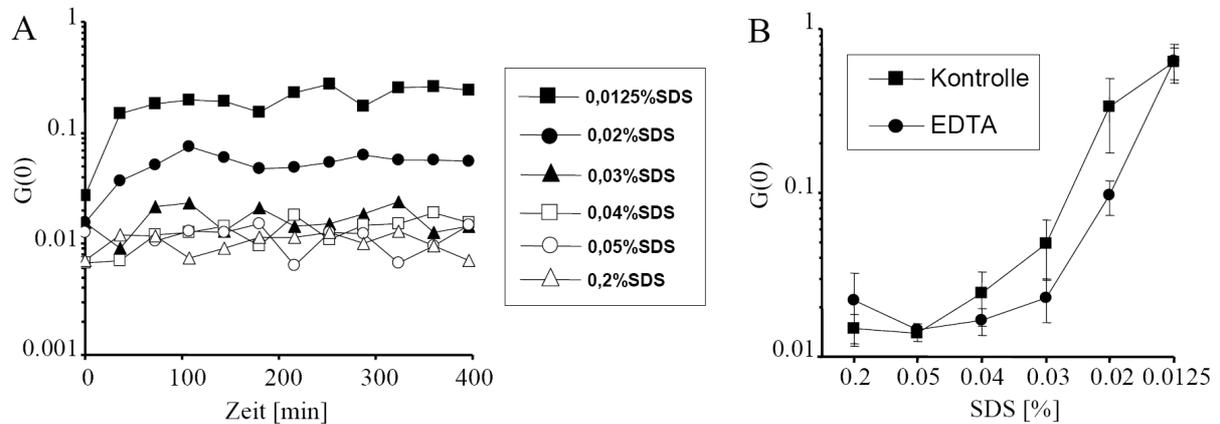


Abb. 3.1.: Zeit- und SDS- abhängige Aggregation von Vollängen PrP. (A) Zeitverlauf der Aggregation gemessen durch die Kreuzkorrelationsamplitude [$G(0)$] in einem einzelnen, repräsentativen Experiment mit verschiedenen SDS Konzentrationen. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus vier parallelen Proben dar. (B) SDS Abhängigkeit der Kreuzkorrelationsamplitude nach >100 min Aggregationszeit. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte \pm Standardfehler von 16 unabhängigen Experimenten mit jeweils vier parallelen Proben.

Da der Natriumphosphatpuffer, der in diesen Experimenten verwendet wurde, Spuren von zweiwertigen Metallionen enthalten könnte, wurde bei einer Reihe von Experimenten 100 μ M EDTA in den Puffer gegeben. Diese Versuche zeigten eine geringfügige Veränderung in der SDS-abhängigen Aggregation von PrP (siehe Abb. 3.1b). Die Multimerformation bei niedrigen SDS-Konzentrationen (0,0125%) blieb im Wesentlichen unverändert, jedoch war die Bildung von Oligomeren bei mittleren SDS Konzentrationen (0,04% – 0,02% SDS) reduziert. Eine naheliegende Interpretation dieser Beobachtung ist, dass bereits minimale Mengen von zweiwertigen Metallionen einen Einfluss auf die Aggregation von Vollängen-PrP haben.

3.1.2 Vergleich der Aggregation von rPrP Oligomeren und *de novo* Aggregation

Die Frage, wie es zur Bildung von rPrP Aggregaten kommt, ist zum Verständnis der Prozesse, die im Verlauf der PrP Aggregation zu struktureller Konversion und Amyloidbildung (siehe 3.2.3) führen, von zentraler Bedeutung. Nach der Seeded

Aggregation Hypothese von Lansbury (142) (siehe auch 1.5) ist eine Anlagerung von monomerem Protein an einen präformierten Kern Voraussetzung für strukturelle Konversion und weitere Aggregation.

Für die Wege der Aggregatentstehung aus rPrP wurde von der Arbeitsgruppe Baskakov ein Modell vorgeschlagen, das von mehreren alternativen Aggregationswegen ausgeht. Diesem Modell zufolge gibt es ein sogenanntes β -Oligomer, einen stabilen Zustand des rPrP, der nicht zur weiteren Aggregation und zur Entstehung von Amyloid führt. Das β -Oligomer ist thermodynamisch stabiler als die α -helikale Form von rPrP, gleichzeitig aber energetisch schwieriger zugänglich (198;199). Es liegt hauptsächlich als Octamer vor und entsteht bevorzugt unter denaturierenden Bedingungen wie saurem pH, hohem Salzgehalt, mittleren bis hohen Detergentskonzentrationen, hoher Temperatur oder bei hohen Proteinkonzentrationen. Der Alternativweg besteht aus der Aggregation von Monomeren über zwei Zwischenzustände, die Multimere I und II, die in der Size-Exclusion-Chromatography eine ähnliche Größe wie das β -Oligomer haben. Am Ende dieses Aggregationsweges kommt es zur Amyloidbildung. Es zeigte sich, dass auch die Entstehung Amyloidfibrillen aus rPrP durch teilweise denaturierende Bedingungen, wie molare Harnstoffkonzentrationen, Guanidinhydrochlorid oder sauren pH erleichtert wird (196;200-202).

Im SDS System lässt sich die Entstehung von Oligomeren mit verschiedenen Detergentskonzentrationen gut steuern (145;146;181). Nicht geklärt ist dabei die Frage, ob es sich bei den SDS-induzierten Oligomeren um β -Oligomere im Sinne von Baskakov et al (199) handelt, es eine Zwischenstufe auf dem Multimer-Weg ist, oder ob sie eine andere Entität darstellen.

Um den Mechanismus des Aggregationsbeginns näher zu untersuchen, wurde daher die *de novo* Aggregation von monomerem rPrP und die Aggregation ausgehend von voraggregiertem, oligomerem rPrP vergleichend untersucht. Zur Herstellung von rPrP-Oligomeren wurde eine Aggregation von monomerem rPrP bei 0,04% SDS über vier Stunden durchgeführt bis keine Veränderungen der Kreuzkorrelationsamplitude mehr detektierbar waren. Danach wurde die weitere Aggregation durch eine weitere Verdünnung auf 0,02% SDS gestartet sowie ein paralleler Aggregationsansatz aus monomerem rPrP mit gleicher Protein- und SDS-Konzentration begonnen. Der Vergleich dieser parallel laufenden Proben zeigte, dass die Aggregate, die direkt *de novo* aus rPrP entstehen, eine höhere Kreuzkorrelationsamplitude und mehr durch

SIFT Analyse detektiertes hochintensives Signal aufwiesen als Aggregate, die aus größeren präformierten Oligomeren entstanden. Die zur Kontrolle mitgeführte Probe mit 0,2% SDS zeigte, wie erwartet (siehe 3.1.2), praktisch keine hochintensen Signale und eine deutlich niedrigere Kreuzkorrelationsamplitude (siehe Abb. 3.2).

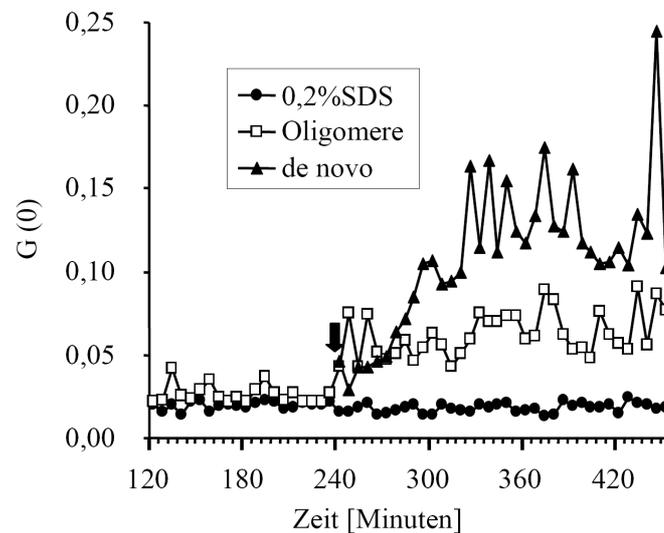


Abb. 3.2.: Aggregationsvergleich PrP Oligomere und *de novo* Aggregation. Graph (A) zeigt den typischen Verlauf der Aggregation gemessen durch die Kreuzkorrelationsamplitude [$G(0)$] bei Ausgang der Aggregation von Oligomeren bzw. *de novo* Start. Zunächst wurde die Oligomerfraktion für ca. 240 Minuten bei 0,04% SDS voraggregiert. Dann wurde bei (■) die SDS Konzentration auf 0,02% abgesenkt, sowie gleichzeitig ein paralleler Aggregationsansatz mit rPrP gleicher Proteinendkonzentration gestartet. Zu sehen ist, dass der *de novo* Ansatz ein höheres Niveau der Kreuzkorrelationsamplitude erreicht.

Die *Seeded Aggregation* Hypothese, nach der rPrP Monomere für die Entstehung großer Aggregate vorliegen müssen, wie auch das oben erwähnte Modell von Baskakov et al., nach dem bestimmte Oligomerformen eine große thermodynamische Stabilität besitzen und nicht an der Entstehung großer amyloidartiger Aggregate beteiligt sind, scheinen durch diese Ergebnisse untermauert zu werden. Wie in Abb. 3.2 zu sehen ist, kann man in FCS- und SIFT-Messungen bei Aggregation ausgehend von Oligomeren weniger starke Signale messen als bei *de novo* Aggregationsbeginn. Die PrP Aggregation hingegen, die mit monomerem PrP beginnt, stellt dieser Überlegung zufolge genügend Monomere zur Verfügung, um den Multimer-Weg zur Amyloidbildung einzuschlagen (200;202).

Kritisch muss man zu dieser Interpretation jedoch anmerken, dass das von Baskakov identifizierte β -Oligomer ein Octamer ist (s.o.). Es unterscheidet sich daher in der Größe von den mit FCS gemessenen Oligomeren aus dem SDS-System. Für den

Übergang von einem Monomer zum Octamer würde man also eine Verdopplung der Diffusionsgeschwindigkeit (siehe 2.2.5.1) erwarten. In diesen Messungen zeigte sich jedoch eine Steigerung der Diffusionsgeschwindigkeit in der Oligomerfraktion auf das 2,5-Fache, was auf die Zusammensetzung des Oligomers aus ca. 20 Monomeren schließen lässt. Da dieses aber auch weniger gut weiteraggregiert als die monomere Form, scheint auch im SDS System das Oligomer, wenn es sich einmal gebildet hat, der stabilere Zustand des rPrP zu sein. Man kann jedoch nicht zweifelsfrei sagen, ob man im SDS System exakt die selben PrP Aggregate und Zwischenstufen sehen, wie sie sich in Gegenwart von Harnstoff und Guanidinhydrochlorid bei Baskakov et al. bilden.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass große rPrP Aggregate offenbar durch den Einbau von Monomeren und nicht durch Zusammenlagerung präformierter kleinerer Aggregate entstehen. Dies unterstützt die *Seeded Aggregation* Hypothese zur Entstehung und Propagation von Prionen (siehe 1.5 & (203)).

3.1.3 Einfluss des Methionin / Valin Polymorphismus an Codon 129

Der Methionin-Valin-Polymorphismus an Codon 129 des Prionproteingenes hat, wie bereits diskutiert (siehe 1.3), weitreichende Konsequenzen für den Krankheitsverlauf, den Phänotyp der Erkrankung, und die Neuropathologie. Die molekularen Grundlagen, durch die diese Wirkungen vermittelt werden, sind bis heute unklar. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass der Polymorphismus Auswirkungen auf die Sekundärstruktur und die β -Faltblattbildung sowie die Aggregation von Prionprotein hat (200;201).

Um zu untersuchen, ob das Aggregationsverhalten des PrP durch die Aminosäure an Position 129 beeinflusst wird, wurden PrP^{129M} und PrP^{129V} jeweils mit rotem oder grünem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Das markierte PrP wurde dann in allen Kombinationsmöglichkeiten im SDS System co-aggregiert.

Als Ausgangsmaterial für die Co-Aggregation wurde eine zehnfach konzentrierte Lösung mit einem molaren 1:1 Verhältnis von rot markiertem zu grün markiertem PrP in einer Lösung mit 0,2% SDS hergestellt. Da der rote Laserfokus ein ungefähr doppelt so großes Volumen wie der grüne Laserfokus hat und die Teilchenkonzentrationen mit Autokorrelationsmessungen bestimmt wurden, war in der Ausgangslösung

ein gemessenes PrP-Verhältnis von grün zu rot von 1:2 einzustellen um ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:1 zu erreichen (siehe 2.5).

Die Auswertung erfolgte mit der Kreuzkorrelationsanalyse, da mit dieser Technik die Co-Aggregation verschiedenfarbig markierter Teilchen besonders sensitiv beobachtbar ist. Wie in 2.2.5.2 beschrieben werden mit dieser Technik nur zweifarbig markierte Aggregate erfasst. Neben der Kreuzkorrelationsanalyse wurden bei den Proben mit niedriger SDS Konzentration auch die Punktwolkenverteilung auf 2D FIDA Histogrammen im Hinblick auf den Ablauf der Aggregation betrachtet (Daten nicht abgebildet).

Es zeigte sich, dass rPrP^{129M} mit sich selbst bei mittleren SDS Konzentrationen von 0,04% deutlich besser aggregiert, als rPrP^{129V} untereinander oder eine 1:1 Mischung zwischen beiden Proteintypen (siehe Abb. 3.3).

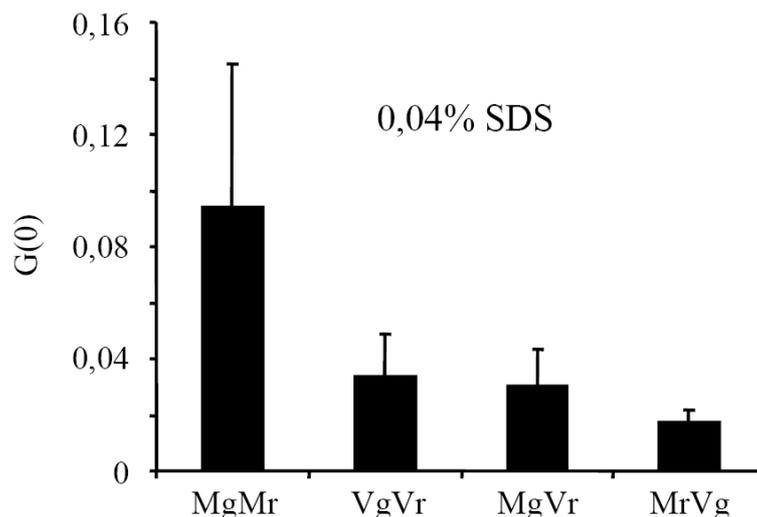


Abb. 3.3.: Koaggregation verschiedener Kombinationen von humanem rPrP an Codon 129. Es sind die Mittelwerte und der Standardfehler der Kreuzkorrelationsamplitude von sieben unabhängigen Experimenten mit jeweils vier parallelen Proben angezeigt. Die Großbuchstaben M und V bezeichnen die Aminosäuren Methionin und Valin an Codon 129. Die Kleinbuchstaben g und r stehen für die Fluoreszenzmarkierung mit grünem oder rotem Farbstoff. In diesem Graphen sind nur die Werte von Messungen mit 0,04% SDS abgebildet, da nur hier deutliche Unterschiede im Aggregationsniveau erkennbar wurden.

Um zu prüfen, ob sich die Aggregation von rPrP^{129M} von der Aggregation von rPrP^{129V} oder der Aggregation von 1:1 Gemischen von beiden unterscheidet, wurde der einseitigen T-Test für Stichproben ungleicher Varianz angewendet. Es zeigte sich, dass sich die Aggregation von rPrP^{129M} von der aller anderer Kombinationen statistisch signifikant unterscheidet ($p=0,031$, $p=0,021$, $p=0,008$).

Diese Ergebnisse zeigen, wie spezifisch der SDS Aggregationsansatz schon auf subtile Veränderungen in der Aminosäurekette des Prionproteins reagiert.

3.2 Metallionen im SDS System

3.2.1 Einfluss von Metallionen auf die Aggregation von PrP

Wie in der Einleitung näher beschrieben (siehe 1.6), bestehen zwischen zweiwertigen Metallionen und PrP vielfältige Wechselwirkungen. Zur Untersuchung des Einflusses von zweiwertigen Metallionen auf die Aggregation von Prionprotein wurden Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} und Zn^{2+} ausgewählt.

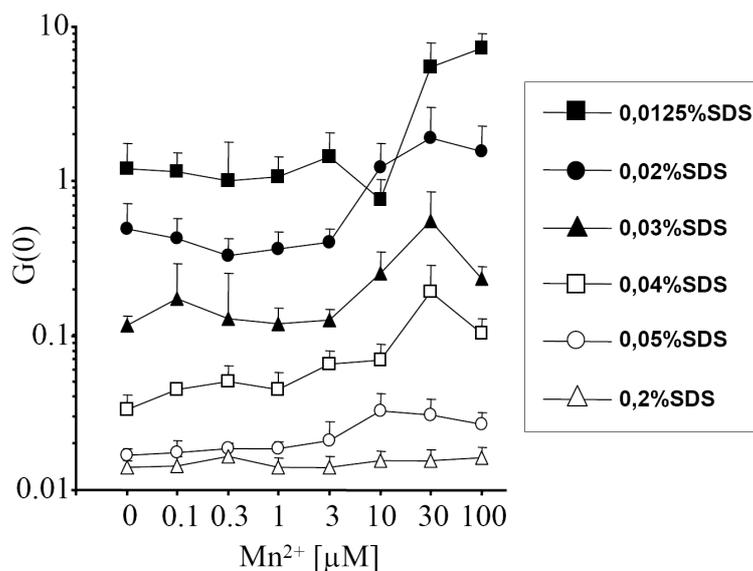


Abb. 3.4. Der aggregationsfördernde Effekt von Mangan. Die Aggregation wurde durch Messung der Kreuzkorrelationsamplitude $G(0)$ nach >100 Minuten Aggregationszeit in Gegenwart von verschiedenen Mangankonzentrationen bestimmt. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert + Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten dar.

Die Untersuchung wurde mit Kupfer und Mangan begonnen, da für beide Metalle Effekte in der Literatur beschrieben sind (siehe 1.6). Für die Untersuchungen wurden verschiedene Mengen von entweder CuCl_2 oder MnCl_2 zu der Stammlösung aus PrP-Monomeren mit einer SDS-Ausgangskonzentration von 0,2% SDS gegeben. Danach wurden diese Stammlösungen in Puffer, die 0 – 0,2% SDS enthielten, auf Endkonzentrationen von 0,0125% bis 0,2% SDS verdünnt. In Gegenwart von 0,2%

SDS zeigten weder Kupfer noch Mangan einen Effekt auf die PrP Aggregation. Bei SDS-Konzentrationen, die eine Oligomerbildung zulassen, zeigte Mangan in mikromolaren Konzentrationen einen dosisabhängigen aggregationsfördernden Effekt. Der maximale aggregationsfördernde Effekt von Mangan wurde bei 30 μ M Mangan detektiert (Abb. 3.4).

Im Gegensatz zu Mangan zeigte Kupfer einen hemmenden Effekt auf die PrP-Aggregation, der bei niedrigen SDS-Konzentrationen, die unter Kontrollbedingungen die Formation von Multimeren erlauben, besonders stark war. Dieser Effekt konnte schon bei nanomolaren Kupferkonzentrationen gemessen werden (siehe Abb. 3.5A). Der Einwand, dass der manganinduzierte, aggregationsfördernde Effekt möglicherweise dadurch entstehen könnte, dass Manganionen eine Verminderung der aktiven SDS Konzentration hervorrufen, ist deshalb wenig wahrscheinlich, da die SDS Konzentration auch bei 0,0125% SDS, was 440 μ M SDS entspricht, noch wesentlich höher ist, als die eingesetzte Mangankonzentration.

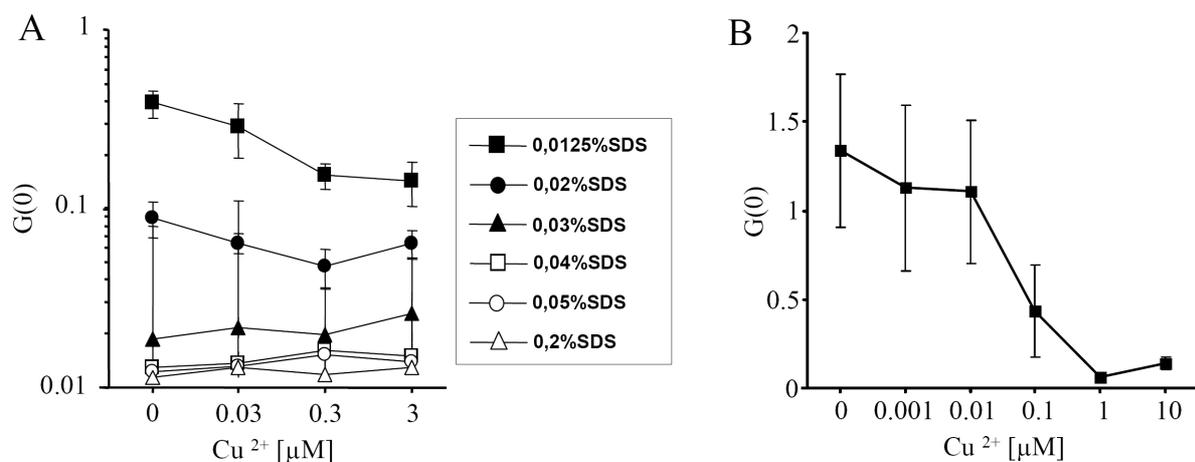


Abb. 3.5. Der aggregationshemmende Effekt von Kupfer. (A) Die Aggregation wurde durch Messung der Kreuzkorrelationsamplitude $[G(0)]$ nach >100 min Aggregationszeit in Gegenwart von verschiedenen Kupfer Konzentrationen bestimmt. Der aggregationshemmende Effekt von Kupfer kann bei niedrigen SDS Konzentrationen gemessen werden. (B) Die Aggregation lief bei 0,02% SDS in Gegenwart von 30 μ M Mangan ab. Der aggregationsfördernde Effekt von Mangan kann von mikro- bis nanomolaren Konzentrationen von Kupfer gehemmt werden. Die Datenpunkte von (A) und (B) stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten dar.

Um die Hypothese, dass der aggregationshemmende Effekt von Kupfer spezifisch ist, weiter zu untersuchen, wurde PrP in Gegenwart von 30 μ M Mangan mit verschiedenen Kupferkonzentrationen inkubiert (siehe Abb. 3.5B). Dabei zeigte sich, dass der proaggregatorische Effekt von 30 μ M Mangan schon durch 1 μ M Kupfer

effizient geblockt wird. Ein deutlich aggregationshemmender Effekt von Kupfer war schon bei 100nM Cu^{2+} messbar.

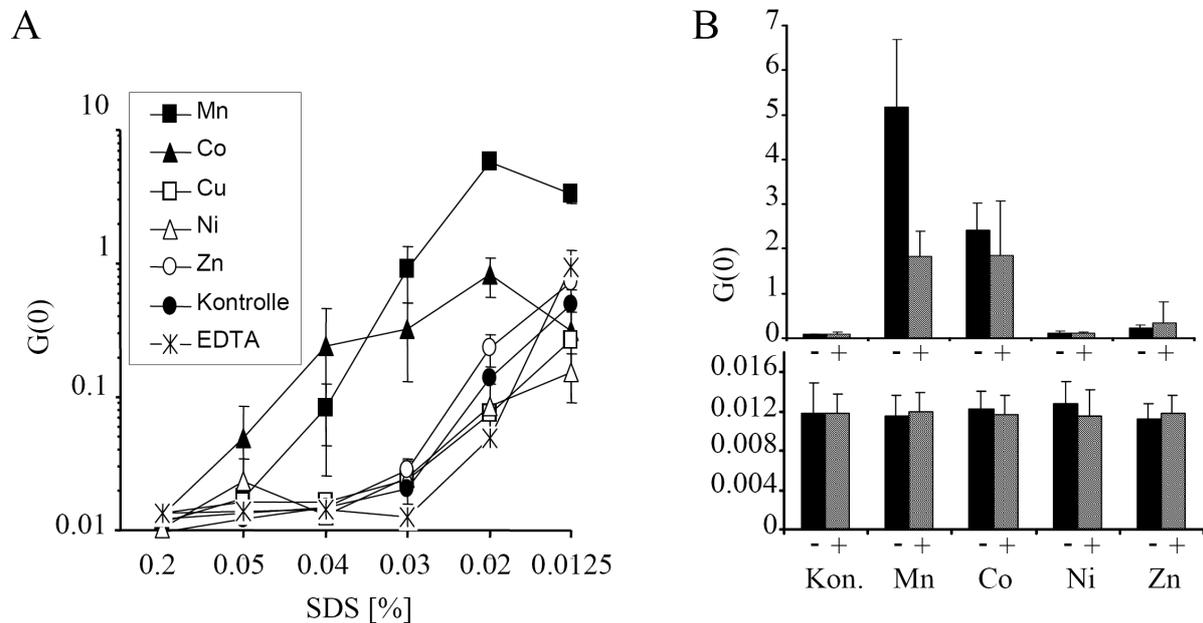


Abb. 3.6. Der Effekt verschiedener Metallionen auf die Aggregation von Vollängen-PrP. (A) Die Aggregation wurde durch Messung der Kreuzkorrelationsamplitude $[G(0)]$ nach >100 min Aggregationszeit in Gegenwart von verschiedenen Metallionen ($30\mu\text{M MnCl}_2$, $30\mu\text{M CoCl}_2$, $30\mu\text{M CuCl}_2$, $30\mu\text{M NiCl}_2$, und $30\mu\text{M ZnCl}_2$) beziehungsweise $100\mu\text{M EDTA}$ bestimmt. Ein aggregationsfördernder Effekt kann in Gegenwart von Mangan und Kobalt gemessen werden. (B) Die Aggregation lief in Gegenwart von $30\mu\text{M}$ der angezeigten Metallionen und bei einer SDS-Konzentration von $0,02\%$ (obere Hälfte) ohne (-) oder mit (+) $1\mu\text{M CuCl}_2$ ab. Der aggregationsfördernde Effekt von Mangan, nicht aber von Kobalt kann von Kupfer geblockt werden. Kein Effekt von Metallionen konnte bei $0,2\%$ SDS gemessen werden (untere Hälfte). Die Datenpunkte von (A) und (B) stellen Mittelwerte \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten dar.

Da rPrP fünf Kupferionen pro Molekül binden kann, und im verwendeten Versuchsansatz ca. 5nM rPrP enthalten sind, liegt eine Gesamtmenge von ca. 25nM PrP-Kupferbindestellen vor. Die Abb. 3.5B zeigt, dass genau bei diesen Mengen an Kupfer der aggregationshemmende Effekt einsetzt. Die Daten zeigen damit eine hohe Affinität von Kupfer zu rPrP und weisen darauf hin, dass die PrP-Kupfer-Bindung effizienter ist, als bisher angenommen (128-131;133). Darüber hinaus legt die Tatsache, dass Kupfer und Mangan gegensätzliche Effekte auf die Aggregation von rPrP haben, nahe, dass Veränderungen der Besetzung von Metallionenbindungsstellen des PrP einen direkten Einfluss auf die Aggregation und möglicherweise auch auf die krankheitsassoziierte strukturelle Konversion von PrP haben.

Um beurteilen zu können, ob der proaggregatorische Effekt von Mangan spezifisch ist, wurden auch andere Schwermetallionen aus der selben Zeile des Periodensystems in Konzentrationen von 30µM getestet (siehe Abb. 3.6). Von den untersuchten Metallionen (Co²⁺, Ni²⁺, und Zn²⁺) zeigte nur Kobalt einen deutlichen aggregationsfördernden Effekt.

Der Effekt von Kobalt war in Gegenwart von mittleren SDS Konzentrationen am deutlichsten, wohingegen, im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Mangan, bei niedrigen SDS Konzentrationen ein verhältnismäßig geringer Effekt zu sehen war (siehe Abb. 3.6a). Darüber hinaus konnte der Effekt von Kobalt, im Gegensatz zum Manganeffekt, nicht von 1µM Kupfer geblockt werden (Abb. 3.6b). Dies legt nahe, dass Kobalt auf eine unterschiedliche, möglicherweise unspezifische Art auf die PrP Aggregation Einfluss nimmt. Weder Nickel noch Zink zeigten einen Effekt auf die PrP-Aggregation. Keines der untersuchten Metallionen konnte Aggregation von PrP bei hohen SDS Konzentrationen (0,2% SDS) induzieren.

3.2.2 Effekt von Metallionen auf die Konformation des Prionproteins

Es wurde bereits für die SDS abhängige Aggregation von PrP⁹⁰⁻²³¹ gezeigt, dass die mit der Herausverdünnung von SDS verbundene Bildung von PrP Oligomeren mit einer Veränderung in der Sekundärstruktur von einer Form, die überwiegend α -Helices enthält, zu einer Form, die viel β -Faltblatt enthält, einhergeht (145;146).

Um zu untersuchen, ob sich fluoreszenzmarkiertes Volllängen-rPrP ähnlich verhält, und zu sehen, ob Metallionen Einfluss auf den strukturellen Übergang haben, wurden Experimente mit CD Spektroskopie zur Analyse der Sekundärstruktur eingesetzt (siehe Abb. 3.7).

Das mit PrP in Gegenwart von 0,2% SDS aufgenommene CD Spektrum zeigt ein Minimum der Elliptizität bei 205nm und eine Schulter bei 220nm und bestätigt damit, dass das rekombinante Volllängen-PrP unter Kontrollbedingungen (10mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2) in überwiegend α -helikaler Faltung vorliegt. Ähnliche Spektren wurden in der Gegenwart von 30µM Cu²⁺, 30µM Mn²⁺ und 100µM EDTA gemessen. Dies bedeutet, dass unter diesen Bedingungen keine größeren strukturellen Veränderungen in der gefalteten, globulären Domäne des PrP erkennbar sind. Aus FCS Messungen war bekannt, dass rPrP unter diesen Bedingungen als Monomer vorliegt (siehe 3.1.1).

In Gegenwart einer SDS Konzentration von 0,03%, für die gezeigt wurde, dass sie zu Oligomerbildung führt (siehe 3.1.1 und (145;146)), zeigen die CD Spektra ein Minimum bei 218 nm, was eine β -Faltblatt Struktur anzeigt. Bei 0,02% SDS wurden, mit Ausnahme der Mangan enthaltenden Proben, sehr ähnlich Spektren aufgezeichnet.

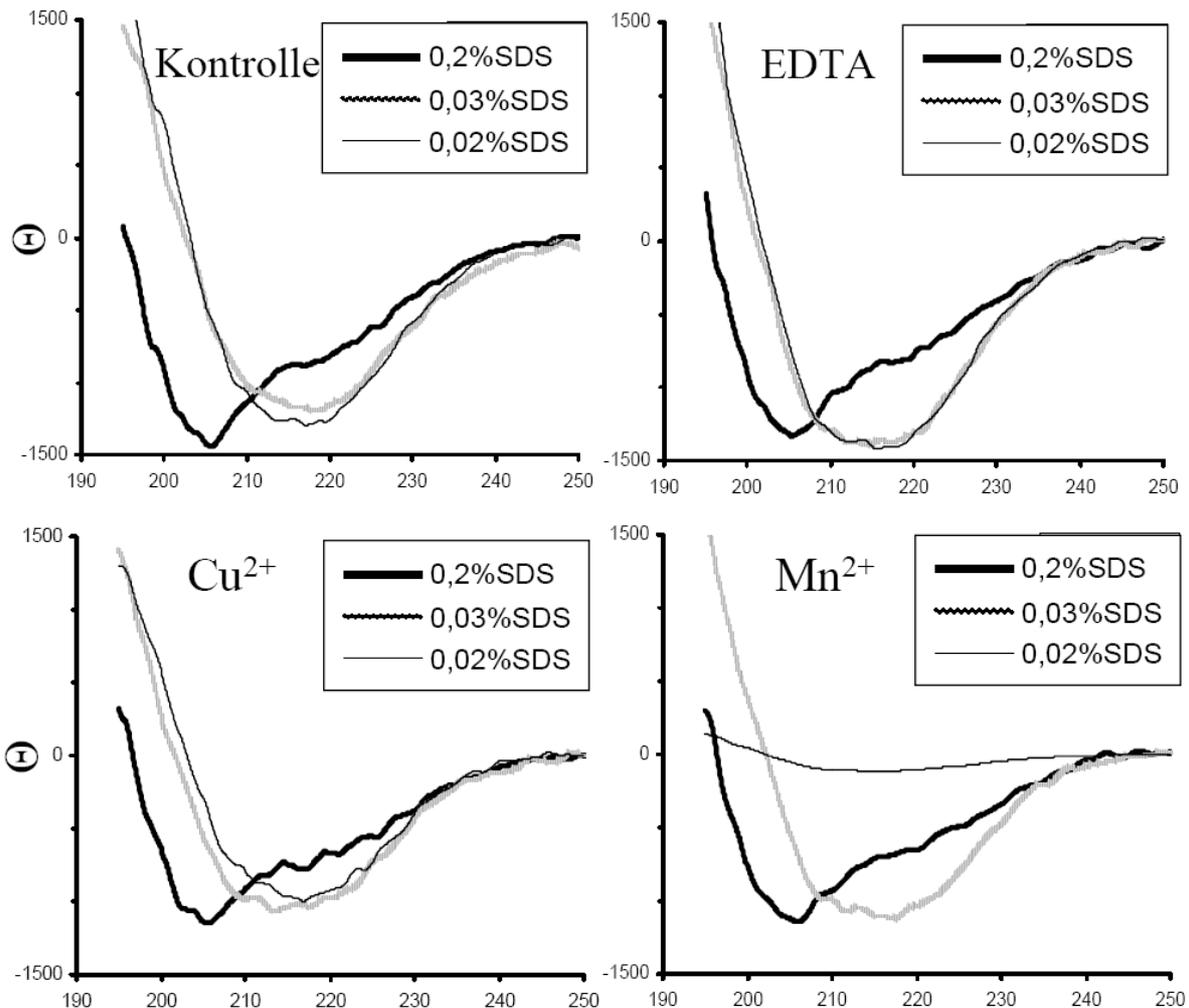


Abb. 3.7. Der Einfluss von Metallionen auf die β -Faltblatt Bildung von PrP. Die Aggregation lief in Gegenwart von jeweils $100\mu\text{M}$ EDTA, $30\mu\text{M}$ CuCl_2 , und $30\mu\text{M}$ MnCl_2 bei verschiedenen SDS Konzentrationen über 100 Minuten ab. Die PrP-Konzentration in den Proben war 400 nM . Die Veränderungen der Sekundärstruktur wurden durch Aufnahme der molaren Elliptizität der PrP Proben im angezeigten Bereich des Spektrums analysiert.

Die Mn^{2+} enthaltenden Proben bei 0,02% SDS zeigten ein sehr flaches Elliptizitätsspektrum, das wahrscheinlich durch Sedimentation von großen Aggregaten, die sich unter dieser Bedingung bilden, verursacht wird.

Die CD Spektren zeigten also, dass Kupfer nicht die Bildung von β -Faltblatt-reichem PrP verhindert, obgleich es die Aggregation bei niedrigen SDS Konzentrationen reduziert. Außerdem ist erkennbar, dass sich auch in Gegenwart von Mangan bei 0,2% SDS, d.h. ohne Aggregation, keine β -Faltblatt Formationen bilden.

3.2.3 Amyloidcharakter der rPrP Aggregate im SDS System

Ein wichtiges Merkmal von PrP^{Sc}, wie auch von den Proteinaggregaten, die sich bei verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten, wie M. Alzheimer, M. Parkinson oder der Chorea Huntington im Gehirngewebe ablagern, ist der Amyloidcharakter dieser Aggregate (59;61;167;199). Im Falle von Prionkrankheiten bildet der nach Umfaltung Proteinase K resistente Kern des PrP^{Sc} (PrP 27-30) Amyloidfibrillen mit hohem β -Faltblatt Anteil, die Thioflavin T binden. Auch für Aggregate aus rPrP wurde eine Thioflavin T Fluoreszenz, die den Amyloidcharakter der Aggregate belegt, beschrieben. Unter denaturierenden Bedingungen aus rPrP entstandene Amyloidfibrillen weisen die gleichen spezifischen Epitope für Antikörper wie PrP^{Sc} auf (196;199).

Um zu klären, ob in unserem *in vitro* Aggregationsmodell bei niedrigen SDS-Konzentrationen (0,02% SDS) Aggregate mit Amyloidcharakter entstehen, wurden Messungen zur Bestimmung der Thioflavin T (ThT) Fluoreszenz der entstehenden Proteinaggregate durchgeführt. Außerdem wurde untersucht, ob Mangan, für das gezeigt wurde, dass es die Aggregation von rPrP fördert (siehe 3.2.1), Einfluss auf die Amyloidbildung nimmt, und in wieweit durch die Auflösung der manganinduzierten Aggregate durch EDTA (siehe 3.2.5) deren Amyloidstruktur beeinflusst wird.

Wie erwartet zeigte sich bei hohen SDS Konzentrationen, bei denen mit FCS keine Aggregation detektierbar ist (siehe 3.1.1), und die CD Spektroskopie anzeigt, dass das Prionprotein in vorwiegend α -helikaler Faltung (siehe 3.2.2) vorliegt, nur basale ThT Fluoreszenz bei 490nm. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei niedrigen SDS Konzentrationen, wenn das PrP in einer β -Faltblatt reichen Form vorliegt und durch SIFT Messungen große Aggregate detektierbar sind (siehe 3.1.1 und 3.2.2), eine deutliche ThT Fluoreszenz, die den amyloiden Charakter der Aggregate belegt. Die Zugabe von 30 μ M Mangan zum Aggregationsansatz konnte weder bei hohen, noch

bei niedrigen SDS Konzentrationen Veränderungen der ThT Fluoreszenz bewirken. EDTA konnte zwar die ThT Fluoreszenz der Mn^{2+} enthaltenden Proben etwas verringern, jedoch auch keine qualitative Veränderung des Amyloidcharakters der Aggregate bewirken (siehe Abb. 3.8).

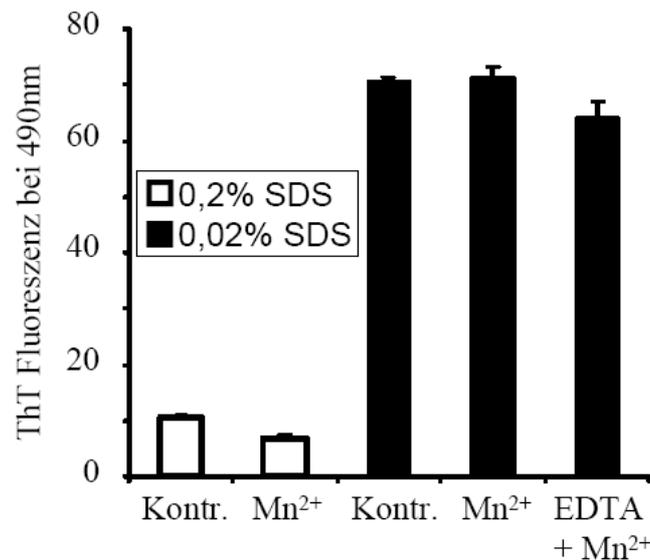


Abb. 3.8. Die Amyloidstruktur von rPrP Aggregaten. Große rPrP Aggregate, die bei niedrigen SDS Konzentrationen entstehen, haben Eigenschaften von Amyloid. Die Amyloidbildung von rPrP wurde durch Messung der ThT Fluoreszenz bei 490nm untersucht. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert + Standardfehler der ThT Fluoreszenz bei 490nm von drei parallelen Experimenten dar. Für jeden Puffer wurde ein PrP-freies Hintergrundsignal aufgezeichnet, das dann vom Messwert der Probe abgezogen wurde. Bei 0,2% SDS zeigt sich ein nur minimales Fluoreszenzsignal, wohingegen das starke Fluoreszenzsignal in Proben mit 0,02% SDS Amyloid in der Lösung anzeigt. Die Gegenwart von Mn^{2+} und /oder EDTA in der Probe verursachten keine wesentlichen Veränderungen der Messergebnisse.

3.2.4 Proteinase K-Resistenz der metallinduzierten Aggregate

PrP^{Sc} ist im Gegensatz zu PrP^C partiell resistent gegen den Verdau durch Proteinase K. Es konnte gezeigt werden, dass rPrP bei Inkubation mit Mangan unter bestimmten Bedingungen in einem zweiwöchigen nicht näher charakterisierten Alterungsprozess Proteinase K resistent werden kann. Dieser Erwerb der Proteinaseresistenz ging in diesen Versuchen mit einem strukturellen Übergang von hauptsächlich α -helikaler zu überwiegend β -Faltblatt Konfiguration einher, sowie mit Verlust der funktionellen Aktivität des PrP als Superoxyddismutase (siehe 1.4 und (168)).

Im SDS System vollzieht sich der strukturelle Übergang von α -Helix zu β -Faltblatt weitaus schneller (siehe 3.1.4 und (145)). Ziel der Untersuchungen mit Western-Blot war es zu analysieren, ob der strukturelle Übergang auch im SDS System mit Erwerb von Proteinase K Resistenz einhergeht. Außerdem wurde versucht, die Beobachtung zu bestätigen, dass die Resistenzgewinnung gegen Proteinase K von der Gegenwart von Metallionen in der Lösung abhängt. Zu diesem Zweck wurde mit den in 3.2.2 verwendeten Proben, in denen der strukturelle Übergang von PrP $^{\alpha}$ zu PrP $^{\beta}$ durch Analyse des CD Spektrums gezeigt werden konnte, nach 48h Inkubation ein PK-Verdau mit einer mittleren (50 μ g/ml) und einer niedrigen (3 μ g/ml) PK-Konzentration für 60 Minuten bei 37°C durchgeführt. Gleichartig wurden auch Proben, die mit DOSPA (siehe 2.7 und 3.3.1) inkubiert wurden, behandelt.

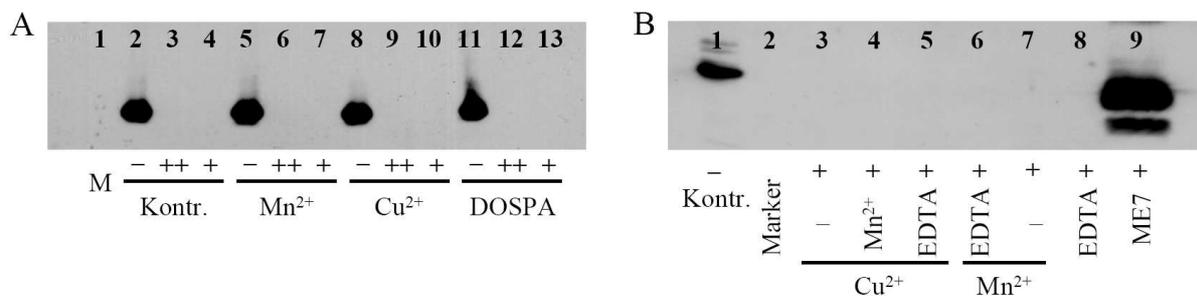


Abb. 3.9. Proteinase Stabilität der rPrP Aggregate aus dem SDS System. (A) zeigt einen Western-Blot (WB) des in Abb. 3.4 zur Aufnahme der CD Spektren verwendete rPrP, nachdem es unter den verwendeten Bedingungen (siehe 3.1.4) ca. 48h bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Spur eins enthält den Größenstandard. Die Spuren 2-4 zeigen unter Kontrollbedingungen (10mM NaPi, pH 7,2) 0,02% SDS inkubiertes rPrP ohne PK Verdau (-), nach Proteinase K Verdau mit 3 μ g/ml PK (+) und 50 μ g/ml PK (++) . Von den folgenden Spuren wurden 5-7 mit Mn²⁺, 8-10 mit Cu²⁺ und 11-13 mit DOSPA unter sonst gleichen Bedingungen inkubiert und verdaut. PrP ist nur in den unbehandelten Proben detektierbar. Unter den gegebenen Bedingungen entsteht also kein PK resistentes PrP. (B) zeigt den WB eines unter gleichen Bedingungen abgelaufenen PK-Verdau. Spur eins ist die rPrP Kontrolle in 10 mM NaPi +0,02% SDS ohne PK (-). Alle anderen Proben wurden mit 20 μ g/ml PK verdaut (+). Die Proben enthalten 30 μ M verschiedene Metallionen, mit denen sie ca. 48h inkubiert wurden. Spur 3 mit Cu²⁺, Spur 4 mit Cu²⁺ und Mn²⁺, Spur 5 mit Cu²⁺ und 100 μ M EDTA, Spur 6 mit 30 μ M Mn²⁺ und 100 μ M EDTA, Spur 7 mit Mn²⁺ und Spur 8 mit 100 μ M EDTA. Spur 9 enthält aufgereinigte murine Prionen des Stammes ME7 und Spur 2 den Größenstandard. Der Antikörper detektiert nur die nicht verdaute Kontrolle und die ME7 Prionen. Auch unter diesen Bedingungen konnte kein PK resistentes rPrP detektiert werden.

In keiner der untersuchten Proben fand sich PK resistentes Prionprotein (siehe Abb. 3.9 A). In einer Wiederholung dieses Versuches wurde die PK Konzentration auf 20 μ g/ml an die Bedingungen, bei denen PK Resistenz gefunden worden war (168), angepasst. Aber auch unter diesen Bedingungen konnte Prionprotein nur in der nicht

verdauten Kontrollprobe und der zur Kontrolle mitgeführten Probe von murinem PrP^{Sc} detektiert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass rPrP im SDS System nach Aggregation und Erwerb einer β -Faltblatt Struktur keine PK Resistenz erwirbt (siehe Abb. 3.9 B).

3.2.5 Stabilität der rPrP Aggregate

Um den molekularen Mechanismus des Manganwirkung weiter zu charakterisieren und die Architektur der Mn²⁺-induzierten Aggregate zu analysieren, wurde die

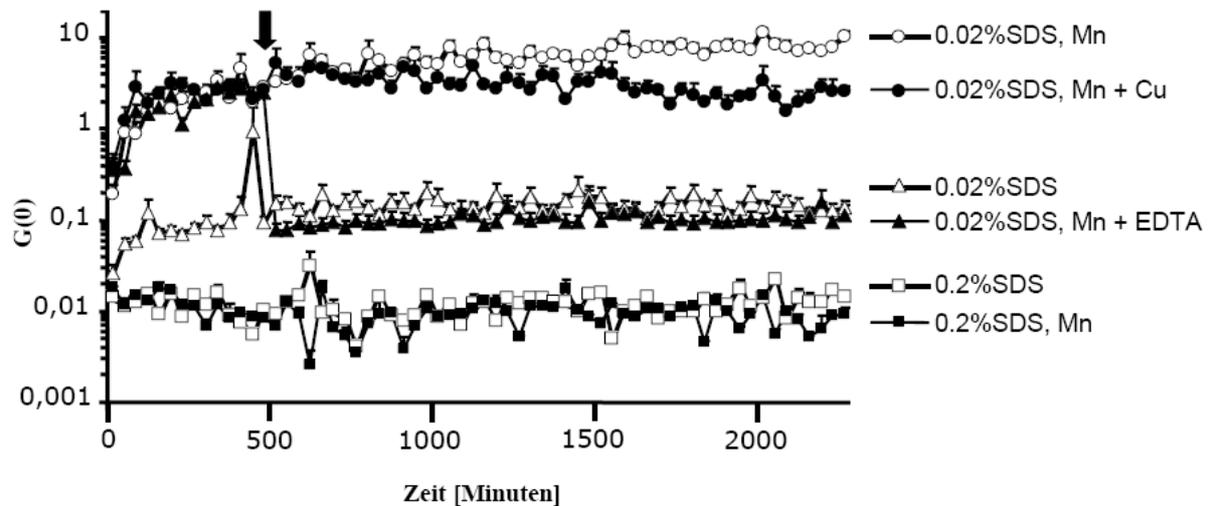


Abb. 3.10. Der Einfluss von Kupfer und EDTA auf in Gegenwart von Mangan gebildete PrP Aggregate. Der Graph zeigt den durch Kreuzkorrelationsanalyse gemessenen Zeitverlauf der PrP Aggregation. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert + Standardfehler der Kreuzkorrelationsamplitude $[G(0)]$ von sechs parallelen Experimenten für die Proben mit 0,02% SDS und von 2 parallelen Experimenten für die Proben mit 0,2% SDS dar. Nach ca. 500 Minuten Aggregationszeit wurden zu den Mangan enthaltenden Proben EDTA oder CuCl₂ gegeben (↓). Die Zugabe von Kupfer verursacht einen kleinen graduellen Rückgang der Aggregation. Im Gegensatz dazu induziert EDTA einen schnellen Rückgang der Kreuzkorrelationsamplitude bis hinab zu einem Niveau, das in Abwesenheit von Mangan erreicht wurde.

Stabilität von PrP Aggregaten, die sich in An- und in Abwesenheit von MnCl₂ gebildet hatten näher untersucht (siehe 3.2.2 und (181)). Während gezeigt werden konnte, dass 1 μ M Cu²⁺ den Effekt von 30 μ M Mn²⁺ bei simultaner Zugabe komplett blocken kann (siehe 3.2.2), kann die selbe Menge an Cu²⁺, wenn sie zu einer Lösung von bei

0,02% SDS mit 30 μ M Mn²⁺ voraggregiertem PrP gegeben wird, nur eine kleine graduelle Verminderung des Aggregationsniveaus bewirken (siehe Abb. 3.10).

Im Gegensatz dazu verursachten 100 μ M EDTA einen steilen Abfall des Aggregationsniveaus. Interessanterweise löste EDTA die Aggregate nicht komplett auf, sondern reduzierte den Grad der Aggregation nur auf praktisch das selbe Niveau, das bei Aggregation von PrP in 0,02% SDS in Abwesenheit von Mn²⁺ erreicht wurde

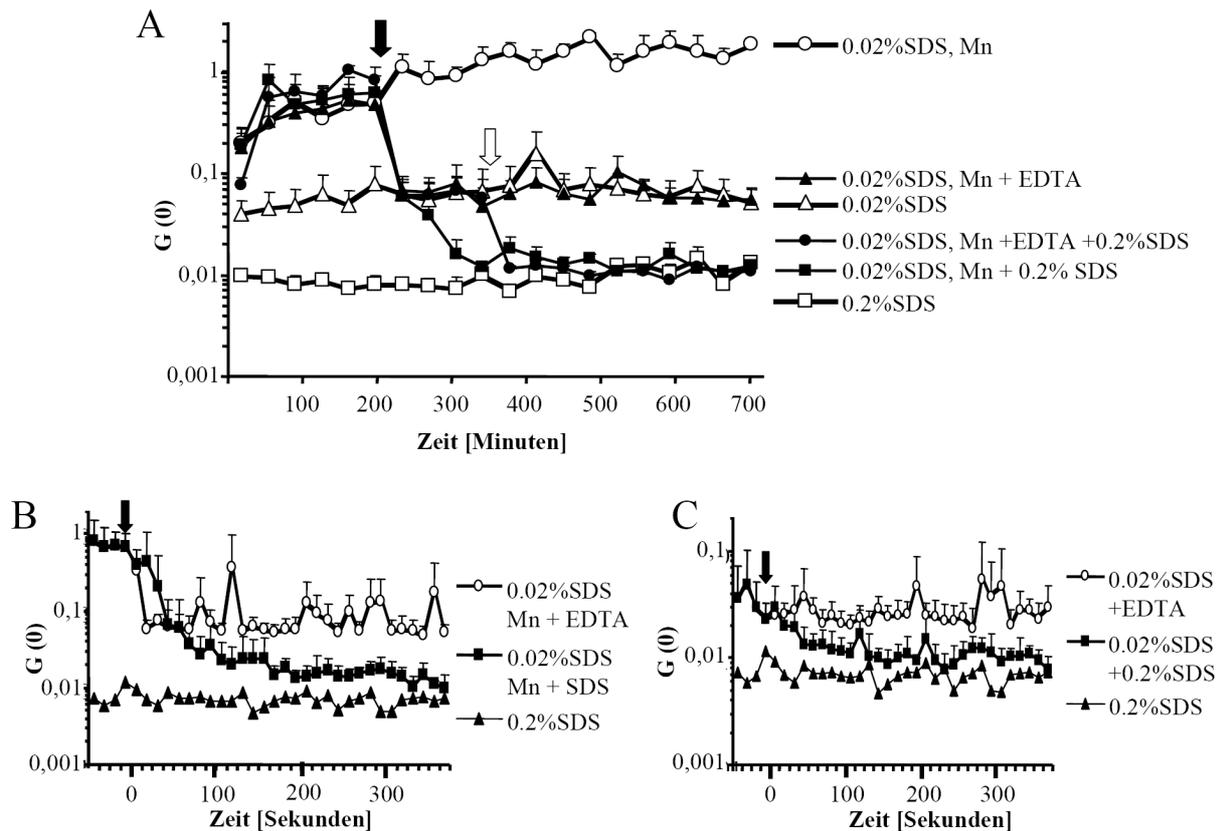


Abb. 3.11. Die Stabilität der PrP Aggregate. (A) Der Effekt von SDS und EDTA auf in Gegenwart von Mangan formierte Prionproteinaggregate. Die Aggregation wurde durch die Kreuzkorrelationsamplitude [$G(0)$] gemessen. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert + Standardfehler von drei unabhängigen Aggregationsansätzen dar. Bei Proben mit 0,02% SDS wurden pro Versuch sechs parallele Proben für jede experimentelle Gruppe gemessen. Bei Proben mit 0,2% SDS waren es zwei Proben pro Gruppe. Nach der Bildung von PrP Aggregaten wurden jeweils SDS oder EDTA zu den MnCl₂ enthaltenden Proben gegeben (↓). Wie schon in Abb. 3.10 gezeigt verursacht EDTA eine schnelle Reduktion der Aggregation bis zu dem Niveau, das man ohne Zugabe von Mangan erhält. Im Gegensatz dazu induzierte die Zugabe von 0,2% SDS eine komplette Auflösung der PrP Aggregate. In gleicher Weise löst SDS die nach vorheriger EDTA Zugabe verbleibenden Aggregate (⚡) auf. (B,C) zeigt die verschiedenen Zeitverläufe der Auflösung von PrP Aggregaten in höherer zeitlicher Auflösung. Nach >100 Minuten Aggregationszeit in 0,02% SDS und in Gegenwart von MnCl₂ (B) und unter Kontrollbedingungen ohne MnCl₂ (C) wurden entweder EDTA oder SDS hinzugegeben. Die Datenpunkte in (B) und (C) zeigen den Mittelwert + Standardfehler von vier aufeinanderfolgenden Experimenten. Der von EDTA verursachte Effekt läuft sehr schnell ab, wohingegen der durch SDS induzierte Effekt einige Minuten dauert.

(Abb. 3.10). Dieser Effekt war in zahlreichen unabhängigen Experimenten hochgradig reproduzierbar (siehe Abb. 3.11 und nicht gezeigte Daten).

Vollständig aufgelöst werden konnten die Aggregate durch Zugabe von SDS auf eine Endkonzentration von 0,2%. Dies ist eine Konzentration, für die schon vorher gezeigt wurde, dass sie die *de novo* Aggregation und Bildung von β -Faltblatt Strukturen blockt (145;146;181).

Hinsichtlich des Zeitverlaufs der von SDS und EDTA ausgelösten Aggregatauflösung wurde deutlich, dass der antiaggregative Gesamteffekt von SDS zwar stärker, der Auflösungsprozess aber deutlich langsamer war als bei EDTA (Abb. 3.11 B und C). Nachdem SDS zu voraggregiertem PrP gegeben worden war, dauerte es mehrere Minuten bis der Maximaleffekt erreicht wurde. Im Gegensatz dazu war der Effekt von EDTA sehr schnell und auf mit Mn^{2+} voraggregiertes PrP begrenzt. Es war nicht möglich, mit EDTA PrP-Aggregate aufzulösen, die bei niedriger SDS Konzentration in Abwesenheit von Mn^{2+} entstanden waren (Abb. 3.11 C).

3.2.6 Durch Mangan induzierte Multimere

Die Beobachtung, dass EDTA das Aggregationsniveau in Mn^{2+} enthaltenden Proben auf das Niveau, das ohne Manganzugabe erreicht wird, reduziert, führte zu der Hypothese, dass Mangan keinen direkten Einfluss auf die SDS abhängige Aggregation hat, sondern vielmehr einen zweiten Prozess möglich macht, in dem sich kleine, präformierte Aggregate zu größeren Komplexen zusammenlagern.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurden mit Hilfe der FIDA-Analyse Proben, die, genau wie in Abbildung 3.11 gezeigt, Mangan enthielten oder Mangan frei waren, vor und nach der Behandlung mit EDTA hinsichtlich PrP-Aggregate charakterisiert. Um die Konzentration und Helligkeit von PrP Aggregaten und verbleibenden PrP Monomeren zu bestimmen, wurde ein 1D-FIDA Fit für 2 Komponenten durchgeführt. In diesem Fit wurde als vorgegebener Parameter für die Komponente 2 die molekulare Helligkeit von monomerem PrP (Q2) verwendet. Dieser wurde auf den vorher bestimmten Wert von monomerem PrP in einer Lösung aus nicht aggregiertem PrP mit 0,2% SDS fixiert. Auf diese Weise ließ sich das Signal des monomeren PrP herausfiltern, so dass es möglich war, die PrP Aggregate als separate Komponente 1 zu betrachten. Folglich stellen in diesem Fit die molekulare

Helligkeit (Q) und die Konzentration (C) der Komponente 1 Werte für die Größe und Konzentration von PrP Aggregaten in Lösung dar (siehe 2.2.5.3).

Unter Kontrollbedingungen zeigte der FIDA Fit die Gegenwart von kleinen, oligomeren Aggregaten aus PrP (siehe Abb. 3.12). Durch Zugabe von $MnCl_2$ wurde die Konzentration von PrP Aggregaten deutlich reduziert, während zur selben Zeit die Helligkeit der einzelnen Aggregate deutlich anstieg. Mangan scheint also die Assoziation von kleinen PrP Oligomeren zu größeren Komplexen zu fördern. Durch Zugabe von EDTA konnte dieser Effekt umgekehrt werden, was nahe legt, dass EDTA den Effekt von Mangan durch Chelatierung aufhebt, wodurch größere Aggregate, die zuvor durch Mangan stabilisiert wurden, zerfallen.

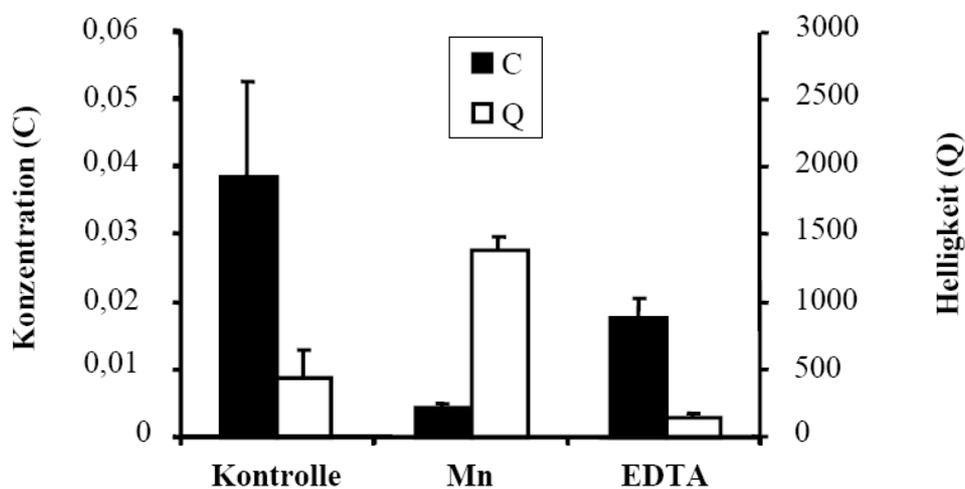


Abb. 3.12. Mangan induziert die Entstehung von größeren Aggregaten aus PrP Oligomeren. Die Helligkeit und die Konzentration von PrP Aggregaten in Lösung wurden durch einen 1D-FIDA Fit bestimmt. Das PrP der Kontrollproben aggregierte in 0,02% SDS („Kontrolle“), die Versuchsproben in 0,02% SDS + $30\mu M$ $MnCl_2$ („Mn“) oder wurden nach 500 Minuten Aggregation in Gegenwart von $MnCl_2$ mit $100\mu M$ EDTA versetzt (Abb. 3.9). Die Datenpunkte stellen den Mittelwert + Standardfehler von sechs parallelen Proben in einem repräsentativen Experiment dar. Die Zugabe von Mangan reduziert die Konzentration C der PrP Aggregate und erhöht gleichzeitig die Helligkeit Q der Einzelaggregate. Dies zeigt, dass Mangan die Zusammenlagerung von PrP Oligomeren zu größeren Komplexen induziert. Dieser Effekt ist durch EDTA reversibel.

Um die molekulare Wirkungsweise von Mangan weiter zu charakterisieren und die Frage zu beantworten, ob Mn^{2+} tatsächlich präformierte, oligomere PrP Bausteine zu größeren Komplexen zusammenfügt, wurden Messungen mit einer Mischung aus präformierten Aggregaten, die jeweils nur rote oder grüne Fluoreszenzfarbstoffe trugen, eingesetzt. Für diesen Versuch wurde die Aggregation von mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa488 („grün“) und mit Alexa647 („rot“) markiertem PrP in getrennten Messgefäßen durch Verminderung der SDS Konzentration auf 0,02%

SDS induziert. Die Aggregationsreaktion wurde durch Messungen verfolgt, bis ein stabiler Endzustand nach ca. 120 Minuten erreicht war. Danach wurden die nur rot markierten Aggregate mit den nur grün markierten Aggregaten in einem neuen Messgefäß gemischt und das Verhalten in diesen Proben für weitere 100 Minuten verfolgt.

Die so durchgeführten Versuche wurden mit 2D-SIFT analysiert, das neben seiner hohen Sensitivität für große Aggregate die Möglichkeit bietet, Co-Aggregationsprozesse zu untersuchen (siehe 2.2.5.3). Da die Proteinaggregate, die aus mit rotem oder grünem Fluoreszenzfarbstoff markiertem PrP bestehen, das Messvolumen zu verschiedenen Zeitpunkten durchwandern, kann für jedes Aggregat einzeln das Färbeverhältnis seiner Bestandteile sowie die Gesamtintensität bestimmt werden. Auf diese Weise kann die molekulare Zusammensetzung von Aggregaten auch in Proben bestimmt werden, die eine Mischung aus verschiedenen Typen von Aggregaten enthalten. Besonders anschaulich sind die Ergebnisse nach Auftrag in einem 2D Histogramm (siehe Abb. 3.13).

Es war also möglich, nach Durchmischung der Proben, die entweder nur rot oder nur grün markierten PrP Aggregate enthielten, für jedes Aggregat die Zugehörigkeit zu den zwei verschiedenen Ausgangsgruppen zu bestimmen.

Während 100 Minuten wurde das Verhalten der „roten“ und „grünen“ Aggregate in dem selben Messgefäß beobachtet. Da die Aggregation schon in dem 120 Minuten Intervall vorher praktisch vollständig abgelaufen war, kam es in diesem Intervall nicht zu einer weiteren Zunahme der Aggregation oder der Größe der einzelnen Teilchen. Die überwiegende Mehrheit der Aggregate trug auch nach Ablauf dieser Zeit noch nur rote und nur grüne Fluoreszenzmarkierungen. Das bedeutet, dass zwischen den Aggregaten nur sehr wenig Mischung des PrP durch entweder Austausch von Monomeren oder Zusammenlagerung zu großen Komplexen stattgefunden hatte (Abb. 3.13 A).

Nach Zugabe von $MnCl_2$ in einer Endkonzentration von $30\mu M$ konnten deutlich hellere Aggregate detektiert werden, die beide Fluoreszenzfarbstoffe trugen und ein breites Verteilungsverhältnis der beiden Farben aufwiesen (Abb. 3.12 B). Anschließend wurde EDTA in einer Endkonzentration von $100\mu M$ hinzugegeben, was wieder zu einer 2D-FIDA Verteilung führte, die der Ausgangssituation sehr ähnlich war. Wieder wurden vor allem entweder rot oder grün markierte Aggregate detektiert.

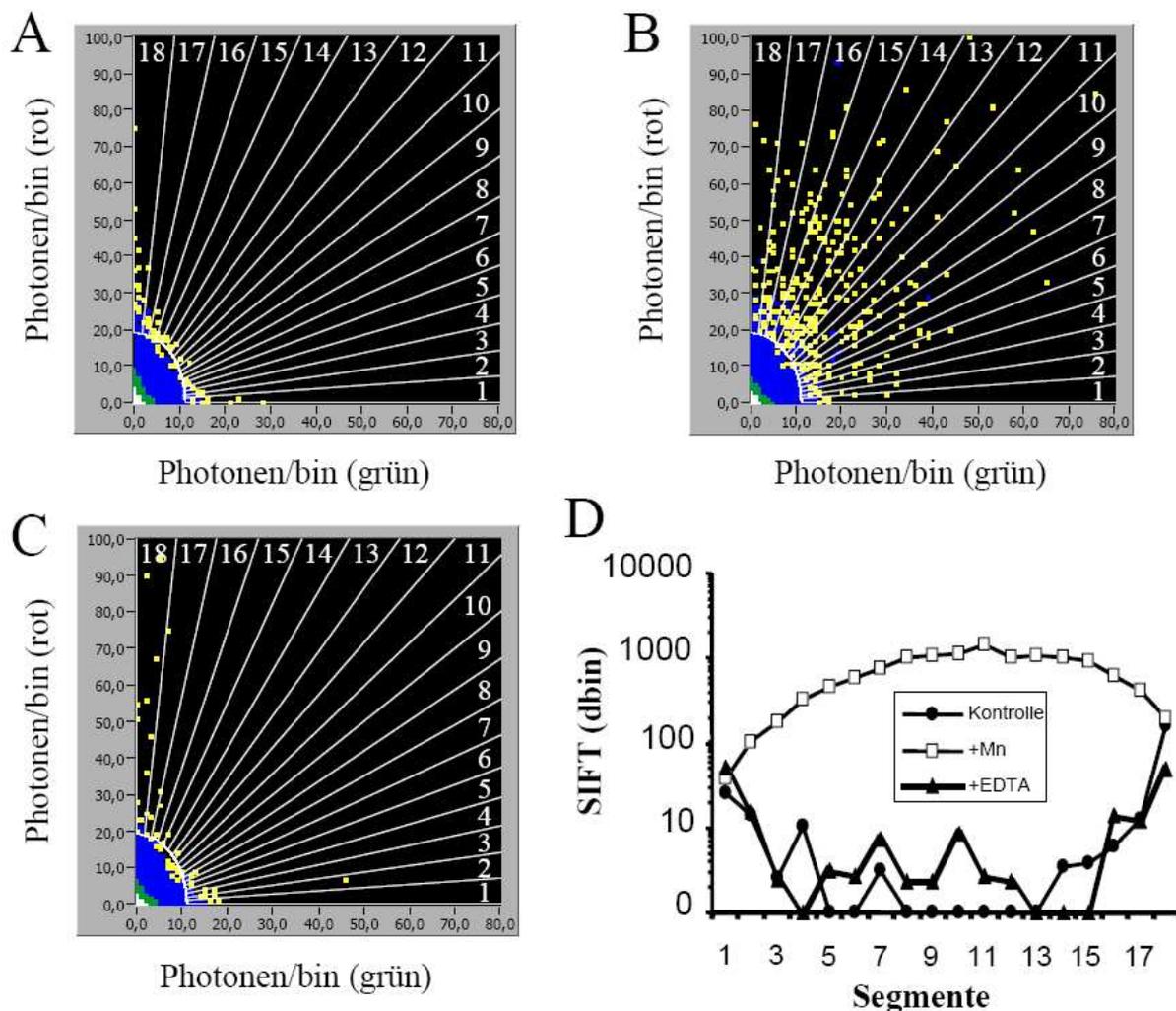


Abb. 3.13. Der Effekt von Mangan auf die Architektur von PrP Aggregaten. Um die Architektur der Mn^{2+} induzierten PrP Aggregate näher zu untersuchen, wurde für 120 Minuten die Aggregation von mit Alexa488 markiertem PrP („grün“) und mit Alexa647 („rot“) in jeweils getrennten Gefäßen in 0,02% SDS induziert. Danach wurden Proben aus Lösungen mit aggregiertem „grünem“ PrP mit Proben aus aggregiertem „rotem“ PrP in neuen Probegefäßen vereinigt und für 100 Minuten inkubiert (A). Dann wurde $30\mu M MnCl_2$ hinzugegeben und für weitere 100 Minuten inkubiert (B). Am Ende wurde den mit Mangan inkubierten Proben $100\mu M EDTA$ zugefügt (C). (A-C) 2D-SIFT Histogramme von einem repräsentativen Experiment mit einer Messzeit von $4 \times 20s$. (D) Quantitative Auswertung des selben Experiments mit 2D-SIFT Analyse unter Verwendung von distanzgewichteten Bins (dbin) wie in Material und Methoden (siehe 2.2.5.3) beschrieben. Die Datenpunkte stellen den Mittelwert aus vier parallelen Proben aus jeder Gruppe dar. Vor der Zugabe von Mangan („Kontrolle“), waren die meisten Aggregate nur grün (Segmente 1-3) oder nur rot (Segmente 16-18) markiert. Die Gegenwart von Mangan generiert hellere Aggregate, die rote und grüne Markierungen in einer breiten Verteilung tragen („Mn“). Zugabe von EDTA zu diesen Proben verursacht durch bevorzugten Verlust von rot und grün doppelmarkierten Aggregaten eine Verteilungsveränderung zu einer dem Ausgangszustand sehr ähnlichen Aufteilung in hauptsächlich rot oder grün markierte Aggregate.

Die mit beiden Farben markierten Aggregate waren praktisch nicht mehr zu sehen (Abb. 3.13 C und 3.13 D).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Haupteffekt von Mangan darin besteht, präformierte oligomere PrP Bausteine reversibel in Aggregaten höherer Ordnung

zusammenzuführen. Dies führt in der FCS Messung zu einem starken Anstieg der Kreuzkorrelation und damit dem Eindruck verstärkter Aggregation. Dies passt gut mit der Beobachtung zusammen, dass Mangan bei SDS Konzentrationen, die die Bildung von Oligomeren blocken, keinen Effekt hat (Abb. 3.4 und (181)). Nach Chelatierung von Mangan durch EDTA scheinen die PrP Oligomer Bausteine der Ausgangssituation wieder vorzuliegen. Dies legt nahe, dass die Interaktion von PrP innerhalb der Bausteine von der Mangan getriggerten PrP Interaktion zwischen den Bausteinen unterschiedlich ist, was erklären würde, dass nach der Zugabe von EDTA die einzelnen Oligomer Bausteine stabiler sind als das Gesamtaggregate.

3.2.7 Rolle von Kupferbindestellen bei manganinduzierter Aggregation von PrP

Schon mikromolare Konzentrationen von Cu^{2+} vermindern die Bildung von PrP-Aggregaten bei niedrigen SDS Konzentration, ohne dass es zu einer Blockade der strukturellen Veränderung in β -Faltblatt Formationen kommt. Außerdem wird bei simultaner Gabe der aggregationsfördernde Effekt von Mangan geblockt (Siehe 3.2.1 und 3.2.2). Jedoch ist Auflösung von bereits vorhandenen manganinduzierten Aggregaten mit Cu^{2+} nicht möglich, wohingegen die Aggregate durch EDTA schnell zerstört wurden (siehe Abb. 3.10). Diese Ergebnisse führten zu der Überlegung, dass die Interaktion von Mangan und Kupfer und deren Auswirkungen auf das Prionprotein möglicherweise nicht durch einen direkten Wettbewerb um die Histidin-abhängigen Kupferbindestellen des PrP, sondern vielmehr durch eine allosterische Interaktionen bedingt sein könnten.

Um dieser Hypothese auf den Grund zu gehen, wurde PrP verwendet, das mit Diethylpyrokarbonat (DEPC) vorinkubiert war. DEPC bindet kovalent an die Histidinreste in der Kupferbindestelle des PrP und macht damit die Metallionenbindung dort ineffizient (149). In diesen Versuchen zeigte sich, dass die Inkubation mit DEPC den aggregationsfördernden Effekt von Mn^{2+} nicht verhinderte, wohingegen allerdings der antiaggregative Effekt von Kupfer durch DEPC in einer dosisabhängigen Weise reduziert wurde (Abb. 3.14). Dies belegt, dass der Kupfereffekt durch eine Kupferbindung an den gut charakterisierten histidin-abhängigen Kupferbindestellen des PrP vermittelt wird, wohingegen Mangan an

einer oder mehreren anderen Bindestellen, die kein Histidin benötigen, mit dem

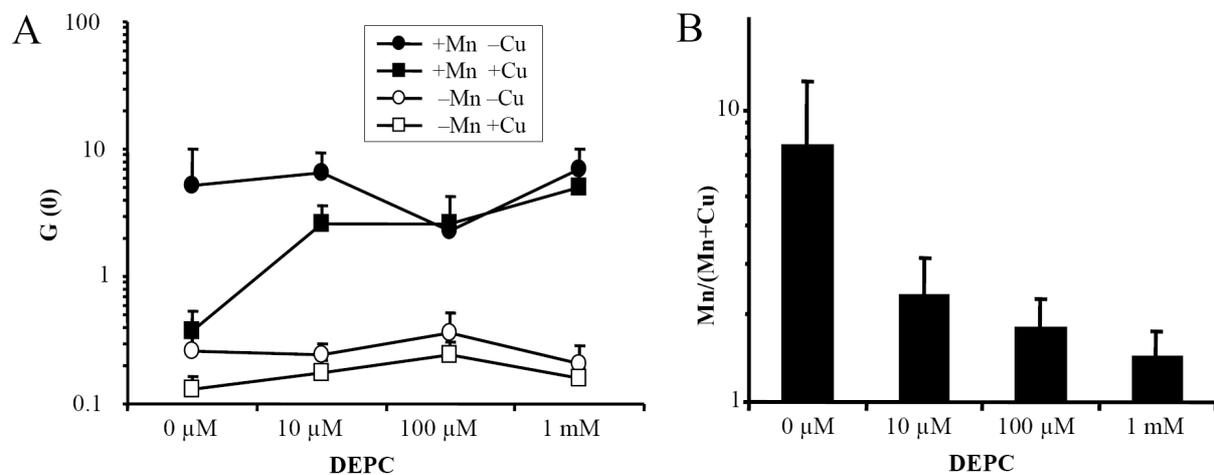


Abb. 3.14. DEPC hemmt die Fähigkeit von Kupfer, den aggregationsfördernden Effekt von Mangan zu blocken. (A) Nach Inkubation von PrP in verschiedenen DEPC Konzentrationen wurde der hemmende Effekt von $1\mu\text{M Cu}^{2+}$ auf die Aggregation von Prionprotein analysiert. Die Aggregation wurde in 0,02% SDS in Ab- oder Präsenz von $30\mu\text{M Mn}^{2+}$ gemessen. Die Datenpunkte repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler der Kreuzkorrelationsamplitude $[G(0)]$ von sechs unabhängigen Experimenten aus jeweils 4 parallelen Proben. (B) Das Verhältnis des Aggregationsniveaus der manganinduzierten Aggregation in Ab- oder Anwesenheit von Kupfer für verschiedene DEPC Konzentrationen. Vorinkubation mit DEPC hemmt den aggregationshemmenden Effekt von Cu^{2+} in einer dosisabhängigen Weise. Im Gegensatz dazu wird der aggregationsfördernde Effekt von Mangan nicht gehemmt.

Prionprotein in Interaktion tritt.

3.3 Seeding von rPrP Aggregation durch humane Prion Rods

3.3.1 Anlagerung von monomerem rPrP an Prion Rods

Nach der *Seeded Aggregation* Hypothese über die Entstehung und Verbreitung von Prionen ist die Anlagerung von α -helikalem PrP an Prionaggregate zur Prionpropagation notwendig (140;204;205). Nach einem älteren Modell können Prionen auch ohne Aggregation in einem Heterodimer katalytisch entstehen (206).

Um zu untersuchen, ob auch *in vitro* mit fluoreszenzmarkiertem rPrP eine Anlagerung von rPrP an Prion Rods gezeigt werden kann und ob diese Prion Rods als „Seeds“ für die Aggregation von rPrP wirken, wurden Co-Aggregationsexperimente mit rPrP und Prion-Rods durchgeführt (siehe 2.7 und (192)).

Es konnte gezeigt werden, dass grün markiertes murines rPrP sich gut an mit Antikörpern markierte Prion-Rods anlagert und so zweifarbig markierte große Aggregate entstehen. Ein weiterer Hinweis auf die Spezifität der rPrP-Prion-Bindung war, dass die Anlagerung durch die Substanz DOSPA geblockt werden kann (siehe Abb. 3.15). Schon vorher konnte gezeigt werden, dass diese Substanz in Zellkultur die Prionpropagation verhindert (207).

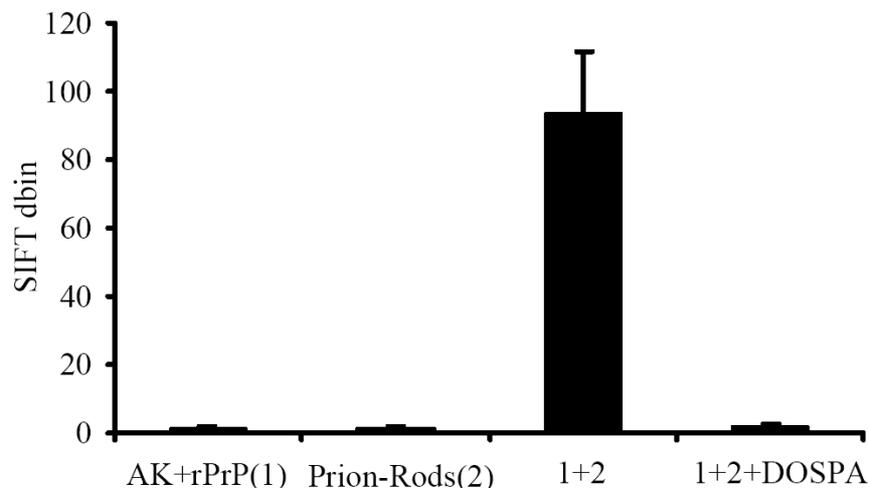


Abb. 3.15.: Anlagerung von rPrP an Prion Rods & Blockade dieser Anlagerung durch DOSPA. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardfehler der detektierten großen Aggregate in den ersten (grünen) fünf Sektoren der 2D-FIDA Darstellung von 16 unabhängigen parallelen Proben eines repräsentativen Experiments. „AK+rPrP(1)“ zeigt die großen Aggregate der Sondenmischung aus rot markierten anti-hum.-PrP-AK und grün markiertem murinem rPrP. „Prion-Rods(2)“ zeigt die ohne Fluoreszenzmarkierung detektierten großen Aggregate in der Lösung aus isolierten humanen Prionen. In „1+2“ ist die Anlagerung des murinen rPrP an humane Prionen gezeigt. Es werden nun große „grüne“ Aggregate in den ersten 5 Sektoren detektiert. Wie man in „1+2+DOSPA“ deutlich sehen kann, wird diese Anlagerung durch Zugabe von DOSPA praktisch vollständig blockiert.

3.3.2 Einfluss von Cu^{2+} auf die PrP^{C} - PrP^{Sc} Interaktion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Metallionen auf die *de novo* Aggregation von rPrP und damit auf die Genese von Prionprotein-Aggregaten erhebliche und verschiedenartige spezifische Effekte haben, wurde anschließend untersucht, ob die Gegenwart von Cu^{2+} Einfluss auf die PrP^{C} - PrP^{Sc} -Interaktion hat.

Unter den selben Bedingungen wie in 3.3.1 aufgeführt und in 2.7 näher erläutert, wurden unter Zugabe von Cu^{2+} Versuche zum Einfluss von Metallionen auf diese Interaktion durchgeführt. Dabei wurden die in Abb. 3.15 beispielhaft gezeigten Proben regelmäßig als Qualitätskontrolle mitgeführt. Nur Versuche, in denen in der Sonden- und der Prion-Rod-Lösung keine Aggregate zu finden waren, und in gemischten Proben eine Anlagerung, die durch DOSPA Zugabe blockierbar war, zeigten, wurden als aussagekräftig eingestuft (siehe Abb. 3.15).

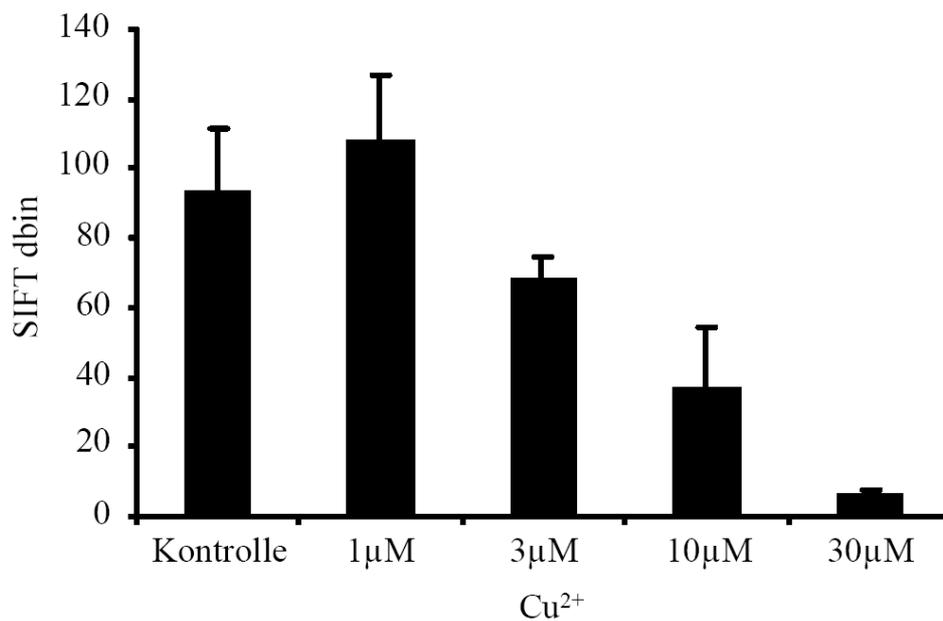


Abb. 3.16.: Cu^{2+} hemmt dosisabhängig die Anlagerung von rPrP an humane Prion-Rods. Zu sehen sind der Mittelwert und der Standardfehler des hochintensiven Signals in den ersten 5 Sektoren der 2D-FIDA Darstellung von 8 unabhängigen parallelen Proben eines repräsentativen Experiments. Dargestellt ist die Kontrollprobe ohne Kupferzusatz, sowie aufsteigende Kupferkonzentrationen.

Es wurde gezeigt, dass Cu^{2+} dosisabhängig die Anlagerung von rPrP an Prion Rods hemmt (siehe Abb. 3.16).

4. Diskussion

4.1 SDS gesteuerte *in vitro* Aggregation von rPrP als Modellsystem zur Analyse der PrP-Konversion

Proteinaggregation ist ein zentraler Aspekt bei neurodegenerativen Erkrankungen im Allgemeinen und der Prionkrankheiten im Besonderen (5;9;63;208). In Gehirnen von an der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit verstorbenen Patienten finden sich Aggregate von Prionprotein, dessen biochemische Eigenschaften verändert sind. Es hat seine räumliche Struktur verändert und ist damit neurotoxisch und infektiös geworden. Die umgefaltete Form enthält viel β -Faltblatt und ist resistent gegen Proteasen (siehe 1.3). Der *Seeded Aggregation* Hypothese zufolge ist Proteinaggregation notwendig, damit diese pathologische Umfaltung geschieht (142;203). Auch ein weiteres Modell, das Heterodimer Modell, setzt eine räumliche Interaktion von Prionproteinen für die Proteinumfaltung und Prionpropagation voraus (63;140).

Im physiologischen Zustand liegt das Prionprotein in einer nicht aggregierten hauptsächlich aus α -Helices bestehenden Form vor. Es gibt eine Anzahl von Modellen, welche die Konversion von gereinigtem α -helikalem Prion Protein (PrP^α) in die pathologische Form, die im Wesentlichen aus β -Faltblatt-Formationen (PrP^β) besteht, *in vitro* nachvollziehen (146;199;209-211). Wenn das Prion Protein unter den von uns gewählten Bedingungen seine β -Faltblatt Formation annimmt, aggregiert es (siehe 3.1.1).

Um verschiedene Aspekte der Aggregation und Strukturumwandlung von rekombinantem Prionprotein zu untersuchen, verwendete ich ein Modell, das verschiedene Konzentration des Detergens Sodiumdodecylsulfat (SDS) benutzt, um den strukturellen Übergang von PrP^α zu PrP^β zu induzieren. Dieses Modell wurde von der Gruppe um D. Riesner in Düsseldorf entwickelt und intensiv untersucht (145;146). Das Modell eignet sich hervorragend für Untersuchungen mit CD-Spektroskopie und konfokaler Einzelmolekülspektroskopie. Mit diesen komplementären Techniken konnte gezeigt werden, dass die Umfaltung von rPrP gleichzeitig mit der Aggregation stattfindet, was die oben erwähnten Hypothesen zur Prionpropagation nachvollzieht und stützt.

Der Konversionsprozess des Prionproteins im SDS-Ansatz ist durch Veränderungen der SDS- Konzentration sehr präzise steuerbar. Außerdem bietet er den Vorteil, dass

die Konversion bei physiologischem pH stattfindet. Dies war für einen Teil meiner Experimente von besonderer Bedeutung, da die Affinität von Metallionen zu PrP vom pH-Wert beeinflusst wird (131). Im Unterschied zur Arbeitsgruppe Riesner wurde das humane rekombinante Prion Protein von mir in voller *in vivo* exprimierter Länge, PrP²³⁻²³¹, verwendet. Die von der Gruppe Riesner veröffentlichten Daten wurden mit N-terminal trankiertem PrP⁹⁰⁻²³¹ gewonnen, das die Metallbindestellen der histidinreichen „Repeat-Region“ nicht enthält (145;146). PrP⁹⁰⁻²³¹ enthält damit nur eine der fünf in der Literatur beschriebenen Kupferbindestellen des PrP (siehe 1.4 und Abb. 1.2). Daher ist es für Untersuchungen der Metallioneninteraktion mit PrP essentiell, Prionprotein in voller *in vivo* exprimierter Länge, rPrP²³⁻²³¹, zu verwenden. Ein möglicher Kritikpunkt an diesem *in vitro* Modell ist die Verwendung von Detergens. Durch dieses wird das Protein in geringem Maße denaturiert, so dass es nicht mehr vollständig dem physiologischen Faltungszustand entspricht. Mit diesem Problem haben auch andere etablierte Systeme zur Untersuchung der Aggregation des Prionproteins zu kämpfen (199;209). Es gibt jedoch Hinweise, dass ein teilweise ungefaltetes PrP notwendig für Prionentstehung und -propagation ist (204).

In meinen Untersuchungen fand ich, dass die PrP-Aggregation mit abnehmender SDS Konzentration zunimmt und der Schwellenwert für den Beginn der Aggregation bei ca. 0,05% SDS liegt (siehe 3.1.1). In gleicher Weise verändert sich auch die Sekundärstruktur des PrP. Der Übergang von der α - in die β -Form ließ sich auch mit CD-Spektroskopie verfolgen (siehe 3.2.2). Mit beiden Messtechniken konnten die Ergebnisse, welche die Arbeitsgruppe um D. Riesner für PrP⁹⁰⁻²³¹ publiziert hatte, für PrP²³⁻²³¹ bestätigt werden (145;146;181).

Auch Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, nach denen aggregierendes Prionprotein unter denaturierenden Bedingungen, hier allerdings mit Harnstoff, Amyloidcharakter entwickelt (199), ließen sich durch Thioflavin T Fluoreszenzmessungen für das SDS Modell bestätigen (siehe 3.2.3). Die pathologische Form von PrP, PrP^{Sc}, weist im Gegensatz zur physiologischen Form die Thioflavin T Fluoreszenzeigenschaften von Amyloid auf (4).

Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass sich in unserem Modell drei wichtige Vorgänge der Prionogenese und -propagation, die Aggregation, die Veränderung der Sekundärstruktur und das Gewinnen von Amyloideigenschaften nachvollziehen lassen. Darüber hinaus illustrieren die Untersuchungen, in denen ein unterschiedliches Aggregationsverhalten von Prionprotein, das an Aminosäure 129

Methionin trägt, zu Prionprotein, das an der selben Stelle Valin hat, gezeigt werden konnte, die Präzision, mit der Messungen in diesem Modell möglich sind (siehe 3.1.3). Schon der Austausch einer Aminosäure und die dadurch entstehende Strukturvariante zeigt korrespondierend subtile, aber messtechnisch erfassbare Veränderungen der Aggregation.

4.2 Einsatz und Möglichkeiten von FCS und SIFT

Der Hauptteil der Messungen dieser Arbeit wurden mit FCS und SIFT durchgeführt (siehe 2.2.1 und 2.2.2). Diese fluoreszenzbasierten Einzelmolekülspektroskopieverfahren werden seit Jahren auf dem Gebiet der Prionforschung im Bereich der naturwissenschaftlichen Grundlagenforschung und zur Entwicklung hochsensitiver Diagnoseverfahren eingesetzt (145;146;177;178) (siehe auch 1.7). Auch in Forschungsarbeiten an anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimerschen Erkrankung (208;212) und dem Morbus Parkinson (182), in deren Pathogenese Proteinaggregation von Bedeutung ist, wird diese Technik eingesetzt. Große Vorteile der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie liegen darin, dass es sich um so genannte „high content“ Messungen handelt. Das bedeutet, dass sich aus einer einzigen Messung anhand von verschiedenen Analyseverfahren eine Fülle von Parametern bestimmen lassen. So erhält man parallel unter anderem Daten zu Partikelzahl, Diffusionsgeschwindigkeit, Helligkeit der Partikel und Gesamthelligkeit in der Probe. Da zudem die Messzeiten für einzelne Proben im Sekundenbereich liegen, lassen sich dynamische Prozesse, wie zum Beispiel Proteinaggregation, gut über die Zeit verfolgen. Man kann mit dieser Technik beispielsweise beobachten, wie die Partikelzahl sinkt und die Einzelpartikel immer langsamer und heller, also größer werden (siehe 2.2.1). Man sieht den Proteinaggregaten beim Wachsen zu. Eine weitere Stärke der Messtechnik liegt in der Automatisierbarkeit der Versuche (192), was eine hohe Anzahl von Parallelproben pro Versuch erlaubt und auch bei stärkerer Streuung der Messwerte, die bei Proteinaggregationsuntersuchen Probleme bereiten kann, hilft, klare Ergebnisse zu erhalten. Ein weiterer Vorteil sind die äußerst geringen Proteinkonzentrationen, die für die Messungen notwendig sind. Besonders bei Untersuchungen mit physiologischen Metallionenkonzentrationen ist dies von

großem Wert, da man hochaffine Bindungspartner in adäquaten Mengenverhältnissen zueinander einsetzen kann (siehe auch 1.7).

Mit zwei-Farben-FCS lässt sich außerdem die Co-Aggregation verschiedenfarbig fluoreszenzmarkierter Proteinspezies, die Proteine enthalten, die biochemisch kaum unterscheidbar sind, elegant untersuchen (siehe 3.2.6 & (182)). Die Aggregatbildung im Oligomerbereich lässt sich gut mit der für kleine Aggregate besonders sensitiven Kreuzkorrelationsanalyse messen (siehe 2.2.5.2).

Durch die SIFT-Technik lassen sich besonders große Proteinaggregate in äußerst geringen Konzentrationen nachweisen, was von besonderem Wert für Aggregationsmessungen bei niedrigen SDS Konzentrationen ist, da sich unter diesen Bedingungen statt vieler kleiner wenige sehr große Aggregate bilden (177) (siehe 1.7).

4.3 Rolle von Metallionen in der PrP- Aggregation und Konversion

4.3.1 Rolle von Kupfer in der PrP- Aggregation und Konversion

Wie in der Einleitung ausführlich dargestellt, ist das PrP^C ein Glykoprotein, das mit einem mit GPI-Anker auf der Zellmembran befestigt ist. Die Funktion des Prionproteins ist bisher im Wesentlichen unklar. Allerdings ist gut dokumentiert, dass der N-terminale Teil des Prionproteins Kupfer spezifische Bindestellen für Metallionen enthält. Auch gibt es Indizien, die nahe legen, dass PrP^C eine Rolle im Kupferstoffwechsel spielt (128-130;213). Veränderungen der Konzentrationen von Kupfer und Mangan sowie Zink wurden in mit Prionen infiziertem Hirngewebe gefunden (160;214;215), und es wurde gezeigt, dass Veränderungen des Kupferspiegels einen Einfluss auf die Inkubationszeit in experimentell mit Prionen infizierten Versuchstieren hat (162;163).

Folglich ist anzunehmen, dass Kupfer und andere Metallionen eine relevante Rolle in der Pathogenese von Prionkrankheiten spielen. Besonders Veränderungen der Besetzung der Metallbindestellen des PrP^C könnten direkten Einfluss auf die strukturelle Veränderung und Aggregation von Prionprotein haben, die im Verlauf von Prionkrankheiten auftreten.

Anhand von Aggregationsuntersuchungen war es in der vorliegenden Arbeit möglich zu zeigen, dass Cu^{2+} und Mn^{2+} in der Lage sind die Aggregation von PrP spezifisch in verschiedene Richtungen zu verändern. Kupfer hemmt die Aggregation von PrP schon bei nanomolaren Konzentrationen, während Mangan die Aggregation von PrP verstärkt. Für andere Metallionen wie Zink, Nickel und Kobalt waren keine spezifischen Effekte nachweisbar (siehe 3.2.1).

Die Kupferaffinität von PrP ist stark pH abhängig (216) und wird in der Literatur unterschiedlich angegeben. Während eine Arbeitsgruppe zeigte, dass die halbmaximale Sättigung von Kupferbindestellen des PrP bei $2\mu\text{M}$ liegt und die volle Sättigung bei ca. $5\mu\text{M}$ erreicht wird (217), eine andere Gruppe zeigte, dass sie zumindest im mikromolaren Bereich liegt (218), platzierten sie wieder andere sogar in den picomolaren Bereich (130). Die physiologische Kupferkonzentration im Gehirn liegt bei ca. $10\mu\text{M}$ und kann lokal auf bis zu $100\mu\text{M}$ ansteigen (219). Allerdings ist zu beachten, dass der weitaus größte Teil des Kupfers in fester Proteinbindung vorliegt, und nur ein äußerst kleiner Teil frei als Bindungspartner zur Verfügung steht. Trotzdem ist anzunehmen, dass die Interaktionen zwischen PrP und Kupfer unter physiologischen und pathologischen Bedingungen von Bedeutung sind.

Besonders die Versuche, in denen gezeigt werden konnte, in welchem Maße die Aggregation von Mangan durch Kupfer geblockt wird, verdeutlichen, dass die Wirkung von Kupfer schon bei einem 1:1 Verhältnis von Kupferbindestellen zu Kupfer mit einer Gesamtkonzentration von nur 25 nM Kupfer eintritt. Sie verstärkt sich bis zu einer Kupferkonzentration von insgesamt $1\mu\text{M}$. Danach ließ sich keine weiter verstärkte antiaggregative Wirkung von Kupfer mehr nachweisen. Eine funktionelle Interaktion von PrP und Kupfer scheint also unter bestimmten Bedingungen schon unterhalb des mikromolaren Bereichs stattzufinden (siehe 3.1.2).

Noch kontroverser als die Affinität der Kupferbindestellen des PrP werden die qualitativen Auswirkungen von Kupfer auf die Aggregation und Konversion des Prionproteins *in vivo* und *in vitro* diskutiert.

Durch die exakt kontrollierbaren Bedingungen sind *in vitro* Experimente besonders geeignet, um die komplexe Interaktion von Metallionen und PrP näher zu untersuchen. Die bisher publizierten Ergebnisse sind allerdings vielfältig und ergeben, was den Effekt von Cu^{2+} angeht, ein noch bruchstückhaftes Bild.

Meine Ergebnisse zeigen, dass Kupfer im SDS-Modell ein potenter Aggregationshemmer ist, der in der Lage ist in einem stöchiometrischen Verhältnis

von 1:30 zu Mangan dessen starke aggregationsfördernde Wirkung zu blocken (siehe 3.2.1).

Anhand von publizierten Daten, die mit anderen Versuchsansätzen gewonnen wurden, wird jedoch die Komplexität und scheinbare Widersprüchlichkeit der Kupferwirkung unter unterschiedlichen Bedingungen deutlich. So wurde berichtet, dass aus Mäusegehirn isoliertes PrP in einem Puffer mit Triton X und NP40 als Detergentien nach wenigen Stunden Inkubation mit Cu^{2+} unlösliche, abzentrifugierbare Aggregate bildet, die Proteinase-K resistent sind. Damit PrP durch Cu^{2+} PK resistent wird, muss unter den beschriebenen Bedingungen mindestens eines der Oktarepeats (siehe 1.4) im Prionprotein enthalten sein (165). In Epitopvergleichen mit verschiedenen Antikörpern zeigte sich, dass diese teilweise PK-resistente PrP-Form eine von PrP^{Sc} unterscheidbare Struktur hat (165).

Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass PrP, das Kupfer gebunden hat, in der CD Spektroskopie einen hohen Gehalt an α -Helices aufweist. Diese dem physiologischen PrP^{C} entsprechende Struktur, die sich in der CD Spektroskopie nicht wesentlich von PrP ohne Kupfer unterscheidet, konnten wir ebenfalls nachweisen (siehe 3.2.2). Nach einem drei Monate dauernden Alterungsprozess bei -20°C zeigte das PrP jedoch einen erhöhten β -Faltblattanteil und war teilweise PK-resistent (166). Spektroskopische Messungen, in denen zu einer wässrigen PrP-Lösung Cu^{2+} gegeben wurde, zeigten, dass PrP durch Kupfer strukturell stabilisiert wird (220). Diese Stabilisierung könnte ein Hinweis auf den Mechanismus der verminderten Aggregationsneigung des PrP, das Kupfer gebunden hat, sein.

Neuere Untersuchungen zeigen, dass Cu^{2+} in Experimenten, die Gadoliniumhydrochlorid zur Denaturierung von PrP verwenden, die Entstehung von amyloiden Fibrillen aus PrP verhindert. Dieser Effekt ist abhängig vom pH Wert, was ein Hinweis auf seine Spezifität ist, da die Cu^{2+} PrP Bindung pH abhängig verläuft (s.o.). Strukturuntersuchungen ergaben, dass dies auf eine Stabilisierung von PK-resistentem, nicht amyloidogenen α -PrP zurückzuführen ist (167). Zugabe von Cu^{2+} zu präformierten Amyloidfibrillen aus PrP hingegen erhöhte die PK-Resistenz dieser schon PK-resistenten Aggregate weiter. Strukturell führte Cu^{2+} zu einer inneren Verwindung und Aggregation der präformierten Fibrillen (167).

Aus diesen Ergebnissen wurde von der Arbeitsgruppe von Baskakov ein zweigleisiges Cu^{2+} -Wirkprofil entwickelt. In diesem stabilisiert Cu^{2+} PrP^{C} in einer teilweise PK-resistenten Form, in der wesentliche Bestandteile der physiologischen

Struktur des PrP, die α -Helices, erhalten bleiben. Bei fibrillärem PrP führt Cu^{2+} hingegen zu einer weiteren Verstärkung der PK-Resistenz, zu Stabilisierung der Fibrillenstruktur und zur Aggregation der Fibrillen (167).

Dieses Modell der Baskakov Gruppe, wie auch die Daten von Tsenkova et al. (s.o.), zeigt deutliche Parallelen zu den Ergebnissen meiner Aggregationsversuche. Danach stabilisiert Kupfer die Monomerform des PrP, was eine Aggregation verhindert. Die Daten zur PK Resistenz konnten im SDS System in dieser Form nicht reproduziert werden.

Die scheinbar widersprüchlichen Versuchsergebnisse der Kupferwirkungen sind im Einzelnen jedoch noch nicht erklärt. Wahrscheinlich ist, dass die Auswirkungen von Kupfer auf PrP stark von den Versuchsbedingungen abhängen.

Insgesamt wird deutlich, dass Kupfer auf verschiedene Konformere des PrP unterschiedliche Effekte auszuüben scheint. Das erklärt die Komplexität der Kupfer-PrP Interaktion und führt dazu, dass es vermutlich nicht möglich sein wird, von einer einzigen Kupferwirkung auf PrP zu sprechen. Der Einfluss von Kupfer auf PrP scheint wesentlich von der räumlichen Konformation des PrP und den Pufferbedingungen, bei denen die Experimente durchgeführt werden, abzuhängen. Die genaue Charakterisierung der Wirkungswege des Kupfers wird Gegenstand zukünftiger Arbeiten bleiben.

Mit dem SDS-Modell konnte jedoch gezeigt werden, dass physiologische Kupferkonzentrationen, wie sie im Gehirn vorkommen, die in adäquaten Mengenverhältnissen zu monomerem α -helikalem PrP in Gegenwart eines 10 mM Natriumphosphatpuffers mit dem pH 7,2 mit sehr niedrigen Detergenkonzentrationen eingesetzt werden, die Aggregation von PrP vermindern.

4.3.2 Rolle von Mangan in der PrP- Aggregation und Konversion

Neben den Wirkungen von Kupfer untersuchte ich detailliert die Effekte von Mangan auf PrP. Dieses besondere Interesse wurde durch den Befund, dass Mangan die Aggregation von PrP steigert, und dass diese gesteigerte Aggregation durch Kupfer inhibierbar ist, geweckt (siehe 3.1.2).

Bei näherer Untersuchung der manganinduzierten PrP-Aggregate zeigte sich, dass sie durch SDS vollständig auflösbar sind, durch EDTA-Zusatz jedoch nur auf das

Aggregationsniveau einer PrP-Aggregation, die ohne Mangan abläuft, absinkt (siehe 3.2.1 und 3.2.5). Dies führte zu der These, dass Mangan nicht die Aggregation selbst verstärkt, sondern präformierte PrP Oligomere zu größeren Aggregaten zusammenfügt. Durch die in 3.2.6 gezeigten Experimente, in denen unterschiedlich fluoreszenzmarkierte PrP Aggregate durch Mangan verbunden wurden, gelang es diese Hypothese zu bestätigen. Diese Experimente sind ein gutes Beispiel für die Stärke der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie, die sie erlaubt zwei Gruppen von Aggregaten anhand der Fluoreszenzmarkierung getrennt voneinander zu analysieren. Untersuchungen mit CD Spektroskopie belegten zudem, dass Mangan keine Veränderungen der Sekundärstruktur von PrP verursacht.

Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Wirkungen von Kupfer und Mangan auf das Aggregationsverhalten von PrP ist, dass die Wirkungen von verschiedenen Interaktionspunkten auf dem Prionprotein ausgehen. In Aggregationsversuchen, in denen zuvor die histidinabhängigen Kupferbindestellen mit DEPC funktionsunfähig gemacht wurden, zeigte sich, dass Kupfer unter diesen Umständen seine antiaggregative Wirkung einbüßt, Mangan seine proaggregative Wirkung jedoch bewahrt. Dies kann als Hinweis auf die Existenz einer bisher nicht beschriebenen separaten Manganbindestelle des Prionproteins gewertet werden, da die funktionsfähigen Kupferbindestellen für den Manganeffekt nicht notwendig sind.

Meine Experimente modifizieren und erweitern das bisherige Konzept der Kupfer- und Manganwirkungen (168), in dem vielfach von einer funktionellen Austauschbarkeit von Kupfer und Mangan am Prionprotein ausgegangen wurde (221). Die anhand von spektroskopischen Messungen geäußerte Vermutung über die Existenz einer Manganbindestelle des PrP konnte bekräftigt werden (220).

4.3.3 Modell zur kombinierten Wirkung von Kupfer und Mangan

Auf der Basis meiner Ergebnisse für Kupfer und Mangan lässt sich folgendes Modell der Metallionen-abhängigen PrP-Aggregation aufstellen (siehe Abb. 4.1): Die physiologische, nicht aggregierte Form von PrP besteht aus einer strukturierten, hauptsächlich α -helikalen C-terminalen Domäne und einem flexiblen N-terminalen Ende, das mehrere Kupferbindestellen enthält. Unter bestimmten Bedingungen, zum Beispiel bei niedrigen SDS Konzentrationen, kann der C-Terminus alternative

Konformationen annehmen, die einen hohen Anteil an β -Faltblatt Strukturen enthalten. Diese Konformationsänderung geht mit der Bildung von Oligomeren einher. Zugabe von Mangan verursacht durch eine metallionenvermittelte intermolekulare Assoziation zwischen diesen Oligomeren die Bildung größerer Aggregate. Die Bindung von Kupfer sorgt an der N-terminalen Domäne dafür, dass diese weniger flexibel wird. Das erlaubt zwar weiterhin die Konformationsänderung im C-Terminus

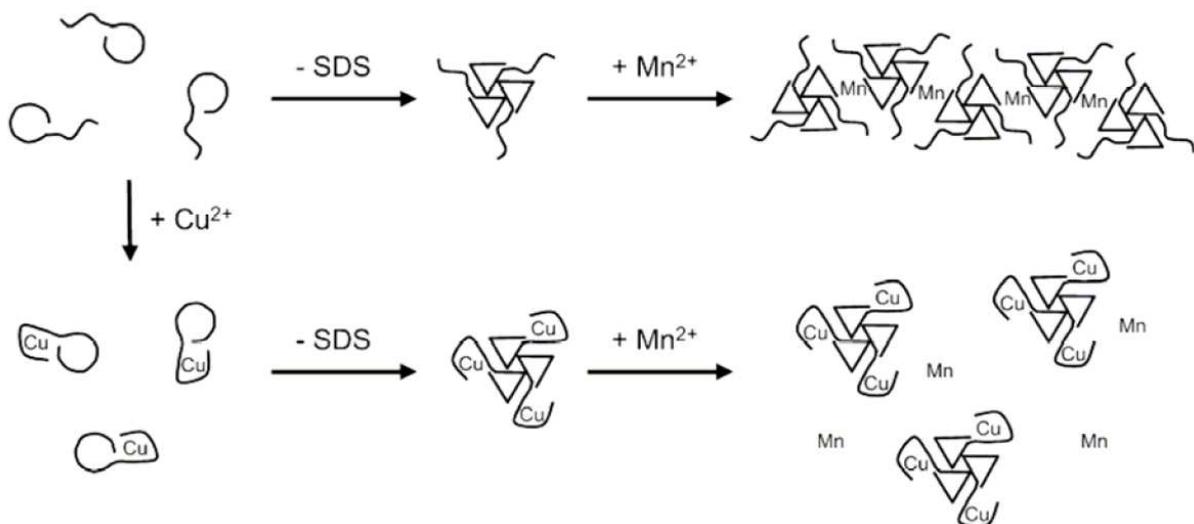


Abb. 4.1: Hypothetisches Modell der Auswirkungen von Kupfer und Mangan auf die PrP-Aggregation.

und die Bildung von Oligomeren, aber die manganvermittelte Anordnung zu größeren Aggregaten wird durch sterische Effekte verhindert. Daher kann Mangan die in Anwesenheit von Kupfer gebildeten Oligomere nicht zu größeren Aggregaten verbinden. Die schematische Zeichnung in Abb. 4.1 berücksichtigt die exakte Stöchiometrie der Metallionenbindung und Oligomerbildung nicht.

4.4 Bedeutung meiner Ergebnisse für die Auswirkungen von Metallionen auf Proteinaseresistenz von PrP und Prionkrankheiten *in vivo*

Neben vielfältigen *in vitro* Daten über die Rolle von Kupfer und Mangan in der PrP-Aggregation und Konversion, gibt es deutliche Hinweise auf deren Bedeutung *in vivo*. So wurde berichtet, dass die Konzentration von Kupfer in Gehirnen von an

Prionkrankheiten verstorbener Patienten verringert, während die Konzentration von Mangan erhöht ist (160).

Wie im Falle der *in vitro* Bedeutung von Kupfer und Mangan gibt es auch über den Effekt von Kupfer in Zellkultur und im Tierversuch verschiedenartige Berichte. In Zellkultur und im Tierexperiment wurde gezeigt, dass Kupfer die Entstehung von PrP^{Sc} hemmt und den Krankheitsausbruch bei prioninfizierten Hamstern verzögert (162). Auch bisher unveröffentlichte Daten aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der LMU München zeigen, dass die Zufütterung von Kupfer die Inkubationszeit infizierter Mäuse verlängert (G. Mitteregger, persönliche Mitteilung).

Der Krankheitsausbruch bei scrapieinfizierten Mäusen konnte jedoch auch durch die Gabe des Kupferchelators D-Penicillamin, der die frei verfügbaren und damit biologisch aktiven Kupferionen bindet, herausgezögert werden (163).

Zusammengefasst wird in der Arbeit von Hijazi et al. und in den Daten aus dem ZNP der LMU München gezeigt, dass die Zufütterung von Kupfer die Krankheit verzögert, während die Daten von Sigurdsson et al. zeigen, dass die Krankheit nach Eliminierung von Kupfer später ausbricht. Diese gegensätzlichen Resultate lassen spekulieren, ob durch die Behandlung mit D-Penicillamin, wirklich spezifisch nur Kupfer chelatiert wird. Vielmehr könnte man die Behandlung als einen generellen Eingriff in den Stoffwechsel zweiwertiger Metallionen betrachten, was dann generell die Bedeutung von Metallionen für den Krankheitsprozess zeigt.

Die in 3.1.1 gezeigten Daten zur *de novo* Aggregation in Gegenwart von EDTA, wie D-Penicillamin ein Chelator, unterstützen die Hypothese, dass schon kleinste Metallionenkonzentrationen eine Bedeutung für die Prionproteinaggregation haben. Wie in 3.1.1 zu sehen, war in Gegenwart von EDTA eine Verminderung der Aggregation von rPrP zu kleinen Oligomeren bei mittleren SDS Konzentrationen zu beobachten. Dies legt nahe, dass auch minimale Metallionenkonzentrationen, die in Spuren in den verwendeten Pufferlösungen vorkommen, besonders für den Beginn der Aggregation, die Bildung von Oligomeren von Bedeutung sind.

Um mit einem *in vitro* Modell den *in vivo* Verhältnissen noch näher als bisher zu kommen, untersuchte ich, wie in 3.3.1 und 3.3.2 gezeigt, die Anlagerung von rPrP an *Prion-Rods*, die aus den Gehirnen von an CJD verstorbenen Patienten gewonnen wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich das von uns verwendete fluoreszenzmarkierte rPrP erstens an *Prion-Rods* anlagert, und diese Anlagerung zweitens konzentrationsabhängig durch Kupfer inhibierbar ist. Diese Ergebnisse sind

als Brückenschlag zwischen der durch Kupfer verursachten Aggregationshemmung der *in vitro* Aggregation von rekombinantem PrP und den Tier- und Zellkulturversuchen, in denen Kupfer die Prionpropagation hemmt, interpretierbar (s.o.). Sie stützen die Hypothese, dass Kupfer verlangsamen auf den Krankheitsprozess wirkt, da es das PrP^C strukturell stabilisiert und so die PrP^C-PrP^{Sc} Interaktion hemmt (167). Mangan zeigte keinen eindeutigen Effekt auf die Anlagerung von rPrP an *Prion-Rods*. Diese Untersuchungen sind, wie schon im Ergebnisteil erwähnt, noch nicht vollständig abgeschlossen, sondern bilden die Grundlage für laufende Experimente am ZNP der LMU München.

Schon das Ergebnis, dass humanes monomeres rPrP mit präformierten humanen Prionen als „Seeds“ größere Aggregate bildet, hat allerdings an sich Bedeutung für das Verständnis von Prionogenese und –propagation. Die in 1.5 näher beschriebene *Seeded Aggregation* Hypothese nach Lansbury fordert, dass die Prionpropagation geschieht, indem sich monomeres PrP an präformierte Aggregate anlagert. Diese Hypothese lässt sich mit meinen Ergebnissen unterstützen.

Des Weiteren konnten ich in *de novo* Aggregationsuntersuchungen zeigen, dass für den Weg der Aggregation vom Monomer zum großen Aggregat im SDS-System offensichtlich ähnliches gilt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aggregation vorgebildeter PrP-Oligomere weniger stark ist, als die Aggregation bei Aggregationsbeginn mit monomerem PrP (siehe 3.1.2). Bestehende Oligomere lassen sich also weniger gut zu großen Aggregaten verknüpfen als die Grundbausteine, die Monomere.

Insgesamt scheint die Aggregation des Prionproteins ein komplexer Prozess mit mehreren Zwischenstufen und Alternativwegen zu sein. Einige der dabei entstehenden Aggregationsintermediate scheinen besondere Bedeutung auf dem Weg zur Entstehung pathophysiologisch relevanter Aggregate, Proteaseresistenz und Infektiosität zu haben (83;85;86;199;222).

5. Zusammenfassung

Prionerkrankungen sind durch die Umfaltung des normalen Prionproteins, PrP^C, in ein pathogenes, infektiöses Isomer, PrP^{Sc}, charakterisiert. Die genauen Umstände unter denen es zu dieser Strukturveränderung kommt, sind im Detail nicht bekannt und Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. Eine besondere Bedeutung für den Umfaltungsprozess und die Pathophysiologie der Erkrankung scheint die Aggregation von Prionprotein zu haben.

Das Prionprotein besitzt eine Kupfer-bindende N-terminale Domäne. Veränderungen der Metallionenbelegung des PrP können zu Konformationsänderungen des Proteins führen und es existieren tierexperimentelle Hinweise, dass die Effizienz der Prionvermehrung vom cerebralen Kupferspiegel beeinflusst wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte daher der Effekt von Kupferionen und anderen Metallionen auf die Aggregation und Strukturumwandlung des Prionproteins auf molekularer Ebene näher charakterisiert werden.

In dieser Arbeit wurde aufbauend auf einem von der Arbeitsgruppe Riesner in Düsseldorf entwickelten SDS-abhängigen Aggregationssystem ein experimentelles Modellsystem der Aggregation von humanem Volllängen-PrP in physiologischen Pufferbedingungen entwickelt. Dieses Modell führt die Aggregation von PrP durch schrittweises Verdünnen aus 0.2% SDS herbei. Dabei kommt es zu Umfaltung des PrP von seiner α -helikalen Form in eine β -Faltblatt Form und zur Aggregatbildung. Die erstmalige Verwendung von PrP voller Länge, d.h. einschließlich der N-terminalen Kupfer-bindenden Domäne, ermöglichte die detaillierte Untersuchung des Effektes verschiedener zweiwertiger Metallionen, wie z.B. Kupfer und Mangan, auf die Aggregation und Umfaltung von PrP. Darüber hinaus wurde der Effekt dieser Ionen auf die Anlagerung von PrP an aufgereinigte humane Prionen und der Einfluss des Methionin-Valin-Polymorphismus an Kodon 129 des humanen PrP auf die Aggregation untersucht.

Zur Detektion, Quantifizierung und Charakterisierung von PrP Oligomeren und Multimeren wurden einzelmolekülbasierte konfokale fluoreszenzspektroskopische Verfahren der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungsanalyse, Kreuzkorrelationsanalyse und SIFT (*Scanning for Intensely Fluorescent Targets*) eingesetzt. Die mit der Aggregation einhergehende Konformationsänderung wurde mit CD-Spektroskopie analysiert, zum Nachweis

amyloider Aggregate wurden Untersuchungen mittels Thioflavin T Fluoreszenz durchgeführt. Eine potentielle Proteinase K-Resistenz der erzeugten PrP-Aggregate wurde mittels Western-Blot-Analysen untersucht.

Zunächst wurde der Einfluss des Methionin-Valin-Polymorphismus an Aminosäure 129 des humanen Prionproteins auf die *de novo* Aggregation untersucht. Hierbei konnte insbesondere die simultane fluoreszenzspektroskopische Analyse zweier spektral unterscheidbarer Fluoreszenzmarkierungen genutzt werden, um die direkte molekulare Interaktion verschiedener Molekülvarianten im Aggregationsprozess zu charakterisieren. Dabei zeigte sich, dass dieser Polymorphismus vor allem Aggregationsprozesse im Rahmen der Bildung kleiner Oligomere beeinflusst.

In Untersuchungen mit Kupfer, Mangan, Nickel, Zink und Kobalt konnte gezeigt werden, dass spezifisch Kupfer die *de novo* Aggregation von Prionprotein schon in submikromolarer Konzentration hemmt. Auch die Anlagerung von PrP an aufgereinigte humane Prionen wurde durch Kupfer gehemmt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Kupfer auf molekularer Ebene einen direkten hemmenden Einfluss auf die Prionpropagation ausüben könnte, und korrelieren gut mit tierexperimentellen Daten, die zeigen, dass kupferreiche Ernährung die Überlebenszeit von prioninfizierten Mäusen verlängert.

Für Manganionen konnte bei mikromolaren Konzentrationen eine deutlich verstärkte Aggregation des Prionproteins beobachtet werden, die durch gleichzeitige Anwesenheit von Kupferionen inhibierbar war. Auch war der Effekt von Mangan durch konsekutive Zugabe von Metallionenchelatoren reversibel. In detaillierten Untersuchungen des Aggregationsprozesses auf Einzelpartikelebene konnte gezeigt werden, dass die Aggregationssteigerung durch Mangan auf einer Verknüpfung kleinerer vorbestehender Oligomere beruht und unabhängig von den Histidin-abhängigen Kupferbindestellen des PrP ist. Diese Ergebnisse belegen die Existenz einer bisher noch nicht beschriebenen Mangan-Bindestelle im Prionprotein.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AR	Axis Ratio
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CPP	(= counts per particle) mittlere Helligkeit der Partikel
Cu/Zn-SOD	Kupfer abhängige Superoxid-Dismutase
CWD	chronic wasting disease
DNA	Desoxyribonucleinsäure
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
FIDA	Flourescence Intensity Distribution Analysis
FSE	feline spongiforme encephalopathy
GdnHCl	Guanidiniumhydrochlorid
GPI	Glykosylphosphatinositol
I_{tot}	Gesamtintensität der Probe (FCS)
kDa	Kilo Dalton
M	molar
N	Partikelzahl
PK	Proteinase K
Prion	Proteinaceus infectious agent
Prnp ^{0/0} -Mäuse	Mäuse, denen beide Allele des PrP Gens entfernt wurden.
PrP	Prionprotein
PrP27-30	27-30 kDa großes PrP Fragment, das durch PK Verdau aus PrP ^{Sc} entsteht
PrP ^C	Zelluläres Prionprotein
PrP ^{res}	Proteinase K resistentes PrP
PrP ^{Sc}	krankheitsassoziiertes Prionprotein
rPrP	rekombinantes PrP
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIFT	Scanning for intensely Flourescent Targets
Tab.	Tabelle
ThT	Thioflavin T
TME	transmissible mink encephalopathy

TSE	Transmissible spongiforme Enzephalopathien
Ttrip	Triplet Zeit
τ_{Diff}	mittlere Diffusionszeit der Partikel in der FCS
vCJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
WB	Western-Blot
ZNS	Zentralnervensystem
α -PrP	PrP, dessen Sekundärstruktur überwiegend aus α -Helices besteht
β -PrP	PrP, dessen Sekundärstruktur überwiegend aus β -Faltblatt besteht
%trip	Prozentualer Anteil der Triplet Fraktion
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
LMU	Ludwig Maximilians Universität (München)
DOSPA	2,3-Dioleoyloxy- <i>N</i> -[2 (Sperminocarboxamido) Ethyl]- <i>N,N</i> -Dimethyl-1-Propanaminium Trifluorazetat
IPGT	Isopropyl β -D-1-Thiogalaktopyranosid

7. Abbildungsverzeichnis

Nr.:	Titel	Seite
1.1	Die kodierende Region des humanen PrP Gens	12
1.2	Die räumliche Struktur von PrP ^C mit seinen fünf Kupferbindestellen	13
1.3	Das Heterodimer Modell	15
1.4	Das „Seeded Aggregation Model“ nach Lansbury	16
2.1	Messaufbau eines zwei Farben FCS-Readers	30
2.2	Typische Autokorrelationsfunktion einer FCS Messung	33
2.3	Typische Kreuzkorrelationsfunktion	36
2.4	Typische FIDA Kurve einer Messung mit Beams Scanner	37
2.5	Intensitätshistogramm einer 2D-FIDA Auswertung	39
3.1	Zeit- und SDS- abhängige Aggregation von Vollängen PrP.	50
3.2	Aggregationsvergleich PrP Oligomere und <i>de novo</i> Aggregation.	52
3.3	Koaggregation verschiedener Varianten von humanem rPrP an Codon 129.	54
3.4	Der aggregationsfördernde Effekt von Mangan.	55
3.5	Der aggregationshemmende Effekt von Kupfer.	56
3.6	Der Effekt verschiedener Metallionen auf die Aggregation von Vollängen-PrP.	57
3.7	Der Einfluss von Metallionen auf die β -Faltblatt Bildung von PrP.	59
3.8	Die Amyloidstruktur von rPrP Aggregaten.	61
3.9	Proteinase Stabilität der rPrP Aggregate aus dem SDS System.	62
3.10	Einfluss von Kupfer und EDTA auf in Gegenwart von Mangan gebildete PrP Aggregate.	63
3.11	Die Stabilität der PrP Aggregate.	64
3.12	Mangan induziert die Entstehung von größeren Aggregaten aus PrP Oligomeren.	66
3.13	Der Effekt von Mangan auf die Architektur von PrP Aggregaten.	68
3.14	DEPC hemmt die Fähigkeit von Kupfer, den aggregationsfördernden Effekt von Mangan zu blocken.	70
3.15	Anlagerung von rPrP an Prion Rods & Blockade dieser Anlagerung	71
		88

	durch DOSPA.	
3.16	Cu ²⁺ hemmt dosisabhängig die Anlagerung von rPrP an humane Prion-Rods.	72
4.1	Hypothetisches Modell der Auswirkungen von Kupfer und Mangan auf die PrP-Aggregation.	81

8. Tabellenverzeichnis

Nr.:	Titel	Seite
2.1	Chemikalien	23
2.2	Materialien	24
2.3	Fluoreszenzfarbstoffe	25
2.4	Biologische Materialien	25
2.5	Puffer für die rPrP Markierungsreaktion	26
2.6	Puffer für die rPrP <i>in vitro</i> Konversion, FCS- und CD-Messungen	26
2.7	Lösungen und Puffer zur Western Blot-Analyse	26
2.8	Prion Protein	26
2.9	Qualitätskontrolle der PrP Färbereaktion	43
2.10	Bestimmung der Markierungsrate des PrP ^{mark}	44

9. Literaturverzeichnis

- (1) Millhauser GL. Copper binding in the prion protein. *Acc Chem Res* 2004; 37(2):79-85.
- (2) Alva G, Potkin SG. Alzheimer disease and other dementias. *Clin Geriatr Med* 2003; 19(4):763-776.
- (3) Hoffmann E, Menning S. A century of population aging in Germany. *Sci Aging Knowledge Environ* 2004; 2004(37):e35.
- (4) Aguzzi A, Haass C. Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease. *Science* 2003; 302(5646):814-818.
- (5) Caughey B, Lansbury PT. Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu Rev Neurosci* 2003; 26:267-298.
- (6) Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297(5580):353-356.
- (7) Koo EH, Lansbury PT, Jr., Kelly JW. Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(18):9989-9990.
- (8) Muchowski PJ. Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones? *Neuron* 2002; 35(1):9-12.
- (9) Ross CA, Poirier MA. Opinion: What is the role of protein aggregation in neurodegeneration? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005.
- (10) Small DH, Mok SS, Bornstein JC. Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(8):595-598.
- (11) Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2003; 4(1):49-60.
- (12) Giese A, Kretzschmar HA. Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr Top Microbiol Immunol* 2001; 253:203-217.
- (13) Kretzschmar HA. Human prion diseases (spongiform encephalopathies). *Arch Virol Suppl* 1993; 7:261-293.
- (14) Prusiner SB. Genetic and infectious prion diseases. *Arch Neurol* 1993; 50(11):1129-1153.
- (15) Prusiner SB. The prion diseases. *Brain Pathol* 1998; 8(3):499-513.

- (16) Rabinovici GD, Wang PN, Levin J, Cook L, Pravdin M, Davis J et al. First symptom in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 2006; 66(2):286-287.
- (17) Cuillé J, Chelle P-L. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C R Acad Sci (III)* 1936; 203:1552-1554.
- (18) Sigurdson CJ, Miller MW. Other animal prion diseases. *Br Med Bull* 2003; 66:199-212.
- (19) Prusiner SB, Scott MR, DeArmond SJ, Cohen FE. Prion protein biology. *Cell* 1998; 93(3):337-348.
- (20) Creutzfeldt HG. Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol Psychiatr* 1920; 57:1-18.
- (21) Jakob A. Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z Ges Neurol Psychiatr* 1921; 64:147-228.
- (22) Kretzschmar HA, Ironside JW, DeArmond SJ, Tateishi J. Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 1996; 53(9):913-920.
- (23) Will RG, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Mitrova E et al. Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in six European countries, 1993-1995. EU Collaborative Study Group for CJD. *Ann Neurol* 1998; 43(6):763-767.
- (24) Brown P, Gibbs CJ, Jr., Rodgers-Johnson P, Asher DM, Sulima MP, Bacote A et al. Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann Neurol* 1994; 35(5):513-529.
- (25) Ladogana A, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Jarius C, Collins S et al. Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology* 2005; 64(9):1586-1591.
- (26) UK Department of Health. UK Department of Health: CJD: Monthly Statistics. Website: UK Department of Health . 2006. 30-10-0005.
Ref Type: Electronic Citation
- (27) Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD et al. Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature* 1989; 338(6213):342-345.
- (28) Kretzschmar HA, Honold G, Seitelberger F, Feucht M, Wessely P, Mehraein P et al. Prion protein mutation in family first reported by Gerstmann, Straussler, and Scheinker. *Lancet* 1991; 337(8750):1160.
- (29) Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A et al. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 1986; 315(16):997-1003.

- (30) Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY et al. Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med* 1992; 326(7):444-449.
- (31) Windl O, Dempster M, Estibeiro JP, Lathe R, de Silva R, Esmonde T et al. Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. *Hum Genet* 1996; 98(3):259-264.
- (32) Kovacs GG, Puopolo M, Ladogana A, Pocchiari M, Budka H, van Duijn C et al. Genetic prion disease: the EUROCCJD experience. *Hum Genet* 2005;1-9.
- (33) Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 1966; 209(25):794-796.
- (34) Gajdusek DC. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 1977; 197(4307):943-960.
- (35) Chazot G, Broussolle E, Lapras C, Blattler T, Aguzzi A, Kopp N. New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. *Lancet* 1996; 347(9009):1181.
- (36) Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 1996; 347(9006):921-925.
- (37) Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A et al. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 1997; 389(6650):498-501.
- (38) Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 1996; 383(6602):685-690.
- (39) Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Lamoury F, Dormont D et al. BSE transmission to macaques. *Nature* 1996; 381(6585):743-744.
- (40) Brown P, Preece MA, Will RG. "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1992; 340(8810):24-27.
- (41) Hamada C, Sadaike T, Fukushima M. Projection of creutzfeldt-jakob disease frequency based on cadaveric dura transplantation in Japan. *Neuroepidemiology* 2003; 22(1):57-64.
- (42) Hammersmith KM, Cohen EJ, Rapuano CJ, Laibson PR. Creutzfeldt-Jakob disease following corneal transplantation. *Cornea* 2004; 23(4):406-408.
- (43) Llewelyn CA, Hewitt PE, Knight RS, Amar K, Cousens S, Mackenzie J et al. Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 2004; 363(9407):417-421.

- (44) Peden AH, Head MW, Ritchie DL, Bell JE, Ironside JW. Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 2004; 364(9433):527-529.
- (45) Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM et al. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 1968; 161(839):388-389.
- (46) Tateishi J, Brown P, Kitamoto T, Hoque ZM, Roos R, Wollman R et al. First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* 1995; 376(6539):434-435.
- (47) Tateishi J, Kitamoto T. Inherited prion diseases and transmission to rodents. *Brain Pathol* 1995; 5(1):53-59.
- (48) Brown P, Gibbs CJ, Jr., Amyx HL, Kingsbury DT, Rohwer RG, Sulima MP et al. Chemical disinfection of Creutzfeldt-Jakob disease virus. *N Engl J Med* 1982; 306(21):1279-1282.
- (49) Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216(4542):136-144.
- (50) Alper T, Haig DA, Clarke MC. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun* 1966; 22(3):278-284.
- (51) Alper T. The scrapie enigma: insights from radiation experiments. *Radiat Res* 1993; 135(3):283-292.
- (52) Kellings K, Meyer N, Miranda C, Prusiner SB, Riesner D. Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J Gen Virol* 1992; 73 (Pt 4):1025-1029.
- (53) Kellings K, Meyer N, Miranda C, Prusiner SB, Riesner D. Analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations. *Arch Virol Suppl* 1993; 7:215-225.
- (54) Riesner D, Kellings K, Wiese U, Wulfert M, Miranda C, Prusiner SB. Prions and nucleic acids: search for "residual" nucleic acids and screening for mutations in the PrP-gene. *Dev Biol Stand* 1993; 80:173-181.
- (55) Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 1967; 214(90):764-766.
- (56) Griffith JS. Self-replication and scrapie. *Nature* 1967; 215(105):1043-1044.
- (57) Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 1982; 218(4579):1309-1311.
- (58) Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 1985; 40(4):735-746.

- (59) Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF et al. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 1983; 35(2 Pt 1):349-358.
- (60) Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 1984; 38(1):127-134.
- (61) Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D 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):10962-10966.
- (62) Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ, Jr. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J Biol Chem* 1993; 268(27):20276-20284.
- (63) Prusiner SB. Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(23):13363-13383.
- (64) Goldfarb LG, Brown P, McCombie WR, Goldgaber D, Swergold GD, Wills PR et al. Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88(23):10926-10930.
- (65) Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M et al. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 1993; 73(7):1339-1347.
- (66) Sailer A, Bueler H, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C. No propagation of prions in mice devoid of PrP. *Cell* 1994; 77(7):967-968.
- (67) Brown DR, Herms J, Kretzschmar HA. Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *Neuroreport* 1994; 5(16):2057-2060.
- (68) Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA. Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 1996; 380(6572):345-347.
- (69) 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):449-457.
- (70) Bueler H, Raeber A, Sailer A, Fischer M, Aguzzi A, Weissmann C. High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med* 1994; 1(1):19-30.
- (71) Fischer M, Rulicke T, Raeber A, Sailer A, Moser M, Oesch B et al. Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J* 1996; 15(6):1255-1264.
- (72) Brandner S, Isenmann S, Raeber A, Fischer M, Sailer A, Kobayashi Y et al. Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 1996; 379(6563):339-343.

- (73) Moore RC, Hope J, McBride PA, McConnell I, Selfridge J, Melton DW et al. Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nat Genet* 1998; 18(2):118-125.
- (74) Weissmann C. Spongiform encephalopathies. The prion's progress. *Nature* 1991; 349(6310):569-571.
- (75) Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR et al. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 1994; 370(6487):295-297.
- (76) Kretzschmar HA, Giese A, Brown DR, Herms J, Keller B, Schmidt B et al. Cell death in prion disease. *J Neural Transm Suppl* 1997; 50:191-210.
- (77) Muller WE, Ushijima H, Schroder HC, Forrest JM, Schatton WF, Rytik PG et al. Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists on prion protein (PrionSc)-induced toxicity in rat cortical cell cultures. *Eur J Pharmacol* 1993; 246(3):261-267.
- (78) Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, Bugiani O et al. Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 1993; 362(6420):543-546.
- (79) Herms JW, Madlung A, Brown DR, Kretzschmar HA. Increase of intracellular free Ca²⁺ in microglia activated by prion protein fragment. *Glia* 1997; 21(2):253-257.
- (80) Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* 2003; 425(6959):717-720.
- (81) Lucassen R, Nishina K, Supattapone S. In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl groups. *Biochemistry* 2003; 42(14):4127-4135.
- (82) Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 2001; 411(6839):810-813.
- (83) Bieschke J, Weber P, Sarafoff N, Beekes M, Giese A, Kretzschmar H. Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(33):12207-12211.
- (84) Castilla J, Saa P, Hetz C, Soto C. In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 2005; 121(2):195-206.
- (85) Weber P, Giese A, Piening N, Mitteregger G, Thomzig A, Beekes M et al. Cell-free formation of misfolded prion protein with authentic prion infectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(43):15818-15823.
- (86) Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ et al. Synthetic mammalian prions. *Science* 2004; 305(5684):673-676.

- (87) Legname G, Nguyen HO, Baskakov IV, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(6):2168-2173.
- (88) Bruce ME. Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull* 1993; 49(4):822-838.
- (89) Bessen RA, Marsh RF. Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 1994; 68(12):7859-7868.
- (90) Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, Caughey B. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 1995; 375(6533):698-700.
- (91) Fraser H, Dickinson AG. Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol* 1973; 83(1):29-40.
- (92) Fraser H. Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals. *Br Med Bull* 1993; 49(4):792-809.
- (93) Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J. Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 1991; 352(6333):340-342.
- (94) Cervenakova L, Goldfarb LG, Garruto R, Lee HS, Gajdusek DC, Brown P. Phenotype-genotype studies in kuru: implications for new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(22):13239-13241.
- (95) Collinge J, Palmer MS, Dryden AJ. Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1991; 337(8755):1441-1442.
- (96) Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG et al. Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 1996; 39(6):767-778.
- (97) Parchi P, Capellari S, Chen SG, Petersen RB, Gambetti P, Kopp N et al. Typing prion isoforms. *Nature* 1997; 386(6622):232-234.
- (98) Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O et al. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 1999; 46(2):224-233.
- (99) Hill AF, Joiner S, Wadsworth JD, Sidle KC, Bell JE, Budka H et al. Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 2003; 126(Pt 6):1333-1346.
- (100) Kascsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Carp RI, Robakis NK, Wisniewski HM et al. Immunological comparison of scrapie-associated fibrils isolated from animals infected with four different scrapie strains. *J Virol* 1986; 59(3):676-683.

- (101) Somerville RA, Chong A, Mulqueen OU, Birkett CR, Wood SC, Hope J. Biochemical typing of scrapie strains. *Nature* 1997; 386(6625):564.
- (102) Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M et al. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 1998; 4(10):1157-1165.
- (103) Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF et al. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 1986; 46(3):417-428.
- (104) Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 1985; 315(6017):331-333.
- (105) Krakauer DC, Zanotto PM, Pagel M. Prion's progress: patterns and rates of molecular evolution in relation to spongiform disease. *J Mol Evol* 1998; 47(2):133-145.
- (106) Schatzl HM, Da Costa M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* 1995; 245(4):362-374.
- (107) Bendheim PE, Brown HR, Rudelli RD, Scala LJ, Goller NL, Wen GY et al. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 1992; 42(1):149-156.
- (108) Cashman NR, Loertscher R, Nalbantoglu J, Shaw I, Kascsak RJ, Bolton DC et al. Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 1990; 61(1):185-192.
- (109) Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* 1986; 122(1):1-5.
- (110) 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):117-122.
- (111) Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 1995; 14(3):509-517.
- (112) Gabriel JM, Oesch B, Kretzschmar H, Scott M, Prusiner SB. Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(19):9097-9101.
- (113) 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):7664-7668.
- (114) Strumbo B, Ronchi S, Bolis LC, Simonic T. Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett* 2001; 508(2):170-174.
- (115) Oidtmann B, Simon D, Holtkamp N, Hoffmann R, Baier M. Identification of cDNAs from Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) and Atlantic salmon (*Salmo*

- salar) coding for homologues to tetrapod prion proteins. FEBS Lett 2003; 538(1-3):96-100.
- (116) Premzl M, Sangiorgio L, Strumbo B, Marshall Graves JA, Simonic T, Gready JE. Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. Gene 2003; 314:89-102.
- (117) Wickner RB, Taylor KL, Edskes HK, Maddelein ML, Moriyama H, Roberts BT. Prions in *Saccharomyces* and *Podospora* spp.: protein-based inheritance. Microbiol Mol Biol Rev 1999; 63(4):844-61, table.
- (118) Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, DeArmond SJ. Molecular cloning of a human prion protein cDNA. DNA 1986; 5(4):315-324.
- (119) Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L. Genomic structure of the human prion protein gene. Am J Hum Genet 1991; 49(2):320-329.
- (120) Baldwin MA, Stahl N, Reinders LG, Gibson BW, Prusiner SB, Burlingame AL. Permethylated and tandem mass spectrometry of oligosaccharides having free hexosamine: analysis of the glycoinositol phospholipid anchor glycan from the scrapie prion protein. Anal Biochem 1990; 191(1):174-182.
- (121) 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):18217-18223.
- (122) Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. Cell 1987; 51(2):229-240.
- (123) Stahl N, Borchelt DR, Prusiner SB. Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. Biochemistry 1990; 29(22):5405-5412.
- (124) Endo T, Groth D, Prusiner SB, Kobata A. Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. Biochemistry 1989; 28(21):8380-8388.
- (125) 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):180-182.
- (126) Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez GF et al. NMR solution structure of the human prion protein. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97(1):145-150.
- (127) Donne DG, Viles JH, Groth D, Mehlhorn I, James TL, Cohen FE et al. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. Proc Natl Acad Sci U S A 1997; 94(25):13452-13457.
- (128) Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R et al. The cellular prion protein binds copper in vivo. Nature 1997; 390(6661):684-687.

- (129) 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* 1995; 214(3):993-999.
- (130) Jackson GS, Murray I, Hosszu LL, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR et al. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(15):8531-8535.
- (131) Stockel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB. Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* 1998; 37(20):7185-7193.
- (132) Pushie MJ, Rauk A. Computational studies of Cu(II)[peptide] binding motifs: Cu[HGGG] and Cu[HG] as models for Cu(II) binding to the prion protein octarepeat region. *J Biol Inorg Chem* 2003; 8(1-2):53-65.
- (133) Burns CS, Aronoff-Spencer E, Legname G, Prusiner SB, Antholine WE, Gerfen GJ et al. Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry* 2003; 42(22):6794-6803.
- (134) Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL et al. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 1993; 32(8):1991-2002.
- (135) Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Molecular characteristics of the major scrapie prion protein. *Biochemistry* 1984; 23(25):5898-5906.
- (136) Meyer RK, McKinley MP, Bowman KA, Braunfeld MB, Barry RA, Prusiner SB. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83(8):2310-2314.
- (137) Wille H, Michelitsch MD, Guenebaut V, Supattapone S, Serban A, Cohen FE et al. Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(6):3563-3568.
- (138) Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE. Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(22):8342-8347.
- (139) Stork M, Giese A, Kretschmar HA, Tavan P. Molecular dynamics simulations indicate a possible role of parallel beta-helices in seeded aggregation of poly-Gln. *Biophys J* 2005; 88(4):2442-2451.
- (140) Eigen M. Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys Chem* 1996; 63(1):A1-18.
- (141) Jarrett JT, Lansbury PT, Jr. Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 1993; 73(6):1055-1058.
- (142) Harper JD, Lansbury PT, Jr. Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: mechanistic truths and physiological consequences of

- the time-dependent solubility of amyloid proteins. *Annu Rev Biochem* 1997; 66:385-407.
- (143) Masel J, Jansen VA, Nowak MA. Quantifying the kinetic parameters of prion replication. *Biophys Chem* 1999; 77(2-3):139-152.
- (144) Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Luhrs T, Aguzzi A. Human prion diseases: molecular and clinical aspects. *Arch Neurol* 2005; 62(4):545-552.
- (145) Jansen K, Schafer O, Birkmann E, Post K, Serban H, Prusiner SB et al. Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. *Biol Chem* 2001; 382(4):683-691.
- (146) Post K, Pitschke M, Schafer O, Wille H, Appel TR, Kirsch D et al. Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. *Biol Chem* 1998; 379(11):1307-1317.
- (147) Shaked GM, Fridlander G, Meiner Z, Taraboulos A, Gabizon R. Protease-resistant and detergent-insoluble prion protein is not necessarily associated with prion infectivity. *J Biol Chem* 1999; 274(25):17981-17986.
- (148) Hill AF, Antoniou M, Collinge J. Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J Gen Virol* 1999; 80 (Pt 1):11-14.
- (149) Qin K, Yang Y, Mastrangelo P, Westaway D. Mapping Cu(II) binding sites in prion proteins by diethyl pyrocarbonate modification and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometric footprinting. *J Biol Chem* 2002; 277(3):1981-1990.
- (150) Thompsett AR, Abdelraheim SR, Daniels M, Brown DR. High affinity binding between copper and full length prion protein identified by two different techniques. *J Biol Chem* 2005.
- (151) Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ et al. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 1992; 356(6370):577-582.
- (152) Lipp HP, Stagliar-Bozicevic M, Fischer M, Wolfer DP. A 2-year longitudinal study of swimming navigation in mice devoid of the prion protein: no evidence for neurological anomalies or spatial learning impairments. *Behav Brain Res* 1998; 95(1):47-54.
- (153) 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* 1999; 344 Pt 1:1-5.
- (154) 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* 1997; 146(1):104-112.
- (155) Lasmezas CI. Putative functions of PrP(C). *Br Med Bull* 2003; 66:61-70.

- (156) Taylor DR, Watt NT, Perera WS, Hooper NM. Assigning functions to distinct regions of the N-terminus of the prion protein that are involved in its copper-stimulated, clathrin-dependent endocytosis. *J Cell Sci* 2005; 118(Pt 21):5141-5153.
- (157) Brown LR, Harris DA. Copper and zinc cause delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi. *J Neurochem* 2003; 87(2):353-363.
- (158) Watt NT, Hooper NM. The prion protein and neuronal zinc homeostasis. *Trends Biochem Sci* 2003; 28(8):406-410.
- (159) Pauly PC, Harris DA. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem* 1998; 273(50):33107-33110.
- (160) Wong BS, Chen SG, Colucci M, Xie Z, Pan T, Liu T et al. Aberrant metal binding by prion protein in human prion disease. *J Neurochem* 2001; 78(6):1400-1408.
- (161) Flechsig E, Shmerling D, Hegyi I, Raeber AJ, Fischer M, Cozzio A et al. Prion protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron* 2000; 27(2):399-408.
- (162) Hijazi N, Shaked Y, Rosenmann H, Ben Hur T, Gabizon R. Copper binding to PrPC may inhibit prion disease propagation. *Brain Res* 2003; 993(1-2):192-200.
- (163) Sigurdsson EM, Brown DR, Alim MA, Scholtzova H, Carp R, Meeker HC et al. Copper chelation delays the onset of prion disease. *J Biol Chem* 2003; 278(47):46199-46202.
- (164) 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):25545-25547.
- (165) Quaglio E, Chiesa R, Harris DA. Copper converts the cellular prion protein into a protease-resistant species that is distinct from the scrapie isoform. *J Biol Chem* 2001; 276(14):11432-11438.
- (166) Qin K, Yang DS, Yang Y, Chishti MA, Meng LJ, Kretzschmar HA et al. 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):19121-19131.
- (167) Bocharova OV, Breydo L, Salnikov VV, Baskakov IV. Copper(II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils. *Biochemistry* 2005; 44(18):6776-6787.
- (168) Brown DR, Hafiz F, Glasssmith LL, Wong BS, Jones IM, Clive C et al. Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance. *EMBO J* 2000; 19(6):1180-1186.

- (169) Ehrenberg M, Rigler R. Fluorescence correlation spectroscopy applied to rotational diffusion of macromolecules. *Q Rev Biophys* 1976; 9(1):69-81.
- (170) Magde D, Elson EL, Webb WW. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers* 1974; 13(1):29-61.
- (171) Rigler R. Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. Applications in biotechnology. *J Biotechnol* 1995; 41(2-3):177-186.
- (172) Eigen M, Rigler R. Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(13):5740-5747.
- (173) Schwille P, Meyer-Almes FJ, Rigler R. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys J* 1997; 72(4):1878-1886.
- (174) Koltermann A, Kettling U, Bieschke J, Winkler T, Eigen M. Rapid assay processing by integration of dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy: high throughput screening for enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(4):1421-1426.
- (175) Winkler T, Kettling U, Koltermann A, Eigen M. Confocal fluorescence coincidence analysis: an approach to ultra high-throughput screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(4):1375-1378.
- (176) Schwille P, Bieschke J, Oehlenschläger F. Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: the analytical and diagnostic potential of diffusion studies. *Biophys Chem* 1997; 66(2-3):211-228.
- (177) Bieschke J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Poser S, Eigen M et al. Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(10):5468-5473.
- (178) Giese A, Bieschke J, Eigen M, Kretzschmar HA. Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases. *Arch Virol Suppl* 2000;(16):161-171.
- (179) Kascsak RJ, Rubenstein R, Merz PA, Tonna-DeMasi M, Fersko R, Carp RI et al. Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J Virol* 1987; 61(12):3688-3693.
- (180) Schwille P. *Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie: Analyse biochemischer Systeme auf Einzelmolekülebene*. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 1997.
- (181) Giese A, Levin J, Bertsch U, Kretzschmar H. Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 320(4):1240-1246.

- (182) Giese A, Bader B, Bieschke J, Schaffar G, Odoy S, Kahle PJ et al. Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 333(4):1202-1210.
- (183) Evotec OAI. FCS +Plus Theory and Handling. 2001. 14-11-2001.
Ref Type: Serial (Book,Monograph)
- (184) Bacia K, Schwille P. A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods* 2003; 29(1):74-85.
- (185) Meseth U, Wohland T, Rigler R, Vogel H. Resolution of fluorescence correlation measurements. *Biophys J* 1999; 76(3):1619-1631.
- (186) Haustein E, Schwille P. Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy. *Methods* 2003; 29(2):153-166.
- (187) Kettling U, Koltermann A, Schwille P, Eigen M. Real-time enzyme kinetics monitored by dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(4):1416-1420.
- (188) Kask P, Palo K, Ullmann D, Gall K. Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(24):13756-13761.
- (189) Kask P, Palo K, Fay N, Brand L, Mets U, Ullmann D et al. Two-dimensional fluorescence intensity distribution analysis: theory and applications. *Biophys J* 2000; 78(4):1703-1713.
- (190) Palo K, Mets U, Jager S, Kask P, Gall K. Fluorescence intensity multiple distributions analysis: concurrent determination of diffusion times and molecular brightness. *Biophys J* 2000; 79(6):2858-2866.
- (191) Liemann S, Glockshuber R. Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. *Biochemistry* 1999; 38(11):3258-3267.
- (192) Bertsch U, Winklhofer KF, Hirschberger T, Bieschke J, Weber P, Hartl FU et al. Systematic identification of antiprion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets. *J Virol* 2005; 79(12):7785-7791.
- (193) Pelton JT, McLean LR. Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal Biochem* 2000; 277(2):167-176.
- (194) Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem* 1989; 177(2):244-249.
- (195) LeVine H, III. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 1993; 2(3):404-410.

- (196) Baskakov IV, Legname G, Gryczynski Z, Prusiner SB. The peculiar nature of unfolding of the human prion protein. *Protein Sci* 2004; 13(3):586-595.
- (197) Piening N, Weber P, Giese A, Kretzschmar H. Breakage of PrP aggregates is essential for efficient autocatalytic propagation of misfolded prion protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326(2):339-343.
- (198) Baskakov IV, Legname G, Prusiner SB, Cohen FE. Folding of prion protein to its native alpha-helical conformation is under kinetic control. *J Biol Chem* 2001; 276(23):19687-19690.
- (199) Baskakov IV, Legname G, Baldwin MA, Prusiner SB, Cohen FE. Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J Biol Chem* 2002; 277(24):21140-21148.
- (200) Baskakov I, Disterer P, Breydo L, Shaw M, Gill A, James W et al. The presence of valine at residue 129 in human prion protein accelerates amyloid formation. *FEBS Lett* 2005; 579(12):2589-2596.
- (201) Tahiri-Alaoui A, Gill AC, Disterer P, James W. Methionine 129 variant of human prion protein oligomerizes more rapidly than the valine 129 variant: implications for disease susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem* 2004; 279(30):31390-31397.
- (202) Tahiri-Alaoui A, James W. Rapid formation of amyloid from alpha-monomeric recombinant human PrP in vitro. *Protein Sci* 2005; 14(4):942-947.
- (203) Greer ML, Pujo-Menjouet L, Webb GF. A mathematical analysis of the dynamics of prion proliferation. *J Theor Biol* 2006.
- (204) Come JH, Fraser PE, Lansbury PT, Jr. A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(13):5959-5963.
- (205) Rochet JC, Lansbury PT, Jr. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10(1):60-68.
- (206) Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science* 1991; 252(5012):1515-1522.
- (207) Doh-Ura K, Iwaki T, Caughey B. Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation. *J Virol* 2000; 74(10):4894-4897.
- (208) Rzepecki P, Nagel-Steger L, Feuerstein S, Linne U, Molt O, Zadnavorac R et al. Prevention of Alzheimer's disease-associated Aβ aggregation by rationally designed nonpeptidic beta-sheet ligands. *J Biol Chem* 2004; 279(46):47497-47505.
- (209) Jackson GS, Hosszu LL, Power A, Hill AF, Kenney J, Saibil H et al. Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science* 1999; 283(5409):1935-1937.

- (210) Swietnicki W, Morillas M, Chen SG, Gambetti P, Surewicz WK. Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP90-231. *Biochemistry* 2000; 39(2):424-431.
- (211) Zou WQ, Cashman NR. Acidic pH and detergents enhance in vitro conversion of human brain PrPC to a PrPSc-like form. *J Biol Chem* 2002; 277(46):43942-43947.
- (212) Tjernberg LO, Pramanik A, Bjorling S, Thyberg P, Thyberg J, Nordstedt C et al. Amyloid beta-peptide polymerization studied using fluorescence correlation spectroscopy. *Chem Biol* 1999; 6(1):53-62.
- (213) Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H et al. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* 1999; 19(20):8866-8875.
- (214) 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):253-258.
- (215) Wong BS, Brown DR, Sy MS. A Yin-Yang role for metals in prion disease. *Panminerva Med* 2001; 43(4):283-287.
- (216) Miura T, Sasaki S, Toyama A, Takeuchi H. Copper reduction by the octapeptide repeat region of prion protein: pH dependence and implications in cellular copper uptake. *Biochemistry* 2005; 44(24):8712-8720.
- (217) Kramer ML, Kratzin HD, Schmidt B, Romer A, Windl O, Liemann S et al. Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J Biol Chem* 2001; 276(20):16711-16719.
- (218) 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(9):6795-6802.
- (219) Vassallo N, Herms J. Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J Neurochem* 2003; 86(3):538-544.
- (220) Tsenkova RN, Iordanova IK, Toyoda K, Brown DR. Prion protein fate governed by metal binding. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 325(3):1005-1012.
- (221) Treiber C, Simons A, Multhaup G. Effect of copper and manganese on the de novo generation of protease-resistant prion protein in yeast cells. *Biochemistry* 2006; 45(21):6674-6680.
- (222) Silveira JR, Raymond GJ, Hughson AG, Race RE, Sim VL, Hayes SF et al. The most infectious prion protein particles. *Nature* 2005; 437(7056):257-261.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Johannes Martin Levin
Geboren: am 24.01.1979 in Göttingen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet
Adresse: Klenzestr. 52a, 80469 München
Telefon: +49 (0)89 / 973 941 76
Mobil: +49 (0)177 / 69 131 47
Email: jlevin@med.uni-muenchen.de

Schulbildung

1985 -1989 Grundsule Waake, Landkreis Göttingen
1989 -1991 OS Lutherschule Göttingen
1991 -1998 Max-Planck-Gymnasium Göttingen
Abitur (Note 1.7)
Großes Latinum
Graecum

Zivildienst

1998 -1999 Zivildienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe München im
Rettungsdienst, Ausbildung zum Rettungssanitäter

Berufsausbildung

seit WS 1999 Studium der Humanmedizin an der LMU München
08/2001 Physikum
08/2002 1. Staatsexamen
09/02 -06/03 Medizinstudium an der Universität von Granada (Spanien)
03/2005 2. Staatsexamen
06/2006 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr:

04/05 -08/05 PJ Innere Medizin: Harvard Medical School, Cambridge, MA (USA)
08/05 +09/05 PJ Chirurgie: Chirurgische Klinik Nussbaumstraße, LMU München
10/05 +11/05 PJ Chirurgie: Hospital Universitario San Cecilio Granada (Spanien)
12/05 -03/06 PJ Neurologie: Klinikum Grosshadern, LMU München

Ärztliche Tätigkeit

seit 07/2006 Neurologische Klinik, Klinikum Großhadern,
Marchioninstr. 15, 81377 München
Arbeitsgruppe PD Dr. Bötzel, Schwerpunkt Bewegungsstörungen

Praktika

09/2000	Hospital General Miguel Perez Carreño, Caracas, Venezuela
03/2001	Biochemisches Institut bei Prof. Haass, Labor für Alzheimerforschung, LMU München
09/2003	Medizinische Klinik II, Klinikum Großhadern, München
03/2004	Memory and Aging Center, UCSF, San Francisco, USA
08/2004	Machame Hospital, Moshi, Tansania

Außercurriculare Aktivitäten

1999-2004	Fachschaftsvertreter Medizin der LMU
2000-2002	Vier Semester Co-Assistent im Histologiekurs
2001-2002	Sprecher der Medizinstudenten im Fachbereichsrat der LMU
2002-2003	Auslandsjahr in Granada (Spanien), 4. Jahr des Spanischen Medizinstudiums
2003-2005	Koordinator des Erasmus-Austauschs der medizinischen Fakultät der LMU mit Spanien
2005	Mitarbeit an der PJ- Reform der Chirurgischen Klinik Nussbaumstr.

Sonstige Qualifikationen

Fremdsprachen	Englisch fließend in Wort und Schrift Spanisch fließend in Wort und Schrift Großes Latinum Graecum Russisch (3 Jahre)
05/1999	Staatliche Rettungssanitäterprüfung

Hobbies

1985 -1998	Geigenunterricht und –spiel in verschiedenen Orchestern Fußball von F- bis A-Jugend (TSV Ebergötzen)
2002	Deutsche Fußballmeisterschaften für Medizinstudenten (4. Platz)

Stipendien

2002-2003	Erasmus-Stipendium der Georg-August-Universität Göttingen
2005	Stipendium der Harvard Munich Educational Alliance für ein PJ- Tertial an der Harvard Medical School in Boston, USA

Publikationen

Originalarbeiten:

G.D. Rabinovici, P.N. Wang, J. Levin, L. Cook, M. Pravdin, J. Davis, S.J. DeArmond, N.M. Barbaro, J. Martindale, B.L. Miller, and M.D. Geschwind
"First Symptom in Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease"
Neurology, 66 (2006), 286 - 287

J. Levin, U. Bertsch, H. Kretzschmar, and A. Giese
“Single particle analysis of manganese-induced prion protein aggregates”
Biochemical and Biophysical Research Communications, 329 (2005), 1200 -1207

A. Giese, J. Levin, U. Bertsch, and H. Kretzschmar
“Influence of metal ions on *de novo* aggregation of full-length prion protein”
Biochemical and Biophysical Research Communications, 320 (2004), 1240 -1246

Vorträge:

“The 2005 Project of the LMU HMS Alliance for Medical Education: Evidence Based
Medicine”
10.09.2005, 2005 Singapore Medical Education Conference, Singapore

“Prion diseases and metal ions”
12.03.2004, Neurology Grand Rounds, University of California San Francisco, USA

“Influence of metal ions on in vitro aggregation of recombinant PrP”
04.12.2003, EU Prion Partners Meeting, Lech, Austria

Ausgewählte Poster:

Johannes Levin, Siegbert Kraftcyk, Peter Valcovic, and Kai Bötzel
“Objektivierte Rigormessung durch Muskelableitungen bei standardisierten Flexions- /
Extensionsbewegungen im Ellenbogengelenk“
Kongress des deutschen Gesellschaft für klinische Neurophysiologie und funktionelle
Bildgebung 21.-25.03.2007, München, Deutschland

Johannes Levin, Stefan Lorenzl, Matthias Habeck, Kai Bötzel, Hans Kretzschmar, and Armin
Giese
“Auswirkungen der Spaltung von α -Synuclein durch Proteasen auf dessen *de novo*
Aggregation.“
5. Deutscher Parkinson-Kongress, 5.-7.03.2007, Ulm, Deutschland

Armin Giese, Johannes Levin, Uwe Bertsch, and Hans Kretzschmar
“Influence of metal ions on *de novo* aggregation of full-length prion protein”
NeuroPrion Meeting 24.-28.5.2004, Paris, France

Johannes Levin, Armin Giese, Jan Bieschke, Petra Weber, Uwe Bertsch, and Hans
Kretzschmar
“Probing the molecular composition of prion protein aggregates by dual-colour SIFT”
International conference: Prion diseases: from basic research to intervention
concepts 8.-10.10.2003, Munich, Germany

Uwe Bertsch, Armin Giese, Jan Bieschke, Petra Weber, Johannes Levin, and Hans
Kretzschmar
“Screening for potential prion disease therapeutics using a single-molecule
fluorescence assay of PrP^C association to prion rods *in vitro*”
International conference: Prion diseases: from basic research to intervention
concepts 8.10.-10.10.2003, Munich, Germany

Johannes Levin, Armin Giese, Uwe Bertsch, Jan Bieschke, Petra Weber und Hans
Kretzschmar
„Aggregationsanalyse von rekombinantem Prionprotein durch SIFT (Scanning for
Intensely Fluorescent Targets)“
TSE Research Platform 27.-28.6.2002, Berlin, Germany

München, August 2007

11. Danksagung

Besonderen Dank möchte ich meinem Betreuer, Armin Giese, für die unschätzbare Hilfe während der Doktorarbeit und auch als Mentor im akademischen Leben aussprechen. Er hat mir seine Begeisterung für die bearbeitete Thematik übertragen, und mich durch seine scharfsinnigen Hilfestellungen immer wieder aufs neue motiviert. Sein Beispiel in freundlichem Umgang, steter Hilfsbereitschaft und der Freude an neuen Ergebnissen und Gedanken prägt das Arbeitsklima im „FCS-Labor“, und sorgt dafür, dass ich auch heute dort sehr gerne arbeite.

Großer Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. H.A. Kretzschmar, auf dessen Unterstützung in der Doktorarbeit und bei außercurricularen Plänen ich mich stets verlassen konnte.

Jan Bieschke ist für die Einführung in konfokale einzelmolekülspektroskopische Verfahren und kontinuierliche Ansprechbarkeit in chemischen Fragen zu danken. Uwe Bertsch und Petra Weber danke ich für ihre Unterstützung in der Herstellung rekombinanten Prionproteins und Aufreinigung humaner *Prion-Rods*.

Brigitte Kraft und Michael Schmidt danke ich für ihre hervorragende technische Assistenz. Den vielen anderen Labormitarbeitern möchte ich für das freundschaftliche Arbeitsklima danken.

Zuletzt ist meiner Familie, meinen Freunden und vor allem meiner Frau zu danken. Sie brachten und bringen mir Verständnis für die vielen Stunden der „Freizeitforschung“ entgegen. Ihre Unterstützung im Alltäglichen, durch Korrekturlesen, Diskussionen und einfache Anwesenheit beim Schreiben bedeuteten mir sehr viel und haben direkt und indirekt erheblich zu dieser Arbeit beigetragen.