

# **Molekulare Mechanismen der Prionpropagation**

Die Rolle der Primärsequenz und der Proteinkonformation  
für die Speziesbarriere

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

**Niklas Piening**

aus

Hamburg

München, den 10.11.2005

**Piening, Niklas**

Molekulare Mechanismen der Prionpropagation - Die Rolle der Primärsequenz und der Proteinkonformation für die Speziesbarriere

Die vorliegende Arbeit wurde am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung (Direktor: Prof. Dr. Hans A. Kretzschmar) der Ludwig-Maximilians-Universität München angefertigt.

Gutachter:

1. Gutachter

Prof. Dr. Thomas Cremer

2. Gutachter

Prof. Dr. Harry MacWilliams

Tag der mündlichen Prüfung:

11.04.2006

### Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die Dissertation von mir selbstständig, ohne unerlaubte Beihilfe angefertigt ist.

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg nicht unterzogen habe.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen .....</b>	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1. Transmissible Spongiforme Enzephalopathien .....	1
1.2. Die Prion-Hypothese .....	4
1.3. Das zelluläre Prionprotein und seine pathogene Isoform.....	5
1.3.1. Das zelluläre Prionprotein .....	5
1.3.2. Die pathogene Isoform des Prionproteins .....	11
1.4. Speziesbarriere und Erregerstämme .....	14
1.4.1. Speziesbarriere.....	14
1.4.2. Erregerstämme .....	16
1.5. Interaktion, Umfaltung und die Rolle der Primärsequenz.....	18
1.6. Speziesbarrierenanalytik bei der Rötelmaus .....	21
1.7. Fragestellung.....	22
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>24</b>
2.1. Material .....	24
2.1.1. Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien .....	24
2.1.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	24
2.1.1.2. Chemikalien .....	24
2.1.2. Stämme von Escherichia coli .....	24
2.1.3. Eukaryontische Zelllinien .....	24
2.1.4. Oligodesoxyribonukleotide .....	25
2.1.4.1. Oligodesoxyribonukleotide für die PCR.....	25
2.1.4.2. Oligodesoxyribonukleotide für die Mutagenese-PCR.....	26
2.1.4.3. Oligodesoxyribonukleotide für die DNS-Sequenzierung.....	26
2.1.4.3.1. Mit 5'-Modifikation.....	26
2.1.4.3.2. Ohne 5'-Modifikation.....	27



2.1.5.	Plasmide.....	27
2.1.6.	Antikörper.....	28
2.1.6.1.	Anti-PrP-Antikörper.....	28
2.1.6.2.	Sekundär-Antikörper.....	29
2.1.7.	Lösungen und Puffer für verschiedene Methoden.....	29
2.1.7.1.	Lösungen und Puffer zur Arbeit mit <i>Escherichia coli</i> .....	29
2.1.7.2.	Lösungen und Puffer zur Arbeit mit Säugerzellkulturen.....	29
2.1.7.3.	Lösungen und Puffer zur Protein-Analyse und Aufreinigung....	30
2.1.7.4.	Lösungen und Puffer zur <i>in vitro</i> Konversion.....	31
2.2.	Methoden.....	32
2.2.1.	Methoden zur Arbeit mit <i>Escherichia coli</i> .....	32
2.2.1.1.	Allgemeine Wachstumsbedingungen.....	32
2.2.1.2.	Wachstumsmessung.....	32
2.2.1.3.	Erstellung von kompetenten Zellen.....	32
2.2.1.4.	Transformation von Plasmid-DNS.....	33
2.2.1.5.	Erstellung von Stammkulturen.....	34
2.2.1.6.	Isolierung von Plasmid-DNS.....	34
2.2.1.7.	Expression von rekombinantem Prionprotein.....	35
2.2.2.	Methoden zur DNS-Analyse und Klonierung.....	35
2.2.2.1.	Isolation von genomischer DNS.....	35
2.2.2.2.	Konzentrationsbestimmung der DNS.....	36
2.2.2.3.	Polymerase-Kettenreaktion.....	36
2.2.2.4.	Ortsspezifische Mutagenese.....	37
2.2.2.5.	Reinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNS.....	38
2.2.2.6.	Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen.....	38
2.2.2.7.	Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten.....	38
2.2.2.8.	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	39
2.2.2.9.	Ligation von DNS-Fragmenten.....	39
2.2.2.10.	Sequenzanalyse von DNS.....	40
2.2.2.10.1.	Kettenabbruchreaktionen.....	40
2.2.2.10.2.	Das Sequenziergel.....	41
2.2.2.11.	Expressionsvektoren mit Wildtyp- <i>Prnp</i> -Genen.....	41
2.2.2.11.1.	pCI-cgPrP-6-10.....	42
2.2.2.11.2.	pCI-btPrP-6/5-2.....	42

2.2.2.11.3.	pCI- <i>oaPrP</i> (ARQ)-12-6 .....	43
2.2.2.11.4.	pCI- <i>oaPrP</i> (ARR)-3-1 .....	44
2.2.2.11.5.	pCI- <i>maPrP</i> -7-7 .....	44
2.2.2.11.6.	pTRE- <i>cgPrP</i> -8-2 .....	45
2.2.2.11.7.	pET- <i>maRekPrP</i> -5-8.....	45
2.2.2.12.	Expressionsvektoren mit mutierten <i>Prnp</i> -Genen .....	46
2.2.2.12.1.	pCI- <i>cgPrPM109I</i> -3-6.....	46
2.2.2.12.2.	pCI- <i>cgPrPM109L</i> -1-4.....	47
2.2.2.12.3.	pCI- <i>cgPrPN155Y</i> -4-2.....	47
2.2.2.12.4.	pCI- <i>cgPrPN170S</i> -2-2 .....	48
2.2.2.12.5.	pCI- <i>cgPrPN155Y-N170S</i> -2-1.....	49
2.2.2.12.6.	pCI- <i>cgPrPE227D</i> -1-5 .....	49
2.2.3.	Methoden zur Arbeit mit Säugerzellkulturen .....	50
2.2.3.1.	Allgemeine Kultivierungsbedingungen .....	50
2.2.3.2.	Erzeugung stabiler Klone .....	50
2.2.3.3.	Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen.....	52
2.2.3.4.	Proteinmarkierung mit <sup>35</sup> S .....	53
2.2.4.	Methoden zur Protein-Analyse und Aufreinigung.....	53
2.2.4.1.	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	53
2.2.4.1.1.	Bradford-Assay .....	53
2.2.4.1.2.	Bicinchoninsäure-Assay .....	53
2.2.4.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	54
2.2.4.3.	Western Blot-Analyse.....	54
2.2.4.4.	Dot Blot-Analyse .....	55
2.2.4.5.	Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen.....	56
2.2.4.5.1.	Coomassie-Färbung.....	56
2.2.4.5.2.	Silber-Färbung.....	56
2.2.4.6.	Proteolytischer Abbau von Proteinen mit Proteinase K.....	57
2.2.4.7.	Deglykosylierung von Glykoproteinen .....	57
2.2.4.8.	Erstellung von Zell-Lysaten zur Protein-Analyse .....	57
2.2.4.9.	Immunpräzipitation von <sup>35</sup> S-PrP <sup>C</sup> .....	58
2.2.4.10.	Aufreinigung von PrP <sup>Sc</sup> .....	59
2.2.4.11.	Aufreinigung von rekombinantem Prionprotein.....	61
2.2.4.12.	Umpufferung von rekombinantem Prionprotein .....	63

2.2.4.13.	Fluoreszenz-Markierung von rPrP .....	63
2.2.4.14.	Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie .....	64
2.2.4.15.	Kovalente Vernetzung von PrP-Aggregaten .....	65
2.2.4.16.	Massenspektrometrie .....	66
2.2.5.	<i>In vitro</i> Konversionsreaktionen .....	66
2.2.5.1.	<i>In vitro</i> Konversion durch Inkubation von Hirnhomogenat .....	66
2.2.5.2.	”Protein Misfolding Cyclic Amplification”-Reaktion .....	67
2.2.5.3.	<i>In vitro</i> Konversion mit Hirnhomogenat und Zell-Lysat .....	68
2.2.5.4.	<i>In vitro</i> Konversion mit gereinigtem rPrP und PrP <sup>Sc</sup> .....	69
2.2.5.5.	<i>In vitro</i> Konversion mit gereinigtem PrP <sup>C</sup> und PrP <sup>Sc</sup> .....	69
2.2.5.6.	<i>In vitro</i> Konversion von rekombinantem Prionprotein .....	71
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>72</b>
3.1.	Primärsequenz und Speziesbarriere .....	72
3.1.1.	Vergleich der Aminosäuresequenzen .....	72
3.1.2.	Evaluation verschiedener Konversionsreaktionen .....	74
3.1.2.1.	Konversionsreaktionen basierend auf Hirnhomogenat .....	74
3.1.2.1.1.	Voraussetzungen zur Erzeugung von Infektiösität <i>in vitro</i> .....	74
3.1.2.1.2.	Beurteilung der Rolle der Rötelmaus-Speziesbarriere .....	79
3.1.2.2.	Konversionsreaktion mit Hirnhomogenat und Zell-Lysat .....	80
3.1.2.3.	Konversionsreaktionen mit gereinigtem rPrP und PrP <sup>Sc</sup> .....	81
3.1.2.4.	Konversionsreaktionen mit gereinigtem PrP <sup>C</sup> und PrP <sup>Sc</sup> .....	82
3.1.3.	Einfluss der Punktmutationen auf die Konversionseffizienz .....	89
3.1.3.1.	Homologe Konversion .....	89
3.1.3.2.	Konversion durch Erregerstämme aus Maus und Hamster .....	92
3.1.3.3.	Konversion durch Erregerstämme aus Rind und Schaf .....	95
3.2.	Vernetzung von PrP-Aggregaten und molekulare Architektur .....	97
3.2.1.	Vernetzung von rPrP-Aggregaten .....	98
3.2.2.	Stabilisierung von infektiösem PrP <sup>Sc</sup> .....	105
3.2.3.	MS-Analyse von stabilisierten PrP-Aggregaten .....	107

<b>4. Diskussion.....</b>	<b>110</b>
4.1. Autokatalytische Vermehrung von Infektiösität <i>in vitro</i> .....	110
4.2. Primärsequenz, Proteinkonformation und Speziesbarriere.....	113
4.2.1. Interaktion als Voraussetzung für die Konversion .....	113
4.2.2. Punktmutationen und Interaktionsflächen.....	115
4.2.3. Sequenzidentität und Strukturkompatibilität .....	120
4.2.4. Primärsequenz-unabhängige Faktoren .....	123
4.3. Stabilisierung von PrP-Aggregaten zur Strukturanalyse.....	125
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>129</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>130</b>
<b>7. Liste der Veröffentlichungen.....</b>	<b>155</b>

## Abkürzungen

<sup>35</sup> S	Radioaktives Schwefel-Isotop
A	Adenin oder Ampère
Amp <sup>r</sup>	Ampicillin-Resistenz
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Asn	Asparagin
B. taurus	Bos taurus
BCA	Bicinchoninsäure („Bicinchoninic Acid“)
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C. glareolus	Clethrionomys glareolus
ca.	ungefähr
cDNS	Komplementäre DNS
CL	chemische Komponenten zur kovalenten Vernetzung von Proteinen
CMV	Cytomegalie-Virus
cpm	Zählungen pro Minute („counts per minute“)
D	Asparat
Da	Dalton
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide (5'-Triphosphate)
DPBS	Dulbecco's PBS
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
FBS	Fetales Rinderserum („Fetal Bovine Serum“)
FCS	Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie
FPLC	Schnelle Proteinflüssigchromatographie
G	Glycin oder Guanin
g	Erdbeschleunigung
GndHCl	Guanidinium-Hydrochlorid
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
H	Histidin
Hyg <sup>r</sup>	Hygromycin-Resistenz
Hz	Herz
I	Isoleucin
i.c.	intracerebral
IP	Immunpräzipitation

IPTG	Isopropyl-Thio- $\beta$ -D-Galactopyranosid
IRD	Farbstoff mit Absorption im Infrarot-Bereich („Infrared dye“)
ISS	Instituto Superiore di Sanita
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
L	Leucin
LD <sub>50</sub>	50 % i.c. Lethale Dosis
M	Methionin
M. musculus	Mus musculus
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
max.	maximal
MES	Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
mind.	mindestens
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNS	Boten-RNS („messenger“-RNS)
MS	Massenspektrometrie
N	Asparagin
NBT	Nitro-Blau-Tetrazolium
Neo <sup>r</sup>	Neomycin-Resistenz
NMR	Kernresonanzspektroskopie („nuclear magnetic resonance“)
NP40	Nonidet-P40
nt	Nukleotid
O. aries	Ovis aries
OD	Optische Dichte
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte gemessen bei 600 nm
ORF	Offener Leserahmen („open reading frame“)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung („Phosphate Buffered Saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“)
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
PK	Proteinase K
PMCA	Protein Misfolding Cyclic Amplification
Prnp	Gen des Prion Proteins
PrP	Prion Protein
PrP <sup>C</sup>	Zelluläres Prionprotein
PrPres	Proteinase K-resistentes Prionprotein
PrP <sup>Sc</sup>	Aus TSE-infizierten Organismen gewonnenes infektiöses Prionprotein
Pur <sup>r</sup>	Puromycin-Resistenz
Q	Glutamin
RKI	Robert-Koch Institut
RNS	Ribonukleinsäure
rPrP	Aus Bakterien gewonnenes Prionprotein (rekombinantes Prionprotein)
RT	Raumtemperatur
Ru(bpy)	Ruthenium-Bipyridylchlorid
S	Serin
s	Sekunden
SAF	Scrapie-assoziierte Fibrille
SDS	Natriumdodecylsulfat („Sodium Dodecylsulfate“)
sPMCA	serielle PMCA
T	Thymin

TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TOF	Time of flight
tTA	Tetrazyklin-abhängiger Transkriptionsaktivator
U	Units (Hersteller-spezifische Enzymaktivitätseinheit)
Units	Hersteller-spezifische Enzymaktivitätseinheit
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Valin
v/v	Volumen pro Volumen
VLA	Veterinary Laboratories Agency
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
x	Vielfaches von
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
ZfP	Zentrallabor für Proteinanalytik
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung

# 1. Einleitung

## 1.1. Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Als Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) werden eine Reihe tödlich verlaufender, degenerativer Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) zusammengefasst, welche sowohl beim Menschen als auch bei diversen Tierarten auftreten. Als Archetyp dieser Krankheiten gilt die seit 1732 bekannte Traberkrankheit von Schafen und Ziegen (McGowan, 1922), die aufgrund der pathologischen Verhaltensmuster betroffener Tiere auch als Scrapie („to scrape“, engl. kratzen) bezeichnet wird (Stockmann, 1913). Weiterhin sind die Bovine Spongiforme Enzephalopathie beim Rind (BSE) (Wells *et al.*, 1987), die übertragbare spongiforme Hirndegeneration bei Nerzen (TME, „Transmissible Mink Encephalopathy“) (Hartsough & Burger, 1965; Burger & Hartsough, 1965), die chronisch zehrende Krankheit der Hirschartigen (CWD, „Cronic Wasting Disease“) (Williams & Young, 1980), die Feline Spongiforme Enzephalopathie der Katzen (FSE) (Wyatt *et al.*, 1991) sowie weitere spongiforme Enzephalopathien bei zahlreichen Zootieren (Jeffrey & Wells, 1988) zu den TSE-Erkrankungen der Tiere zu zählen.

Zu den spongiformen Enzephalopathien des Menschen gehören die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921a; Jakob, 1921b), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) (Gerstmann, 1928; Gerstmann *et al.*, 1936), die letale familiäre Schlaflosigkeit (FFI, „fatal familial insomnia“) (Lugaresi *et al.*, 1986) und Kuru (Zigas & Gajdusek, 1957), eine beim Volksstamm der Fore im östlichen Hochland von Papua Neuguinea auftretende neurologische Erkrankung, welche durch rituellen Kannibalismus übertragen wurde (Klitzman, 1999).

Charakteristisch für TSE-Erkrankungen, welche sowohl sporadisch auftreten, als auch durch Vererbung weitergegeben werden können, ist die in unterschiedlich starker Ausprägung auftretende schwammartige Vakuolisierung des ZNS, assoziiert mit einem massiven Nervenzellverlust, einer Aktivierung von Gliazellen (Astrogliose) sowie der pathologischen Ablagerung des Prionproteins. Weiterhin sind Transmissible Spongiforme Enzephalopathien dadurch gekennzeichnet, dass sie übertragbare Erkrankungen darstellen, was bereits 1936 von Cuillé und Chelle durch Infektion von Schafen und Ziegen mit Scrapie (Cuillé & Chelle, 1936) experimentell gezeigt werden



konnte. Dass dies auch für menschliche TSE-Erkrankungen gilt, konnte in den sechziger Jahren durch Übertragung von Kuru auf Schimpansen nach intrazerebraler Inokulation von Hirnhomogenat betroffener Patienten demonstriert werden (Gajdusek *et al.*, 1967). Wenig später wurde die erfolgreiche Übertragung von CJD auf Schimpansen berichtet (Gibbs, Jr. *et al.*, 1968) und auch für GSS und FFI konnte mittlerweile die Übertragbarkeit experimentell belegt werden (Masters *et al.*, 1981; Tateishi *et al.*, 1995).

Eine Folge der Übertragbarkeit der TSE-Erkrankungen ist die Mitte der 80er-Jahre begonnene BSE-Epidemie, welche 1993 ihren Höhepunkt erreichte und zur Entstehung der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (nvCJD) führte.

Gerald Wells stellte im November 1986 am zentralen britischen Veterinärlabor in Weybridge an histologischen Hirngewebeschnitten eines Rindes eine außergewöhnliche, im Lichtmikroskop sichtbare, schwammartige „Durchlöcherung“ fest und beschrieb damit erstmalig die Bovine Spongiforme Enzephalopathie beim Rind (BSE), welche aufgrund der klinischen Manifestation auch als Rinderwahnsinn bekannt wurde (Wells *et al.*, 1987; Wells *et al.*, 1998). Im Verlauf der 80er-Jahre kam es zu einem starken Anstieg der BSE-Fälle in Großbritannien und später im geringeren Ausmaß auch auf dem europäischen Kontinent. Im Mai 1987 wurde daher eine erste epidemiologische Untersuchung durchgeführt, welche den Verzehr von tiermehlhaltigem Kälberkraftfutter (Mischfutter) als das gemeinsame Merkmal der betroffenen Herden identifizierte (Wilesmith *et al.*, 1988). Diese Beobachtungen zusammen mit der neuropathologischen Ähnlichkeit der BSE mit der Scrapie-Krankheit führten zu der Hypothese, dass BSE durch die Verfütterung von Scrapie-kontaminiertem Tiermehl an Rinder verursacht wurde (Mischfutterhypothese) und sich die Erkrankung wiederum durch das Verfüttern von BSE-kontaminiertem Tiermehl schnell zu einer Epidemie ausweiten konnte (Wilesmith *et al.*, 1988; Wilesmith *et al.*, 1991). Die zwischen 1971 und 1984 bei fast allen Tiermehlproduzenten eingeführte Umstellung vom „Chargenbetrieb“ auf das „kontinuierliche Verfahren“, welche unter anderem die Verringerung der Verarbeitungstemperatur unter 100°C sowie die Verkürzung der Verweilzeit im Produktionsprozess beinhaltete und damit zu einer fehlenden oder mangelhaften Inaktivierung des infektiösen Agens führte, ist dabei als Hauptursache für die Infektion der Tiere und damit für die Entstehung der BSE-Krise zu sehen (Wilesmith *et al.*, 1991).

Zwischen Ende des Jahres 1995 und Anfang 1996 wurden in Großbritannien erstmals ungewöhnliche Fälle der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit gemeldet. Die betroffenen Patienten wiesen ein bemerkenswert niedriges Sterbealter, relativ früh einsetzende psychiatrische Symptome und einen verlängerten klinischen Verlauf auf. Auch die Neuropathologie unterschied sich im Hinblick auf das Läsionsprofil und das Auftreten von Proteinablagerungen in Form von floriden Plaques von der klassischen CJD (Ironsides *et al.*, 1996). Bis März 1996 waren zehn Fälle dieser Krankheit, die man als neue Variante der CJD (nvCJD) bezeichnete, bestätigt worden, wobei die Fälle zunächst nur in Großbritannien auftraten (Will *et al.*, 1996). Aufgrund des zeitlichen und geographischen Zusammenhangs schien es daher möglich, dass die nvCJD kausal mit der BSE verbunden sein könnte und durch den Verzehr von erregerrhaltigem bovinen Gewebe, welches in Großbritannien während der 80er-Jahre in Lebensmittel gelangte, verursacht wurde (Collinge *et al.*, 1995; Ridley & Baker, 1996; Will *et al.*, 1996). Durch Infektionsstudien mit Mäusen konnte mittlerweile gezeigt werden, dass das BSE-Agens bemerkenswert konstante Übertragungscharakteristika hinsichtlich der Inkubationszeit und des pathologischen Läsionsprofils aufweist, welche denen der nvCJD gleichen (Bruce *et al.*, 1997). Es wird daher allgemein angenommen, dass BSE durch Übertragung auf den Menschen die nvCJD verursacht (Collinge *et al.*, 1996; Priola, 1996; Hill *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 1999). Diese Annahme wurde durch erfolgreiche Übertragung von BSE auf Makaken bestätigt (Lasmézas *et al.*, 1996). Generell wird für BSE eine breite Wirtsspezifität angenommen, da neben der experimentellen Übertragbarkeit von BSE auf Schafe (Baker *et al.*, 1993; Foster *et al.*, 1993; Houston *et al.*, 2000) auch die FSE der Hauskatzen (Leggett *et al.*, 1990) und zahlreiche TSE-Fälle bei exotischen Vertretern der Familien *Bovidae* (Hornträger) und *Felidae* (Katzen) in britischen Tiergärten in den 80er- und 90er-Jahren auf den Verzehr von Gewebe BSE-erkrankter Rinder zurückgeführt werden (Jeffrey *et al.*, 1992; Bruce *et al.*, 1994; Sigurdson & Miller, 2003).

Weltweit sind bisher an die 200.000 Fälle von BSE aufgetreten, wobei davon allein rund 180.000 in Großbritannien registriert wurden. Obwohl schon 1988 ein Verbot für die Verfütterung von Tiermehl verhängt wurde, erreichte die BSE-Krise erst einige Jahre später ihren Höhepunkt. Dass diese Verzögerung mit der Inkubationszeit von 4,5 Jahren zusammenhing, zeigte sich in den Jahren nach 1992 (Bradley & Wilesmith, 1993; Anderson *et al.*, 1996). Während am Höhepunkt der Epidemie 1992 weltweit noch 37.000 Fälle von BSE gemeldet wurden, waren es im Jahre 2004 nur noch rund

850 Fälle (Stand März 2005; Quelle „Department for Environment Food and Rural Affairs“, UK; [www.defra.gov.uk](http://www.defra.gov.uk)).

Bisher sind in Großbritannien rund 150 Menschen an nvCJD verstorben (rund 160 Menschen weltweit). Mit 28 Fällen wurde im Jahr 2000 ein Höhepunkt erreicht. Im Jahre 2004 waren es nur noch neun (Stand Mai 2005; Quelle: „Department of Health“, UK; [www.dh.gov.uk](http://www.dh.gov.uk)). Trotz dieser deutlich abnehmenden Tendenz ist aufgrund der Ungewissheit über den Einfluss genetischer Faktoren auf die Inkubationszeit sowie aufgrund weiterer noch ungeklärter Sachverhalte eine genaue Prognose bezüglich der weiteren Entwicklung der nvCJD zur Zeit nicht möglich (Peden *et al.*, 2004; Llewelyn *et al.*, 2004).

## 1.2. Die Prion-Hypothese

Trotz intensiver Forschungsarbeiten ist die Natur des infektiösen Agens der spongiformen Enzephalopathien bis heute in vielen Aspekten noch unverstanden. Lange Zeit betrachtete man aufgrund der langen Inkubationszeiten sich sehr langsam vermehrende Viren als möglichen Erreger (Thormar, 1971; Nathanson, 1980; Diringer *et al.*, 1988; Diringer *et al.*, 1994), doch konnte keine virale Nukleinsäure nachgewiesen werden (Kellings *et al.*, 1993). Tikvah Alper beschrieb im Jahre 1966 erstmals, dass der TSE-Erreger selbst mit massiver DNA- und RNA-schädigender Bestrahlung nicht inaktiviert werden kann und zog daraus den Schluss, dass es sich nicht um eine der bekannten Erregerklassen wie Viren, Bakterien, Pilzen oder Protozoen handeln könne, sondern um ein infektiöses Agens, das über kein Genom verfügt (Alper *et al.*, 1966; Alper *et al.*, 1967; Alper, 1985).

Dieser Gedanke wurde von Gibbons und Hunter 1967 weiterentwickelt, welche erstmals ein sich vermehrendes Zellmembranprotein als Erreger vorschlugen (Gibbons & Hunter, 1967). Im selben Jahr stellte Griffith die Hypothese auf, dass ein bloßes Protein im Sinne einer Autokatalyse repliziert wird und so für die Übertragung von TSE verantwortlich sein könnte (Griffith, 1967).

Dass sich mit diversen nukleinsäureschädigenden Verfahren die Infektiösität des TSE-Erregers nicht verringern lässt, wohl aber mit Substanzen, die Proteine abbauen oder deren natürliche Faltung auflösen, wurde im Jahre 1982 von Stanley Prusiner dargestellt. Er führte erstmalig die Bezeichnung „Prion“ (für „**proteinacious infectious particle**“) ein, um die Eigenart des TSE-Erregers zu unterstreichen, im Wesentlichen aus

einem Protein zu bestehen (Prusiner, 1982). Die Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien werden daher auch als Prionkrankheiten bezeichnet.

Nach der Prion-Hypothese besteht der TSE-Erreger hauptsächlich aus einer pathogenen, fehlgefalteten Form eines spezifischen Wirtsproteins, dem zellulären Prionprotein ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ). Diese fehlgefaltete Form ist in der Lage die strukturelle Umwandlung weiterer Moleküle in einem autokatalytischen Prozess zu bewirken, wodurch sich die pathogene Form repliziert (Alper *et al.*, 1967; Griffith, 1967; Prusiner *et al.*, 1982; Prusiner, 1991). Das dafür verantwortliche Protein konnte in seiner pathogenen Form aufgereinigt werden (Prusiner, 1982; Bolton *et al.*, 1982) und wurde als „Scrapie“-assoziiertes Prionprotein ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ) bezeichnet. In Präparationen von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  lassen sich elektronenmikroskopisch erkennbare, makromolekulare Proteinstrukturen darstellen, welche als Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) oder „prion rods“ bezeichnet werden (Merz *et al.*, 1981; Bolton *et al.*, 1982; Merz *et al.*, 1983). Anreicherungen von SAFs bzw. „prion rods“ erwiesen sich als hochinfektiös (Prusiner *et al.*, 1983; Diringen *et al.*, 1983), wobei die Anreicherung mit einer Zunahme der Infektiösität korreliert, was als weiterer Hinweis für die Richtigkeit der Prion-Hypothese gedeutet wurde (Gabizon *et al.*, 1988). Eine Herausforderung für die Prion-Hypothese ist dabei der Umstand, dass Prionkrankheiten nicht nur durch Infektion erworben, sondern auch rein erblich bedingt sein oder spontan entstehen können. Die Prion-Hypothese geht davon aus, dass einerseits Mutationen im Gen des Prionproteins die Umwandlung von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  zu  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  begünstigen und andererseits basierend auf grundsätzlichen, thermodynamischen Eigenschaften, die Umfaltung des Proteins mit geringer Wahrscheinlichkeit auch spontan möglich ist.

### **1.3. Das zelluläre Prionprotein und seine pathogene Isoform**

#### **1.3.1. Das zelluläre Prionprotein**

Im Jahre 1984 konnte Stanley Prusiner zusammen mit dem Team von Leroy Hood am California Institute of Technology in Pasadena durch Analysen von aufgereinigtem  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  einen Teil der Aminosäuresequenz vom N-Terminus des Prionproteins bestimmen (Prusiner *et al.*, 1984). Anhand des genetischen Codes wurden Sonden konstruiert, mit denen das Gen des Prionproteins in Hamsterzellen (Oesch *et al.*, 1985) und später auch in Mäusezellen (Chesebro *et al.*, 1985; Lochter *et al.*, 1986) nachgewiesen und kloniert

wurde. Weiterhin zeigte sich, dass das Gen bei Hamstern, Mäusen, Menschen und allen anderen untersuchten Arten nicht in dem aufgereinigtem infektiösen Material, sondern im Genom der Wirtszellen zu finden ist. Mehr noch: es zeigte sich, dass das Prionprotein-Gen die meiste Zeit aktiv ist – was bedeutet, dass auch im gesunden Organismus PrP-mRNA und Prionprotein hergestellt wird (Oesch *et al.*, 1985; Basler *et al.*, 1986).

Beim Menschen befindet sich das Prionprotein-Gen (*PRNP*) auf dem kurzen Arm von Chromosom 20, bei der Maus (*Prnp*) auf der korrespondierenden Region von Chromosom 2. Allen bekannten *Prnp*-Genen ist gemeinsam, dass sie am 5'-Ende ein oder zwei sehr kurze Exons besitzen, die durch ein langes Intron (ca. 10 kb) vom 3'-seitigen Exon getrennt werden. Der offene Leserahmen (ORF) ist dabei bei allen bisher bekannten Prionprotein-Genen innerhalb des 3'-Exons codiert, so dass die Möglichkeit eines alternativen RNA-Spleißens zur Entstehung von PrP<sup>Sc</sup> ausgeschlossen werden kann (Basler *et al.*, 1986; Westaway *et al.*, 1987; Puckett *et al.*, 1991; Gabriel *et al.*, 1992; Bartz *et al.*, 1994; Westaway *et al.*, 1994a; Westaway *et al.*, 1994b; Lee *et al.*, 1998; Horiuchi *et al.*, 1998).

Bei Säugetieren sind bislang die ORFs der *Prnp*-Gene von über 90 Arten aus allen bekannten 18 Ordnungen analysiert worden (Schätzl *et al.*, 1995; Wopfner *et al.*, 1999; van Rheede *et al.*, 2003), wobei phylogenetische Stammbaumanalysen basierend auf der Sequenz des PrP-ORF keine Abweichungen von der taxonomischen Gliederung ergaben, weshalb außergewöhnliche Ereignisse in der Evolution des *Prnp*-Gens in den einzelnen Säugerlinien nicht anzunehmen sind (Wopfner *et al.*, 1999; van Rheede *et al.*, 2003). Auch bei Vögeln (Gabriel *et al.*, 1992), Reptilien (Simonin *et al.*, 2000), Amphibien (Strumbo *et al.*, 2001) und Fischen (Suzuki *et al.*, 2002) konnte ein *Prnp*-Gen nachgewiesen werden und ist daher möglicherweise bei allen Vertebraten vorhanden.

Bei adulten Organismen wird das *Prnp*-Gen in fast allen Geweben exprimiert, wobei das Expressionsniveau abhängig vom untersuchten Gewebe variiert (Manson *et al.*, 1992; Bendheim *et al.*, 1992). Im ZNS, insbesondere in Neuronen und Gliazellen, ist das Expressionsniveau mit ungefähr 50 mRNS-Kopien pro Zelle am höchsten (Kretschmar *et al.*, 1986a; Moser *et al.*, 1995). Die mRNS des *Prnp*-Gens ist bereits während der frühen Phase der Embryogenese im Gehirn nachweisbar (Harris *et al.*, 1993b), wobei der mRNS-Gehalt mit fortschreitender Entwicklung zunimmt und auch im peripheren Nervensystem sowie in nicht-neuronalen Zellpopulationen nachweisbar

ist (Manson *et al.*, 1992). Weiterhin wird das Prionprotein auch in Zellen des Immunsystems exprimiert (Cashman *et al.*, 1990; Dodelet & Cashman, 1998).

Der ORF des *PRNP*-Gens des Menschen codiert für ein Protein mit 253 Aminosäuren. Bei Maus und Hamster sind es 254 Aminosäuren, wobei die cDNS des *PRNP*-Gens von infizierten und nicht-infizierten Individuen identisch sind (Oesch *et al.*, 1985; Chesebro *et al.*, 1985; Basler *et al.*, 1986; Lochter *et al.*, 1986; Kretzschmar *et al.*, 1986b).

Das humane zelluläre Prionprotein, wie auch das Prionprotein aller bisher untersuchten Säugetiere, ist ein extrazelluläres Glykoprotein, welches mit einer Glykosylphosphatidyl-Einheit (GPI-Anker) auf der Zelloberfläche verankert ist und experimentell mittels Phospholipasen (z.B. PIPLC) oder Proteasen (z.B. Trypsin) von der Membran entfernt werden kann (Caughey *et al.*, 1988; Caughey *et al.*, 1989; Borchelt *et al.*, 1990; Caughey & Raymond, 1991; Shyng *et al.*, 1993). Wie viele andere Oberflächenproteine wird PrP zuerst in das rauhe Endoplasmatische Retikulum (ER) synthetisiert, wobei die dazu nötige N-terminale Signalsequenz von 22 Aminosäuren vom primären Translationsprodukt abgespalten wird. Weitere 23 Aminosäuren werden im Zuge der Reifung vom C-Terminus abgetrennt, um die Bindung der Glykosylphosphatidyl-Einheit an das Serin 231 für die Membranverankerung zu ermöglichen (Stahl *et al.*, 1987). Im ER werden an die Asparagin-Reste 181 und 197 des Proteins noch zwei Mannose-haltige Polysaccharide angehängt, welche auf dem Weg zur Zelloberfläche beim Durchlaufen des Golgi-Apparates in komplexe, hybride Zuckerstrukturen umgewandelt werden. Aufgrund einer unvollständigen Glykosylierung während der PrP-Genese kommt es neben der zweifach-glykosylierten auch zur Bildung einer einfach- und einer unglykosylierten Form (Bolton *et al.*, 1985; Haraguchi *et al.*, 1989; Endo *et al.*, 1989). Die drei verschiedenen Glykoformen des Prionproteins umspannen ein Molekulargewicht von ca. 25-35 kDa, wobei die glykosylierten Formen über 50 verschiedene Zucker enthalten (Rudd *et al.*, 1999; Rudd *et al.*, 2001). Die Ausbildung einer Disulfid-Brücke zwischen den Cysteinen 179 und 214 (Turk *et al.*, 1988; Haraguchi *et al.*, 1989) trägt wesentlich zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur bei (Mehlhorn *et al.*, 1996).

Die Prionproteine der Säugetiere sind außerordentlich stark konserviert. Bei einem paarweisen Vergleich der Aminosäuresequenz ist in der Regel mehr als 90 % Sequenzidentität zu verzeichnen (Schätzl *et al.*, 1995), weshalb für die Prionproteine der Säuger eine identische globuläre Proteinstruktur und damit einhergehend auch eine gemeinsame Funktion angenommen werden kann. Im Hinblick auf die Prion-

Hypothese, nach welcher die strukturelle Umwandlung des Prionproteins eine zentrale Rolle in der Pathogenese einnimmt, ist die Bestimmung der drei-dimensionalen Struktur der beiden PrP-Formen von besonderem Interesse. Aus spektroskopischen Messungen ist seit 1993 bekannt, dass sich PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur wesentlich unterscheiden. Während bei PrP<sup>Sc</sup> ein großer Teil des Proteins aus  $\beta$ -Faltblättern besteht, bildet bei PrP<sup>C</sup> die  $\alpha$ -Helix das Hauptelement der Sekundärstruktur (Caughey *et al.*, 1991; Pan *et al.*, 1993).

Da sich die Gewinnung der für eine röntgenkristallographische Strukturermittlung essentiellen hochreinen Einkristalle des zellulären Prionproteins als schwierig erwiesen hat, wurden die meisten Strukturdaten durch die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR, „nuclear magnetic resonance“) an löslichen Proteinen gewonnen. Als entscheidend für die dafür nötige Gewinnung großer Mengen an löslichem Prionprotein erwies sich die Produktion von rekombinantem Prionprotein (rPrP) durch das Bakterium *Escherichia coli*, wobei die Prionproteine in *E. coli* unglykosyliert und ohne GPI-Anker synthetisiert werden (Mehlhorn *et al.*, 1996). In unabhängigen Aufreinigungsansätzen, bei denen einerseits die gesamte Sequenz des reifen Prionproteins (PrP23-231) aus den Einschlusskörperchen rekonstituiert (Hornemann *et al.*, 1997), andererseits die C-terminale Hälfte (PrP121-231) durch das Anhängen einer Signalsequenz in löslicher Form aus dem periplasmatischen Raum isoliert wurde (Hornemann & Glockshuber, 1996), konnten NMR-taugliche Präparate hergestellt werden.

Seitdem sind die NMR-Strukturen von rekombinantem Prionprotein verschiedener Spezies bestimmt worden, wobei sich im Einklang mit dem hohen Grad an Sequenzidentität eine gemeinsame Faltungsstruktur zeigte (Riek *et al.*, 1996; Riek *et al.*, 1997; Donne *et al.*, 1997; James *et al.*, 1997; Riek *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Calzolari *et al.*, 2000; Lopez Garcia *et al.*, 2000; Zahn *et al.*, 2000; Calzolari & Zahn, 2003; Hornemann *et al.*, 2004; Gossert *et al.*, 2005; Calzolari *et al.*, 2005; Lysek *et al.*, 2005), welche der aus der NMR-Analyse gewonnenen Struktur von gereinigtem PrP<sup>C</sup> aus gesundem Kälberhirn entspricht (Hornemann *et al.*, 2004). Obwohl speziesbedingte Konformationsunterschiede zu finden sind, ist die Struktur von PrP<sup>C</sup> allgemein durch einen flexiblen N-Terminus und einem globulären, strukturierten C-terminalen Teil gekennzeichnet. Der strukturierte Teil besteht aus drei  $\alpha$ -Helices und zwei kurzen anti-parallel verlaufenden  $\beta$ -Faltblättern. Beim humanen PrP<sup>C</sup> umspannen die drei  $\alpha$ -Helices

die Aminosäuren 144-154, 173-194 and 200-228 und die  $\beta$ -Faltblattanteile die Aminosäuren 128-131 and 161-164 (Zahn *et al.*, 2000). Der N-Terminus, welcher in der NMR-Analyse flexibel und ungeordnet erscheint, ist durch einen Bereich mit einem hohen Glycin- und Prolin-Anteil gekennzeichnet, welcher die Grundlage für die strukturelle Flexibilität bildet. Glycin und Prolin sind zusammen mit Glutamin-, Tryptophan- und Histidin-Resten in einem wiederkehrenden Oktapeptid-Motiv (PHGGGWGQ) angeordnet. Die Anzahl der Motiv-Wiederholungen kann abhängig von der betrachteten Spezies zwischen zwei und sieben betragen (van Rheede *et al.*, 2003), wobei auch familiäre Fälle der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit beschrieben sind, bei denen die Insertion von Oktapeptid-Motiven die Krankheitsursache darstellt (Owen *et al.*, 1990; Goldfarb *et al.*, 1991; Capellari *et al.*, 1997). Die Oktapeptid-Region von PrP<sup>C</sup> bindet Kupfer mit hoher Affinität (Hornshaw *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1997a; Viles *et al.*, 1999). Die Kupfer-Bindung ist kooperativ und bewirkt eine Konformationsänderung des flexiblen Bereichs (Morante *et al.*, 2004). Im Wesentlichen wird die Kupfer-Assoziation durch die Histidin-Reste der Oktapeptid-Region vermittelt, wobei eventuell auch die Histidine der Codons 96 und 111 an der Kupfer-Bindung beteiligt sind (Aronoff-Spencer *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 2002; Burns *et al.*, 2003).

Trotz zahlreicher Versuchsansätze ist die physiologische Funktion des PrP<sup>C</sup> bislang nicht geklärt. Obwohl PrP<sup>C</sup> während der Embryogenese differentiell exprimiert wird und in adulten Individuen in vielen Geweben, insbesondere im ZNS, zu finden ist (Kretzschmar *et al.*, 1986a; Cashman *et al.*, 1990; Manson *et al.*, 1992; Bendheim *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1993b; Moser *et al.*, 1995; Dodelet & Cashman, 1998), zeigten verschiedene transgene Mauslinien mit einem inaktivierten *Prnp*-Gen (sogenannte PrP-„knock-out“- oder PrP<sup>0/0</sup>-Mäuse) eine normale Entwicklung ohne auffällige Verhaltensstörungen (Bueler *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1994). Alternde Mäuse wiesen eine Demyelinisierung im peripheren Nervensystem auf, mit welcher allerdings keine klinischen Symptome einhergingen (Nishida *et al.*, 1999). In vertiefenden Studien konnten bei PrP<sup>0/0</sup>-Mäusen Veränderungen in der Reizweiterleitung von Nervenzellen (Collinge *et al.*, 1994; Whittington *et al.*, 1995; Colling *et al.*, 1996; Herms *et al.*, 2001) und dem zirkadianen Aktivitäts- und Schlafrythmus (Tobler *et al.*, 1996; Tobler *et al.*, 1997) gemessen werden.

Bei einer weiteren PrP<sup>0/0</sup>-Mauslinie konnte eine sehr stark ausgeprägte Ataxie und der Verlust von Purkinje-Zellen im Kleinhirn festgestellt werden (Sakaguchi *et al.*, 1996).



Dieser charakteristische Phänotyp wurde jedoch in späteren Analysen auf die „knock-out“-Strategie zurückgeführt, durch welche das normalerweise nicht im Gehirn exprimierte PrP-Homolog Doppel (Dpl) unter die Kontrolle des *Prnp*-Promotors gelangte (Moore *et al.*, 1999). Dpl ist ein N-glykosyliertes, GPI-verankertes Protein (Silverman *et al.*, 2000), welches aufgrund der 25 %-igen Sequenzidentität eine ähnliche globuläre Domäne wie PrP<sup>C</sup> aufweist (Lu *et al.*, 2000; Mo *et al.*, 2001) und in adulten Mäusen in vielen Geweben, nicht jedoch im Gehirn (Moore *et al.*, 1999) exprimiert wird. Der auffällige Phänotyp dieser Mauslinie wurde daher nicht auf die Abwesenheit von PrP<sup>C</sup>, sondern auf das veränderte Dpl-Expressionsmuster zurückgeführt.

Die Fähigkeit des Prionproteins zur Kupferbindung (Brown *et al.*, 1997a), die Lokalisation von PrP<sup>C</sup> in der präsynaptischen Membran (Herms *et al.*, 1999) sowie die Stimulation der PrP<sup>C</sup>-Endozytose durch Zugabe von Kupfer in das Kulturmedium neuronaler Zellen (Pauly & Harris, 1998) deuten auf eine Rolle in der Kupfer-Homöostase an der Synapse hin (Kretzschmar *et al.*, 2000). Weiterhin zeigen kultivierte neuronale Zellen von PrP<sup>0/0</sup>-Mäusen eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress, was mit einer verringerten Superoxid-Dismutase-Aktivität assoziiert zu sein scheint (Brown *et al.*, 1997b; Brown & Besinger, 1998). Im Skelett- und Herzmuskel sowie in der Leber von PrP<sup>0/0</sup>-Mäusen lässt sich eine gesteigerte Oxidation von Proteinen und Lipiden nachweisen (Klamt *et al.*, 2001), weshalb PrP<sup>C</sup> auch im Hinblick einer möglichen anti-oxidativen Wirkung diskutiert wird.

Mittlerweile konnte eine Reihe möglicher Interaktionspartner von PrP<sup>C</sup> identifiziert werden (Gauczynski *et al.*, 2001a; Lasmezas, 2003). Dazu zählt unter anderem der Laminin-Rezeptor (LR) bzw. dessen Vorstufe (LRP, „laminin receptor precursor“) (Rieger *et al.*, 1997; Gauczynski *et al.*, 2001b) und Heparansulfat, einem Bestandteil der in der extrazellulären Matrix vorkommenden Glykosaminoglykane (Gabizon *et al.*, 1993; Caughey *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 2002). Des Weiteren konnte die Interaktion von PrP<sup>C</sup> und Laminin gezeigt werden, welche in primären Neuronen das Auswachsen von neuronalen Fortsätzen stimulieren kann (Graner *et al.*, 2000a; Graner *et al.*, 2000b). Zusammen mit der Lokalisation von PrP<sup>C</sup> auf der Zelloberfläche deuten diese Ergebnisse auf eine Rolle des Prionproteins für die Zelladhäsion, Zellmigration und Differenzierung hin.

Neu synthetisiertes PrP<sup>C</sup> gelangt vom Beginn der Synthese in weniger als zwei Stunden an die Oberfläche der Zelle, wo es über den GPI-Anker hauptsächlich in Cholesterol-

reichen Membran-Domänen, sogenannten „lipid rafts“ (Lucero & Robbins, 2004), zu finden ist (Vey *et al.*, 1996). Mit einer Halbwertszeit von fünf Stunden wird PrP<sup>C</sup> jedoch relativ schnell wieder durch Endozytose über die endosomalen und lysosomalen Kompartimente der Zelle abgebaut (Borchelt *et al.*, 1990). Ein Teil der synthetisierten PrP<sup>C</sup>-Moleküle unterliegt dabei einer definierten proteolytischen Spaltung (Pan *et al.*, 1992; Harris *et al.*, 1993a; Jimenez-Huete *et al.*, 1998). Die Spaltstelle konnte durch N-terminale Sequenzierung des C-terminalen Spaltproduktes auf die Aminosäuren 110-112 eingegrenzt werden (Chen *et al.*, 1995). Über den zellulären Ort dieser Spaltung sowie der involvierten Protease gibt es jedoch noch keine gesicherten Erkenntnisse. Neben ADAM10 und TACE (Vincent *et al.*, 2001) wird auch Plasmin (Praus *et al.*, 2003) als mögliche Protease diskutiert. Veröffentlichungen über eine erhöhte Kupfer-abhängige Spaltung bei oxidativem Stress (McMahon *et al.*, 2001) und der Aktivierung von Plasminogen durch das Plasmin-generierte N-terminale Spaltprodukt von rPrP (Praus *et al.*, 2003) deuten darauf hin, dass der Spaltung des zellulären Prionproteins eine physiologische Bedeutung zukommt und nicht nur einen Teil des grundsätzlichen PrP<sup>C</sup>-Katabolismus darstellt.

### **1.3.2. Die pathogene Isoform des Prionproteins**

Im Gegensatz zur physiologischen Form des Prionproteins (PrP<sup>C</sup>), welches in gesunden Individuen in fast allen Geweben exprimiert wird (Manson *et al.*, 1992; Bendheim *et al.*, 1992), ist die Scrapie-assoziierte Isoform (PrP<sup>Sc</sup>) hauptsächlich im Gehirn und in bestimmten lymphoretikulären Geweben, wie z.B. der Milz, nachweisbar. Im geringeren Maß konnte PrP<sup>Sc</sup> jedoch auch im Skelettmuskel von transgenen Mäusen (Bosque *et al.*, 2002) und Hamstern (Thomzig *et al.*, 2003) nachgewiesen werden. Bei Hamstern war dies nach oraler Infektion und schon vor dem Einsetzen klinischer Symptome möglich (Thomzig *et al.*, 2004a). Bei Schafen und Ziegen konnte PrP<sup>Sc</sup> in geringen Mengen auch im Amnion (Pattison *et al.*, 1972; Pattison *et al.*, 1974), in der Amnionflüssigkeit und der Plazenta detektiert werden. Das Auftreten der pathogenen Isoform in diesen Geweben wird als Hauptursache für die vertikale und horizontale Übertragung von Scrapie innerhalb dieser Spezies gesehen (Brotherston *et al.*, 1968; Dickinson *et al.*, 1974). Außer für die chronisch zehrende Krankheit der Hirschartigen (CWD) (Miller & Williams, 2003) konnten vertikale und horizontale Übertragungen bei anderen Säugetieren nicht beobachtet werden.

Beide PrP-Formen, PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>, weisen die gleiche, vom *Prnp*-Gen des Wirtes codierte Aminosäureabfolge auf (Oesch *et al.*, 1985; Basler *et al.*, 1986), worin vermutlich der Grund liegt, weshalb der Erreger nicht immunogen wirkt und daher während des Krankheitsverlaufs weder eine entzündliche noch eine immunologische Reaktion zu beobachten ist.

Auch Unterschiede aufgrund von posttranslationellen, chemischen Modifikationen konnten zwischen den beiden Isoformen nicht festgestellt werden (Stahl *et al.*, 1993). Die Aminosäuresequenz, der GPI-Anker und die Glykosylierungen werden daher bei beiden Formen als identisch angenommen, wobei die Zusammensetzung der Zuckerketten an Asn181 und Asn197 eine gewisse Heterogenität ausweist, weshalb eine vergleichende Analyse nur innerhalb dieser Variabilität möglich ist (Haraguchi *et al.*, 1989; Endo *et al.*, 1989; Stahl *et al.*, 1993; Stimson *et al.*, 1999; Rudd *et al.*, 1999).

Keh-Ming Pan konnte im Jahre 1993 durch Strukturanalysen mittels Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie zeigen, dass der relevante Unterschied zwischen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> in der Proteinkonformation begründet ist (Pan *et al.*, 1993). PrP<sup>Sc</sup> ist im Gegensatz zu PrP<sup>C</sup>, welches zu 40 % aus  $\alpha$ -Helices besteht und einen sehr geringen Anteil an  $\beta$ -Faltblättern aufweist, durch einen 50 %-igen Anteil an  $\beta$ -Faltblättern und einem 20 %-igen Anteil an  $\alpha$ -Helices charakterisiert (Caughey *et al.*, 1991; Pan *et al.*, 1993; Safar *et al.*, 1993a).

PrP<sup>Sc</sup> bildet unlösliche Aggregate, welche in unterschiedlichen Ablagerungsmustern in immunhistochemischen Analysen des Gehirns zu beobachten sind (Bendheim *et al.*, 1984; Kitamoto *et al.*, 1986). Aufreinigungen von PrP<sup>Sc</sup> sind hochinfektiös (Prusiner *et al.*, 1983; Diringer *et al.*, 1983; Gabizon *et al.*, 1988) und lassen sich im Elektronenmikroskop als geordnete Proteinaggregate, sogenannte Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) oder „prion rods“ darstellen (Merz *et al.*, 1981; Prusiner *et al.*, 1982; Bolton *et al.*, 1982; Prusiner *et al.*, 1983). Die Existenz von Nukleinsäuren in angereicherten PrP<sup>Sc</sup>-Präparationen konnte für Moleküle mit einer Größe von über 80 nt pro Infektionseinheit ausgeschlossen werden (Meyer *et al.*, 1991; Kellings *et al.*, 1992; Kellings *et al.*, 1993; Riesner *et al.*, 1993).

Die strukturellen Unterschiede von PrP<sup>Sc</sup> im Vergleich zu PrP<sup>C</sup> bedingen eine Reihe von biochemischen Besonderheiten. Dazu zählt die ungewöhnliche Resistenz gegenüber der Inaktivierung durch Chemikalien (Prusiner *et al.*, 1993), gegenüber einer Hitzedenaturierung (Safar *et al.*, 1993b) und gegenüber dem Abbau durch Proteasen

(McKinley *et al.*, 1983). Selbst eine Behandlung mit der proteolytisch besonders aktiven Proteinase K (PK) bewirkt nur einen partiellen Abbau. Ein Umstand, der für die differentielle Detektion von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> verwendet werden kann. Durch die Einwirkung der PK wird ein etwa 68 Aminosäuren umfassendes N-terminales Segment von PrP<sup>Sc</sup> abgespalten, wodurch ein verändertes Migrationsverhalten bei der gelelektrophoretischen Auftrennung hervorgerufen wird. PrP<sup>C</sup> hingegen wird unter denselben Bedingungen durch die PK innerhalb kurzer Zeit abgebaut (McKinley *et al.*, 1983; Barry *et al.*, 1986). Da PK-verdautes PrP<sup>Sc</sup> Infektiösität aufweist (McKinley *et al.*, 1983) und transgene Mäuse, die ein äquivalent verkürztes Prionprotein exprimieren, mit PK-behandeltem PrP<sup>Sc</sup> infiziert werden können und die Krankheit von diesen Tieren weiter übertragbar ist, kann davon ausgegangen werden, dass die volle Länge des Prionproteins für den Replikationszyklus von PrP<sup>Sc</sup> nicht zwingend benötigt wird (Fischer *et al.*, 1996).

Aufgrund der Eigenschaft von PrP<sup>Sc</sup> unlösliche Aggregate zu bilden, konnten klassische Techniken zur Strukturanalyse, wie NMR oder Röntgenbeugung, bei der pathogenen Isoform des Prionproteins nicht angewendet werden. Systematische Studien mit dem Ziel PrP<sup>Sc</sup> in Lösung zu bringen, wurden überwiegend mit Guanidinium-Hydrochlorid (GndHCl) (Prusiner *et al.*, 1993; Kocisko *et al.*, 1994) sowie Sarkosyl und Natriumdodecylsulfat (SDS) (Riesner *et al.*, 1996) durchgeführt, wobei die Auflösung der PrP<sup>Sc</sup>-Aggregate in der Regel mit einer Reduktion des  $\beta$ -Faltblattgehaltes einherging. Die Reduktion des  $\beta$ -Faltblattgehaltes von PrP<sup>Sc</sup> führt jedoch zu einer Verringerung der Infektiösität, woraus die Schlussfolgerung gezogen werden kann, dass die Konversion von  $\alpha$ -Helix zu  $\beta$ -Faltblatt das fundamentale Ereignis in der PrP<sup>Sc</sup>-Bildung als auch in der Replikation der Prion-Infektiösität darstellt (Gasset *et al.*, 1993; Riesner *et al.*, 1996).

Ein älteres Tertiärstrukturmodell von PrP<sup>Sc</sup>, welches basierend auf einer PrP<sup>C</sup>-Struktur mit vier  $\alpha$ -Helices computergestützt entworfen wurde (Huang *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1995), konnte mittlerweile durch ein neueres Modell ersetzt werden, welches auf elektronenmikroskopischen Analysen von Hintergrundfärbungen („negative staining“) gereinigter und PK-verdauter PrP<sup>Sc</sup>-Präparationen basiert (Wille *et al.*, 2002). Dieses neue Strukturmodell legt eine parallele links-gewundene  $\beta$ -Helix als strukturelles Kernmotiv der missgefalteten Form des Prionproteins zugrunde (Wille *et al.*, 2002). In weiterführenden Analysen mit einer verbesserten Auflösung zeigte sich, dass Modelle

aus übereinandergestapelten Schichten von in Trimeren angeordneten PrP<sup>Sc</sup>-Molekülen mit linksgewundenen  $\beta$ -Helices die beste Anpassung an die gewonnenen Bilddaten darstellten (Govaerts *et al.*, 2004). Auch in computergestützten „molecular dynamics“-Simulationen hat sich die parallele linksgewundene  $\beta$ -Helix als ein stabiles Strukturmodell für die pathogenen Isoform des Prionproteins erwiesen (Stork *et al.*, 2005). Da bei einer Reihe weiterer neurodegenerativer Erkrankungen, wie z.B. beim Morbus Alzheimer und Chorea Huntington, die  $\beta$ -Helix als zentrales Strukturelement der pathogenen Proteinablagerungen diskutiert wird, könnte die Ausbildung von  $\beta$ -helicalen Strukturen bei der Amyloidbildung ein grundlegendes Prinzip darstellen (Sunde *et al.*, 1997; Perutz *et al.*, 2002; Stork *et al.*, 2005).

## **1.4. Speziesbarriere und Erregerstämme**

### **1.4.1. Speziesbarriere**

Angesichts der BSE-Epidemie in den 80er-Jahren und dem damit verbunden Auftreten der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit ist die Erforschung der Übertragung von TSE-Erregern über die Artengrenzen hinweg von besonderem Interesse.

Wie auch bei konventionellen Krankheitserregern ist bei der Übertragung von TSE-Erregern von einer Tierart auf eine andere oftmals eine deutliche Speziesbarriere erkennbar. Diese erstmalig von Pattison in den 60er-Jahren gemachte Beobachtung (Pattison & Millson, 1960; Pattison, 1966) ist in der Regel durch verlängerte, stärker variierende Inkubationszeiten und einer verringerten Anzahl an erfolgreich infizierten Individuen bei der Erstübertragung gekennzeichnet. Wird das infektiöse Agens in der Empfängerart weiter passagiert, reduziert sich gewöhnlich die Inkubationszeit auf ein konstantes Niveau, wobei das Ausmaß der Inkubationszeitverkürzung ein Maß für die Höhe der Speziesbarriere darstellt. Weiterhin lässt sich die Höhe der Speziesbarriere auch durch vergleichende LD<sub>50</sub>-Titrations-Analysen ermitteln. Dabei werden verschiedene Verdünnungen des infektiösen Agens in den Spenderorganismus und die neue Empfängerart inokuliert und die Verdünnungen verglichen, bei denen 50 % der Tiere erkranken.

Zeigen sich nach der Erstinfektion während der natürlichen Lebensdauer einer Spezies keine klinischen Symptome, wird die entsprechende Empfängerart als „resistent“ gegenüber der untersuchten TSE-Form erachtet. So ist beispielsweise der BSE-Erreger vom Rind zwar auf die Maus, nicht aber auf den Hamster übertragbar (Dawson *et al.*, 1991; Priola, 1999; Thomzig *et al.*, 2004b). Allerdings konnte unter anderem bei der Infektion von Mäusen mit Hamster-Prionen die Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> ohne die Ausbildung von klinischen Symptomen nachgewiesen werden (Hill *et al.*, 2000). Das Auftreten solcher subklinischer Infektionen ruft gerade im Hinblick auf die Verbreitung humaner Prionen epidemiologische Bedenken hervor (Hill & Collinge, 2003).

Durch die experimentelle Infektion von transgenen Mäusen wurde gezeigt, dass die Höhe der Speziesbarriere wesentlich von der Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz des Prionproteins der Empfängerspezies und der Sequenz des verwendeten Prionstammes, also von der Sequenzhomologie zwischen dem eindringenden PrP<sup>Sc</sup> und dem PrP<sup>C</sup> der infizierten Spezies, beeinflusst wird (Scott *et al.*, 1989; Prusiner *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1993). Sind die Prionproteine sehr unterschiedlich, wie z.B. zwischen dem Syrischen Goldhamster und der Maus, ist die Speziesbarriere relativ stark ausgeprägt. Wildtyp-Mäuse lassen sich nur schwer mit Hamster-Prionen und Hamster nur schwer mit Maus-Prionen infizieren. Im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen sind jedoch transgene Mäuse, die anstelle des *Prnp*-Gens der Maus das Gen des Syrischen Goldhamsters exprimieren, mit PrP<sup>Sc</sup> von Hamstern infizierbar (Weissmann *et al.*, 1994). Wenn transgene Mäuse sowohl Hamster-PrP<sup>C</sup> als auch ihr eigenes PrP<sup>C</sup> herstellen, lassen sie sich sowohl mit PrP<sup>Sc</sup> vom Hamster als auch mit PrP<sup>Sc</sup> von der Maus infizieren, wobei das PrP<sup>C</sup> der Maus dabei bevorzugt vom Maus-PrP<sup>Sc</sup> und das PrP<sup>C</sup> vom Hamster bevorzugt von Hamster-PrP<sup>Sc</sup> in die pathogene Isoform überführt wird (Prusiner *et al.*, 1990).

Dass die Speziesbarriere jedoch ausschließlich von der Homologie der Aminosäuresequenzen von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> bestimmt wird, wurde durch eine Beobachtung an transgenen Mäusen in Frage gestellt, welche sowohl das endogene Maus-Prionprotein als auch das humane Prionprotein exprimieren (Telling *et al.*, 1994). Trotz einer Überexpression des humanen Prionproteins zeigten sich die Mäuse zum größten Teil resistent gegenüber einer Infektion mit humanem PrP<sup>Sc</sup> aus CJD- und GSS-Patienten. Erst durch die Einführung eines Chimären-Transgens anstelle des humanen Prionprotein-Gens, welches im zentralen Teil aus der humanen und an den beiden Enden aus der murinen PrP-Sequenz bestand, wurde die Empfänglichkeit der Mäuse für humane Prionen deutlich erhöht. Durch weiterführende Infektionsstudien wurde

weiterhin gezeigt, dass zwar transgene Mäuse, welche das humane Prionprotein exprimieren, jedoch nicht über ein endogenes Maus-Prionprotein verfügen, gegenüber humanen Prionen empfindlich sind, sich jedoch transgene Mäuse, welche das chimäre Prionprotein exprimieren, am empfindlichsten gegenüber einer Infektion mit humanen Prionen zeigten (Telling *et al.*, 1995).

Aus diesen Ergebnissen wurde für die Umfaltung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> die Notwendigkeit eines zusätzlichen Wirtsfaktors („Protein X“) postuliert (Telling *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997). Es wird vermutet, dass es sich beim „Protein X“ um ein Chaperon handelt, welches den Umfaltungsprozess unterstützt, wofür eine Interaktion mit dem C-Terminus des PrP<sup>C</sup> notwendig ist (Telling *et al.*, 1994; Telling *et al.*, 1995). Aufgrund der höheren Bindungsaffinität des murinen „Protein X“ zum PrP<sup>C</sup> der Maus steht in transgenen Mäusen die sowohl humanes als auch murines PrP<sup>C</sup> exprimieren „Protein X“ für die Umfaltung des humanen PrP<sup>C</sup> nur unzureichend zur Verfügung, wodurch die Effizienz der Umwandlung des humanen PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> verringert wird (Telling *et al.*, 1995). Als potentielle Bindungsstelle für das „Protein X“ wurden in Kartierungsexperimenten die Aminosäuren 168, 172, 215 und 219 postuliert (Kaneko *et al.*, 1997; Zulianello *et al.*, 2000), welche im dreidimensionalen NMR-Modell eng benachbart sind und ein Bindungsepitop darstellen könnten (Scott *et al.*, 1997).

Da sich jedoch in einer parallelen Studie transgene Mäuse, welche auch humanes und murines PrP<sup>C</sup> exprimieren, als empfindlich gegenüber humanen Prionen erwiesen haben (Collinge *et al.*, 1995), ist die Existenz und Bedeutung des bisher nicht identifizierten „Protein X“ für den Umfaltungsprozess umstritten. Hinzu kommt, dass die beobachtete Verlängerung der Inkubationszeit bei transgenen Mäusen, die neben dem Transgen noch das endogene Prionprotein-Gen exprimieren, nicht nur durch den Einfluss eines zusätzlichen Wirtsfaktors erklärbar ist, sondern auch durch die Blockierung der wachsenden Enden der aus humanem PrP<sup>Sc</sup> bestehenden Amyloide durch das endogene Maus-PrP<sup>C</sup> hervorgerufen werden kann (Masel & Jansen, 2000).

#### **1.4.2. Erregerstämme**

Die Prion-Hypothese proklamiert eine gänzlich neu definierte Klasse von Infektionserregern, deren Hauptbestandteil die pathogene Isoform des Prionproteins darstellt. Obwohl diese Hypothese durch die erfolgreiche Erzeugung von Infektivität *in vitro* (Legname *et al.*, 2004; Castilla *et al.*, 2005) erneut gefestigt wurde, bleibt die

Existenz unterschiedlicher Erregerstämme und damit die Frage, wie ein und dasselbe Protein im gleichen Wirt verschiedene Krankheitssymptome hervorrufen kann, eine Herausforderung für die Prionforschung.

Bereits Anfang der 60er-Jahre demonstrierten Pattison und Millson, dass die Infektion von Ziegen mit Schaf-Scrapie deutlich unterschiedliche Symptome hervorrufen kann (Pattison & Millson, 1960; Pattison & Millson, 1961). Ein Teil der inokulierten Tiere zeigte eine schläfrige Symptomatik („drowsy“-Syndrom) wohingegen der andere Teil eine sich durch verstärktes Kratzen auszeichnende Verhaltensstörung („scratching“-Syndrom) aufwies. Da sich die unterschiedlichen Symptomatiken auch bei erneuter Passagierung zeigten, schloss man auf die Existenz von zwei verschiedenen Erregerstämmen (Pattison, 1966). Eine deutlich unterscheidbare klinische Symptomatik verursachen auch zwei aus Nerzen isolierte TME-Stämme nach Übertragung auf Hamster (Bessen & Marsh, 1992a; Bessen & Marsh, 1992b; Bessen & Marsh, 1994). Während ein Stamm zu einer Übererregung und zerebellären Ataxie führt (HY, Hyper), zeichnet sich der andere Stamm (DY, Drowsy) durch Lethargie und Ataxie aus.

Erregerstämme unterscheiden sich nicht nur in ihrer Symptomatik, sondern auch hinsichtlich der histopathologischen Läsionsprofile im Gehirn, der PK-Resistenz des PrP<sup>Sc</sup>, des Glykosylierungsmusters der pathogenen PrP-Isoform und der Resistenz gegenüber physikalischen und chemischen Inaktivierungsverfahren (Dickinson & Meikle, 1971; Kimberlin *et al.*, 1983; Carp *et al.*, 1984; Kimberlin *et al.*, 1986; Bruce & Dickinson, 1987; Kimberlin *et al.*, 1989; Kitamoto *et al.*, 1990; Bruce & Fraser, 1991; DeArmond *et al.*, 1993). Dass dabei Erregerstamm und Speziesbarriere zusammenhängende Phänomene darstellen, zeigt die unterschiedliche Übertragbarkeit von verschiedenen Erregerstämmen auf ein und denselben Wirt. So lassen sich unterschiedliche Erregerstämme der Maus mit zum Teil sehr unterschiedlichen Inkubationszeiten auf Syrische Goldhamster übertragen (Kimberlin *et al.*, 1989) und auch für verschiedene Erregerstämme vom Hamster konnten bei der Infektion von transgenen Mäusen unterschiedliche Speziesbarrieren beobachtet werden (Peretz *et al.*, 2002).

Unterschiedliche Eigenschaften von Erregerstämmen lassen sich auch bei den TSE-Erkrankungen des Menschen finden. Durch Infektion von genetisch identischen, transgenen Mäusen mit verschiedenen humanen Prionen wurde gezeigt, dass sich verschiedene humane Erregerstämme auch nach Passagierung in der Maus unterscheiden lassen (Telling *et al.*, 1996). Eine besondere Bedeutung hat die



Unterscheidbarkeit humaner Erregerstämme in der CJD-Diagnostik. Durch einen Vergleich des Molekulargewichtes von PrP<sup>Sc</sup> nach PK-Verdau sowie des quantitativen Verhältnisses der unglykosylierten, einfach- und zweifach-glykosylierten Prionproteine zueinander, wurde mittels Western Blot-Analysen eine Typisierung verschiedener CJD-Formen möglich (Parchi *et al.*, 1996; Parchi *et al.*, 1997; Parchi *et al.*, 1999). Des Weiteren ließ sich durch die vergleichende Typisierung von TSE-Erregern der Zusammenhang zwischen BSE und nvCJD herstellen (Collinge *et al.*, 1996; Bruce *et al.*, 1997).

Da ausgehend von der Prion-Hypothese keine Nukleinsäure für die verschiedenen Stammeigenschaften kodieren kann, wird angenommen, dass die unterschiedlichen Erregerstämme Konformationsisomere darstellen (Bessen & Marsh, 1994; Bessen *et al.*, 1995). Dies konnte anhand eines konformationsabhängigen Immunoassays für acht Prion-Stämme gezeigt werden (Safar *et al.*, 1998). Nach diesem Erklärungsmodell ist es denkbar, dass ein spezifischer PrP<sup>Sc</sup>-Konformationstyp äußerst wirksam PrP<sup>C</sup> in die pathogene Isoform überführen kann und damit zu einer besonders kurzen Inkubationszeit führt, wohingegen die Konversion durch einen anderen Konformationstyp weniger effizient erfolgt und daher mit einer verlängerten Inkubationszeit assoziiert ist. Ähnlich könnten verschiedene PrP<sup>Sc</sup>-Konformationstypen bevorzugt jeweils andere Hirnregionen befallen, wodurch sich unterschiedliche Läsionsprofile und Symptome erklären ließen.

### **1.5. Interaktion, Umfaltung und die Rolle der Primärsequenz**

Neben der Übereinstimmung in der Aminosäurenabfolge von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> ist auch die Konformation des PrP<sup>Sc</sup>, also die strukturelle Eigenschaft des Erregerstammes, eine wichtige Determinante für die Höhe der Speziesbarriere bei der Übertragung von Prionen zwischen verschiedenen Arten (Safar *et al.*, 1998). Die Umfaltung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> erfordert vermutlich eine direkte Wechselwirkung zwischen den beiden Isoformen, wobei der zelluläre Ort dieser Interaktion bislang noch nicht zweifelsfrei identifiziert wurde. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Umfaltung erst stattfindet, nachdem PrP<sup>C</sup> die Plasmamembran erreicht hat (Caughey & Raymond, 1991; Borchelt *et al.*, 1992; Taraboulos *et al.*, 1992), wobei die Glykosylierung für die Umfaltung nicht erforderlich ist (Taraboulos *et al.*, 1990a). Durch elektronenmikroskopische Studien an Neuroblastomazellen und Hirngewebe konnte

weiterhin die Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> in den „späten“ Endosomen und Lysosomen nachgewiesen werden (McKinley *et al.*, 1991; Arnold *et al.*, 1995). Unterstützt durch die Ergebnisse aus Arbeiten mit Inhibitoren verschiedener Zellkompartimente konnte der Ort der PrP<sup>Sc</sup>-Bildung auf die Zelloberfläche bzw. auf „frühe“ Endosomen eingegrenzt werden (Taraboulos *et al.*, 1990b; Caughey & Raymond, 1991; Taraboulos *et al.*, 1992). Eine Absenkung des Cholesterol-Spiegels in Zellkulturen inhibiert die Umfaltung von PrP<sup>C</sup> in die pathogene Isoform (Taraboulos *et al.*, 1995). Deshalb ist anzunehmen, dass die PrP<sup>Sc</sup>-Bildung im Wesentlichen an der Zellmembran stattfindet, da PrP<sup>C</sup> auf der Zelloberfläche in Cholesterol-reichen Membran-Domänen zu finden ist (Vey *et al.*, 1996), welche durch die Verringerung des Cholesterol-Spiegels zerstört werden und dadurch das für die Umfaltung nötige biochemische Millieu verloren zu gehen scheint (Taraboulos *et al.*, 1995).

Der Umfaltungprozess von PrP<sup>C</sup> in die Protease-resistente Isoform kann außerhalb des Organismus oder einer Zelle in sogenannten *in vitro* Konversionsreaktionen nachgestellt werden, wodurch sich die Umfaltung und Amyloidbildung unter kontrollierten Bedingungen untersuchen lässt (Kocisko *et al.*, 1994; Post *et al.*, 1998; Vorberg *et al.*, 1999; Saborio *et al.*, 1999; Saborio *et al.*, 2001; Baskakov *et al.*, 2002; Kirby *et al.*, 2003; Lucassen *et al.*, 2003). Byron Caughey und seine Kollegen versuchten dies, indem sie radioaktiv markiertes PrP<sup>C</sup> aus Zellkulturen zusammen mit gereinigtem PrP<sup>Sc</sup> aus infizierten Hirnen inkubierten (Kocisko *et al.*, 1994). Tatsächlich konnte durch dieses Verfahren die Umwandlung des radioaktiv markierten PrP<sup>C</sup> in eine PK-resistente Isoform (PrPres) erreicht und anhand der Konversionseffizienz die Rolle der Aminosäuresequenz für die untersuchten Speziesbarrieren beurteilt werden (Kocisko *et al.*, 1995; Raymond *et al.*, 1997). Obwohl bei diesen *in vitro* Konversionreaktionen auch Erregerstamm-Spezifitäten nachvollziehbar waren (Bessen *et al.*, 1995; Mulcahy & Bessen, 2004), konnte bisher für das generierte PrPres keine Infektiösität nachgewiesen werden (Hill *et al.*, 1999).

Mit einem anderen Konversionsverfahren ausgehend von aufgereinigtem PrP<sup>Sc</sup>, dessen  $\beta$ -Faltblattstruktur durch Aufkochen in 0,2 % Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgelöst wurde, konnte durch einfaches Herausverdünnen des SDS die Aggregatbildung mit partieller PK-Resistenz *in vitro* wieder induziert werden (Riesner *et al.*, 1996; Post *et al.*, 1998). Durch dieses Verfahren konnte auch  $\alpha$ -helicales, von *E. coli* erzeugtes rekombinantes Prionprotein (rPrP) in Aggregate mit  $\beta$ -Faltblattstruktur und PK-

Resistenz überführt werden (Post *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 2001). Obwohl auch mit dieser Methode PK-resistentes Prionprotein erzeugt werden kann, konnte für die gewonnenen PrP-Aggregate bisher keine Infektiösität nachgewiesen werden. In Kombination mit der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) (Eigen & Rigler, 1994), bei der über die Fluktuation der Fluoreszenzintensität in einem Volumen von ca. einem Femtoliter, das durch einen fokussierten Laserstrahl erzeugt wird, Konzentrationsschwankungen von fluoreszenz-markierten rPrP-Molekülen ausgewertet werden, ist jedoch eine detaillierte Analyse der Aggregationskinetik und der beeinflussenden Faktoren möglich (Post *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 2001; Giese *et al.*, 2004; Levin *et al.*, 2005).

Mit Hilfe eines weiteren Aggregationsverfahrens, bei welchem die Ausbildung einer  $\beta$ -Faltblattstruktur und die damit einhergehende PrP-Multimerisierung durch Inkubation von bakteriell hergestelltem PrP in einem Puffer mit hohem Harnstoff-Gehalt und niedrigem pH-Wert induziert wird, konnte die Erzeugung von Infektiösität *in vitro* demonstriert werden (Baskakov *et al.*, 2002; Legname *et al.*, 2004). Die durch dieses Verfahren, mit welchem auch eine spezies-spezifische Aggregationsinduktion („Seeding“) gezeigt werden konnte (Baskakov *et al.*, 2004), erzeugten Aggregate, wurden transgenen Mäusen inokuliert, welche die für TSE typischen neuropathologischen Veränderungen im Gehirn und PK-resistentes Prionprotein entwickelten. Mit Hirnhomogenat dieser infizierten Mäuse konnte wiederum die erfolgreiche Infektion von Wildtyp-Mäusen demonstriert werden. Obwohl diese Art der *in vitro* Konversion auch mit Vollängen-rPrP möglich ist (Bocharova *et al.*, 2005), wurde bei den erfolgreichen Infektionsversuchen rPrP mit einer N-terminalen Deletion verwendet. Auch die inokulierten transgenen Mäuse wiesen diese Deletion im Prionprotein auf (Legname *et al.*, 2004). Diese artifiziellen Bedingungen sowie der bei den Experimenten erzeugte geringe infektiöse Titer bedürfen einer weiteren Klärung zur Bestätigung der Prion-Hypothese.

Ein weiteres Konversionssystem ist die sogenannte „Protein Misfolding Cyclic Amplification“-Reaktion (PMCA) (Saborio *et al.*, 2001). Bei dieser besonders für Hamster-Prionen effizienten Amplifikationstechnik wird PrP<sup>Sc</sup>-haltiges Hirnhomogenat mit Hirnhomogenat gesunder Tiere verdünnt und die Umfaltung des PrP<sup>C</sup> in die PK-resistente Isoform durch eine zyklische Wiederholung von Inkubations- und Ultraschall-Behandlungsschritten beschleunigt. Aufgrund der hohen Sensitivität konnte mit dieser

Technik die Detektion von PK-resistentem Prionprotein im präklinischen Stadium beim Rind und Hamster gezeigt werden (Soto *et al.*, 2005). Mit einer abgewandelten Form dieser Methode, der sogenannten seriellen PMCA (sPMCA), bei welcher der Reaktionsansatz und damit die ursprünglich eingesetzte PrP<sup>Sc</sup>-Menge seriell um ein Vielfaches mit Hirnhomogenat von uninfizierten Individuen verdünnt wird, konnte die Fähigkeit von PrP<sup>Sc</sup> zur autokatalytische Vermehrung der PK-resistenten Form demonstriert werden (Bieschke *et al.*, 2004). Des Weiteren wurde durch die Inokulation von Reaktionsprodukten aus der sPMCA in Hamster die Erzeugung von Infektiösität *in vitro* dargestellt, wobei der infektiöse Titer der inokulierten sPMCA-Proben deutlich geringer ausfiel als der infektiöse Titer von entsprechenden Kontroll-Proben (Castilla *et al.*, 2005).

## **1.6. Speziesbarrierenanalytik bei der Rötelmaus**

In der Regel ist bei der Übertragung von TSE-Erregern von einer Tierart auf eine andere eine deutliche Speziesbarriere erkennbar (Pattison & Millson, 1960; Pattison, 1966), deren Höhe sich an dem Grad der Inkubationszeitverkürzung bei der Passagierung innerhalb der neuen Spezies messen lässt (siehe 1.4.1.). Die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz des Prionproteins der Empfängerspezies und der Sequenz des inokulierten Prionstammes ist dabei eine wichtige Determinante (Scott *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1993; Schätzl *et al.*, 1995; Prusiner & Scott, 1997). Frühe Inokulationsversuche von Chandler und Turfrey an wilden Nagerspezies (Chandler, 1971; Chandler & Turfrey, 1972) zeigten jedoch, dass Erdmäuse (*Microtus agrestis*) im Vergleich zu Hausmäusen (*Mus musculus*) nach Innokulation mit Scrapie eine weitaus kürzere Inkubationszeit aufwiesen, obwohl sich die Aminosäuresequenz des Prionproteins der Erdmäuse nur an wenigen Aminosäuren von der Sequenz der Maus unterscheidet. Um dieser Besonderheit nachzugehen, wurden umfangreiche Inokulationsversuche an drei wilden Nagerspezies, der Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*), der Erdmaus (*Microtus agrestis*) und der Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) durchgeführt (Cartoni *et al.*, 2005) (Agrimi unveröffentlicht). Dabei wurden die Tiere mit BSE vom Rind, Scrapie vom Schaf und weiteren TSE-Erregerstämmen aus unterschiedlichen Spezies infiziert. Nach Inokulation von BSE konnte bei allen Spezies eine sehr lange Inkubationszeit beobachtet werden, wobei sich Rötelmäuse als resistent gegenüber BSE erwiesen. Nach Inokulation von Scrapie aus Schafen oder Ziegen

zeigten insbesondere Rötelmäuse, aber auch Erdmäuse, im Vergleich zu Wald- und Hausmäusen weitaus kürzere Inkubationszeiten und einen höheren Anteil an erfolgreichen infizierten Individuen. Nach Passagierung innerhalb der Spezies wurde eine zusätzliche Reduktion der Inkubationszeiten beobachtet.

Des Weiteren konnte bei Rötelmäusen ein natürlicher Polymorphismus am Codon 109 des Prionproteins (M109I) identifiziert werden, welcher entsprechend einem Polymorphismus an der homologen Position bei Mäusen (Westaway *et al.*, 1987) die Inkubationszeit beeinflusst (Cartoni *et al.*, 2005). An dieser Position heterozygote (M/I) und für Isoleucin homozygote (I/I) Tiere zeigten im Vergleich zu Methionin-homozygoten Kontroll-Tieren eine verlängerte Inkubationszeit nach Infektion mit Schaf-Scrapie.

Die erstaunliche Empfänglichkeit der Rötelmaus gegenüber der Infektion mit TSE-Erregern phylogenetisch entfernter Spezies, insbesondere gegenüber der Inokulation von Schaf-Scrapie, ruft epidemiologische Bedenken hervor. Da Rötelmäuse mit im Freiland kultivierten Schafen dasselbe Habitat teilen (Steen *et al.*, 2005), sind unter anderem in Hinblick auf sporadische Ausbrüche von TSE-Epidemien in Schafherden wilde Nagerspezies als natürliches Reservoir für TSE-Erreger zu diskutieren (Woolhouse *et al.*, 1999).

Neben der Eignung der Rötelmaus als neuer sensitiver Modellorganismus mit sehr kurzen Inkubationszeiten, sowie der Möglichkeit zur differentiellen Stammtypisierung von Schaf-Scrapie und BSE, ist die Rötelmaus auch für die Erforschung von Aspekten der Speziesbarriere, insbesondere bezüglich der Rolle der Primärsequenz, für die Prionenforschung von besonderem Interesse.

## **1.7. Fragestellung**

Durch *in vitro* Konversionsexperimente sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit die molekularen Mechanismen der Prion-Vermehrung näher untersucht und der Versuch unternommen werden, durch die Erzeugung von infektiösen Prionen *in vitro* die Prion-Hypothese zu bestätigen. Weiterhin sollten durch *in vitro* Konversionsexperimente die Grundlage der Erregerstämme und das damit eng verbundenen Phänomen der Speziesbarriere auf molekularer Ebene untersucht werden. Dabei sollte die Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*) als Modell-Organismus dienen, da sie aufgrund der im Vergleich zur Hausmaus (*Mus musculus*) höheren Empfindlichkeit gegenüber einer

Infektion mit Schaf-Scrapie sowie durch die Resistenz gegenüber einer BSE-Infektion von besonderem Interesse ist.

Um die Rolle der Primärsequenz für die Speziesbarrieren der Rötelmaus zu beurteilen, sollte durch den Vergleich der Aminosäuresequenz des Prionproteins der Rötelmaus mit den Sequenzen vom Rind, Schaf, Maus und Hamster Aminosäuren in der Primärsequenz identifiziert werden, die für die charakteristischen Speziesbarrieren der Rötelmaus entscheidend sein könnten. Basierend auf diesen Analysen sollte die Primärsequenz des Prionproteins der Rötelmaus an geeigneten Positionen in Maus-spezifische Aminosäuren umgewandelt und die Wirkung dieser Mutationen mit Hilfe von *in vitro* Konversionsreaktionen beurteilt werden. In einer Vorprüfung sollten dafür verschiedene *in vitro* Konversionsmethoden etabliert und auf ihre Eignung überprüft werden, den Einfluss einzelner Aminosäureaustausche auf die Konversion von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> zu analysieren. Zusätzlich sollte der bei Rötelmäusen vorkommende natürliche Polymorphismus an Codon 109 (M109I), welcher wie ein entsprechender Polymorphismus bei der Maus (Westaway *et al.*, 1987) die Inkubationszeit beeinflusst (Cartoni *et al.*, 2005), durch *in vitro* Konversionsreaktionen untersucht werden.

Da die Prion-Hypothese der Konversion von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> und die damit einhergehenden Aggregatbildung eine direkte Wechselwirkung der PrP-Moleküle impliziert, ist zu vermuten, dass Mutationen in der Aminosäuresequenz eine Veränderung der dafür nötigen Interaktionsflächen bewirken und so die Konversionseffizienz beeinflusst wird. Daher wurde weiterhin der Versuch unternommen, Interaktionsflächen in Aggregaten des Prionproteins genauer zu charakterisieren. Dazu sollten die Aggregate durch kovalente Vernetzung stabilisiert und anschließend ihre biochemischen Eigenschaften untersucht werden. Durch eine massenspektrometrischen Analyse der Vernetzungsprodukte sollte dann der Versuch unternommen werden, definierte molekulare Interaktionsflächen zu kartieren, um zusammen mit den aus der *in vitro* Konversion gewonnenen Erkenntnissen ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der PrP<sup>C</sup> / PrP<sup>Sc</sup> Interaktion und Konversion im Hinblick auf die Rolle der Primärsequenz und Konformation zu erhalten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

##### 2.1.1.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Roth (Karlsruhe), Sarstedt (Nümbrecht) und VWR (Ismaning) bezogen. Die Hersteller spezieller Verbrauchsmaterialien und der verwendeten Geräte sind im laufenden Text angegeben.

##### 2.1.1.2. Chemikalien

Soweit im Text nicht näher angegeben, wurden die verwendeten Chemikalien von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen.

#### 2.1.2. Stämme von *Escherichia coli*

DH5 $\alpha$ : *E. coli* F<sup>-</sup>, endA1, hsdR17(rk<sup>-</sup>, mk<sup>-</sup>), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1,  $\Phi$ 80d, lacZ[ $\Delta$ ]M15 (Hanahan, 1983)

BL21(DE3)ril: *E. coli* B F<sup>-</sup> ompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> gal  $\lambda$ (DE3) endA metA::Tn5(kan<sup>r</sup>) Hte [argU ileY leuW Cam<sup>r</sup>] (Stratagene, La Jolla, USA) (Kleber-Janke & Becker, 2000)

#### 2.1.3. Eukaryontische Zelllinien

RK13: Nierenepithelzellen aus Känninchen, ATCC CCL-37, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA (McCarthy *et al.*, 1963)

## 2.1.4. Oligodesoxyribonukleotide

Oligodesoxyribonukleotide (Primer) für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und für Kettenabbruch-Reaktionen (Sanger *et al.*, 1977) (siehe 2.2.2.3. und 2.2.2.10.1.) zur Bestimmung der DNS-Sequenz wurden von MWG Biotech (Ebersberg) als Feststoff bezogen und in H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 pmol/μl gelöst.

### 2.1.4.1. Oligodesoxyribonukleotide für die PCR

**Tabelle 1:** Oligodesoxyribonukleotide für die PCR

Name	Sequenz
btEcoRI-5'	5'-CCC TCT TTA TTG AAT TCA TAA GTC ATC ATG GTG AAA AGC CAC ATA GGC-3'
btXbaI-3'	5'-GAA AAC AGT CTA GAT GCC CCT ATC CTA CTA TGA GAA AAA TGA GG-3'
btXhoI-5'	5'-CCC TCT TTA TTC TCG AGA TAA GTC ATC ATG GTG AAA AGC CAC ATA GGC AG-3'
cgBamHI-3'	5'-CAA GCA GGG ATC CCT CCC TCA TCC CAC (GCT)AT CAG GAA GAT GAG-3'
cgEcoRI-5'	5'-CTC ATT GAA TTC AT(CT) AGC TGT CAT GGC GAA CCT CAG CTA CTG GCT GC-3'
cgHindIII-5'	5'-CTC ATT AAG CTT AT(CT) AGC TGT CAT GGC GAA CCT CAG CTA CTG GCT GC-3'
cgXbaI-3'	5'-CAA GCA GTC TAG ACT CCC TCA TCC CAC (GCT)AT CAG GAA GAT GAG G-3'
maBamHI-3'	5'-CAA GCA GGG ATC CTT CCT TCA TCC CAC CAT CAG GAA GAT GAG-3'
maEcoRI-5'	5'-CTT CAT TGA ATT CAT CAG CCA TCA TGG CGA ACC TTA GCT ACT GGC-3'
maHindIII-5'	5'-CTT CAT TAA GCT TAT CAG CCA TCA TGG CGA ACC TTA GCT ACT GGC-3'
maRekBamHI-5'	5'-GAA GGA TCC TCA GCT GGA CCT TCT TCC ATC GTA GTA GGC CTG GGA C-3'
maRekNdeI-5'	5'-GTT CAT ATG TCT AAG AAG CGG CCA AAG CCT GGA GGG TGG AAC ACT GG-3'
maXbaI-3'	5'-CAA GCA GTC TAG ATT CCT TCA TCC CAC CAT CAG GAA GAT GAG-3'
mmEcoRI-5'	5'-CTC ATT GAA TTC ATC AGT CAT CAT GGC GAA CCT TGG CTA CTG GCT GC-3'
mmXbaI-3'	5'-CAA GCA GTC TAG ACT CCC TCA TCC CAC GAT CAG GAA GAT GAG G-3'
oaEcoRI-5'	5'-CTC TTT ATT GAA TTC AGA AGT CAT CAT GGT GAA AAG CCA CAT AGG-3'
oaHindIII-5'	5'-CTC TTT ATT AAG CTT AGA AGT CAT CAT GGT GAA AAG CCA CAT AGG-3'
oaEcoRI-3'	5'-GAA AAC AGG AAT TCT GCC CCT ATC CTA CTA TGA GAA AAA TGA GG-3'
oaXbaI-3'	5'-GAA AAC AGT CTA GAT GCC CCT ATC CTA CTA TGA GAA AAA TGA GG-3'



### 2.1.4.2. Oligodesoxyribonukleotide für die Mutagenese-PCR

**Tabelle 2:** Oligodesoxyribonukleotide für die Mutagenese-PCR

Name	Sequenz
cgE227D-for	5'-GGC CTA CTA CGA CGG GAG AAG TTC CCG GGC CGT GCT GC-3'
cgE227D-rev	5'-GCA GCA CGG CCC GGG AAC TTC TCC CGT CGT AGT AGG CC-3'
cgM109I-for	5'-GCC AAA AAC CAA CAT CAA GCA CGT GGC AGG CGC-3'
cgM109I-rev	5'-GCG CCT GCC ACG TGC TTG ATG TTG GTT TTT GGC-3'
cgM109L-for	5'-GCC AAA AAC CAA CCT GAA GCA CGT GGC AGG CGC-3'
cgM109L-rev	5'-GCG CCT GCC ACG TGC TTC AGG TTG GTT TTT GGC-3'
cgN155Y-for	5'-CCG TGA AAA CAT GTA CCG CTA CCC TAA CCA AGT G-3'
cgN155Y-rev	5'-CAC TTG GTT AGG GTA GCG GTA CAT GTT TTC ACG G-3'
cgN170S-for	5'-CCA GTA CAG CAA CCA GAA CAA CTT CGT ACA CGA TTG C-3'
cgN170S-rev	5'-GCA ATC GTG TAC GAA GTT GTT CTG GTT GCT GTA CTG G-3'

### 2.1.4.3. Oligodesoxyribonukleotide für die DNS-Sequenzierung

#### 2.1.4.3.1. Mit 5'-Modifikation

Zur Bestimmung der Sequenz von DNS-Fragmenten mit Hilfe von Kettenabbruch-Reaktionen (Sanger *et al.*, 1977) (siehe 2.2.2.10.1.) wurden mit 5' IRD 800 und 5' IRD 700 modifizierte Primer verwendet.

**Tabelle 3:** Oligodesoxyribonukleotide für die DNS-Sequenzierung mit 5'-Modifikation

Name	Sequenz
135-44for-800	5'-GCC CAT GAT CCA TTT TGG CAA C-3'
btG6147-800	5'-GTG GTA CCC ACG GTC AAT GG-3'
cgG6147-800	5'-TGG CAC CCA CAA TCA GT-3'
G6146-700	5'-TTC TCC CCC TTG GTG GT-3'
G6147-800	5'-TGG CAC CCA CAG TCA GT-3'
Rev(-29)-700	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3'
SP6-700	5'-ATT TAG GTG ACA TAT AGA A-3'

T3-700	5'-AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG-3'
T7-800	5'-GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C-3'
Uni(-21)-800	5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'

### 2.1.4.3.2. Ohne 5'-Modifikation

Für die bei MWG Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegebene Sequenzbestimmung von DNS-Fragmenten (Sanger *et al.*, 1977) wurden unmodifizierte Primer verwendet.

**Tabelle 4:** Oligodesoxyribonukleotide für die DNS-Sequenzierung ohne 5'-Modifikation

Name	Sequenz
btG6147	5'-GTG GTA CCC ACG GTC AAT GG-3'
cgG6147	5'-TGG CAC CCA CAA TCA GT-3'
G6146	5'-TTC TCC CCC TTG GTG GT-3'
M13rev(-29)	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC-3'
mmG6147	5'-GGG TAC CCA TAA TCA GT-3'
oaG6147	5'-TGG TAG CCA CAG TCA GT-3'
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

### 2.1.5. Plasmide

**Tabelle 5:** Verwendete Plasmid-DNS

Bezeichnung	Charakteristika	Referenz
pBluescript II SK(-)	Klonierungsvektor, Amp <sup>r</sup>	Stratagene, La Jolla, USA
pCl-btPrP-6/5-2	pCIneo mit <i>Pmp</i> -ORF vom Rind	Diese Arbeit
pCl-cgPrP-6-10	pCIneo mit <i>Pmp</i> -ORF der Rötelmaus	Diese Arbeit
pCl-cgPrPE227D-1-5	pCIneo mit mutiertem <i>Pmp</i> -ORF der Rötelmaus	Diese Arbeit
pCl-cgPrPM109I-3-6	pCIneo mit mutiertem <i>Pmp</i> -ORF der Rötelmaus	Diese Arbeit
pCl-cgPrPM109L-1-4	pCIneo mit mutiertem <i>Pmp</i> -ORF der Rötelmaus	Diese Arbeit
pCl-cgPrPN155Y-4-2	pCIneo mit mutiertem <i>Pmp</i> -ORF der Rötelmaus	Diese Arbeit
pCl-cgPrPN155Y-N170S-2-1	pCIneo mit mutiertem <i>Pmp</i> -ORF der Rötelmaus	Diese Arbeit
pCl-cgPrPN170S-2-2	pCIneo mit mutiertem <i>Pmp</i> -ORF der Rötelmaus	Diese Arbeit

pCI-maPrP-7-7	pCIneo mit <i>Prnp</i> -ORF vom Hamster	Diese Arbeit
pCI-mmPrP	pCIneo mit <i>Prnp</i> -a-ORF der Maus	ZNP, München (Windl <i>et al.</i> , 1999)
pCIneo	Expressionsvektor mit CMV-Promotor, Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>	Promega, Mannheim
pCI-oaPrP(ARQ)-12-6	pCIneo mit <i>Prnp</i> -ORF vom Schaf (Genotyp ARQ)	Diese Arbeit
pCI-oaPrP(ARR)-3-1	pCIneo mit <i>Prnp</i> -ORF vom Schaf (Genotyp ARR)	Diese Arbeit
pET17b	Bakterieller Expressionsvektor	Novagen, San Diego, USA
pET-huRekPrP-81	pET17b mit humanem <i>Prnp</i> -ORF (M129) ohne die für ER- und GPI-Anker-Signalsequenz kodierenden Bereiche	ZNP, München (Giese <i>et al.</i> , 2004)
pET-maRekPrP-5-8	pET17b mit <i>Prnp</i> -ORF vom Hamster ohne die für ER- und GPI-Anker-Signalsequenz kodierenden Bereiche	Diese Arbeit
pET-mmRekPrP-31	pET17b mit <i>Prnp</i> -ORF der Maus ohne die für ER- und GPI-Anker-Signalsequenz kodierenden Bereiche, STREP-TAG	ZNP, München (Bertsch <i>et al.</i> , 2005)
pGEM-T Easy	Klonierungsvektor, Amp <sup>r</sup>	Promega, Mannheim
pHA58	Resistenzplasmid, Hyg <sup>r</sup>	Erhalten von H. Lorenz (Windl <i>et al.</i> , 1999)
pScr23.4	Klonierungsvektor mit <i>Prnp</i> -ORF vom Schaf (Genotyp ARR)	(Goldmann <i>et al.</i> , 1990)
pSR2	Resistenzplasmid, Pur <sup>r</sup>	Erhalten von H. Laude (Vilette <i>et al.</i> , 2001)
pTet-On	Vektor zur Expression des tet-Aktivators (tTA), Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup>	Clontech, Palo Alto, USA
pTRE	Expressionsvektor mit tTA-induzierbarem CMV-Promotor, Amp <sup>r</sup>	Clontech, Palo Alto, USA
pTRE-cgPrP-8-2	pTRE mit <i>Prnp</i> -ORF der Rötelmaus	Diese Arbeit

## 2.1.6. Antikörper

### 2.1.6.1. Anti-PrP-Antikörper

**Tabelle 6:** Anti-PrP-Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung	Referenz
12F10	Maus, monoklonal	1:2000	(Krasemann <i>et al.</i> , 1996)
3B5	Maus, monoklonal	1:50	(Krasemann <i>et al.</i> , 1996)
3F4	Maus, monoklonal	1:2000	(Kascsak <i>et al.</i> , 1987)
6H4	Maus, monoklonal	1:5000	Prionics AG (Schlieren, Schweiz)

7G5	Maus, monoklonal	1:200	(Kascsak <i>et al.</i> , 1997)
RA3153	Kaninchen, polyklonal	1:3000	Sigma Genosys (Cambridge, UK), (Xiang <i>et al.</i> , 2004)

### 2.1.6.2. Sekundär-Antikörper

**Tabelle 7:** Sekundär-Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung	Referenz
Anti-Kaninchen IgG, AP-gekoppelt	Ziege, monoklonal	1:3000	Dianova, Hamburg
Anti-Maus IgG, AP-gekoppelt	Ziege, monoklonal	1:3000	Dianova, Hamburg

### 2.1.7. Lösungen und Puffer für verschiedene Methoden

#### 2.1.7.1. Lösungen und Puffer zur Arbeit mit *Escherichia coli*

LB-Medium:	1 % Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 1 % NaCl
SOB-Medium:	2 % Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 0,01 M NaCl, 2,5 mM KCl, 0,01 M MgCl <sub>2</sub> , pH 7,0
SEM-Puffer:	10 mM Pipes, 55 mM MnCl <sub>2</sub> , 15 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl, pH 6,7
SOC-Medium:	SOB-Medium mit 20 mM Glucose
Rich-Medium:	1 % Trypton, 0,5 % Hefe-Extrakt, 0,5 % NaCl, 2 % Glycerin, 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 50 mM Glucose, 10 mM MgCl <sub>2</sub>
Ernte-Puffer:	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM MgCl <sub>2</sub>
TAE-Puffer:	40 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Essigsäure

#### 2.1.7.2. Lösungen und Puffer zur Arbeit mit Säugerzellkulturen

Minimal-Medium:	DMEM mit 4,5 g/l Glukose ohne Glutamin, ohne Methionin und Cystein (Pan Biotech, Aidenbach), mit Pen/Strep und Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe) und 10 % dialysiertem FBS (Pan Biotech, Aidenbach)
-----------------	---

### 2.1.7.3. Lösungen und Puffer zur Protein-Analyse und Aufreinigung

BCA-Arbeitslösung:	1:50 (v/v) von Kupfersulfat-Lösung : Bicinchoninsäure-Lösung
Trenngel:	15 % oder 10 % Acrylamid, 0,375 M Tris/HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,035 % TEMED
Sammelgel:	5 % Acrylamid, 0,125 M Tris/HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS und 0,07 % TEMED
Laufpuffer:	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % SDS
5× Probenpuffer:	15 % (w/v) SDS, 40 % (w/v) Saccharose, 1 mM EDTA, 50 mM Tris/HCl pH 6,8, 20 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau
Blotting-Puffer:	0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS, 20 % Methanol
Block-Puffer:	3 % Magermilchpulver, 0,1 % Tween in PBS
PBST:	PBS mit 0,1 % Tween
CLZ-Puffer:	20 mM Tris/HCl pH 9,8, 1 mM Magnesiumchlorid
AP-Puffer:	100 mM Natriumchlorid, 5 mM Magnesiumchlorid, 100 mM Tris/HCl pH 9,5
NBT-Lösung:	75 mg/ml in 75 % Dimethylformamid
BCIP-Lösung:	50 mg/ml in 100 % Dimethylformamid
TBS-Puffer:	500 mM Natriumchlorid, 20 mM Tris/HCl pH 7,5
Färbelösung:	0,5 % Coomassie Brilliant Blue R250 oder G250, 9 % Essigsäure, 45,2 % Methanol
Entfärber:	25 % Ethanol, 8 % Essigsäure
Fixierlösung:	50 % Methanol, 12 % Essigsäure, 0,018 % Formaldehyd
Waschlösung:	50 % Ethanol
VB-Lösung:	0,2 g/l Natriumthiosulfat
Imprägnierlösung:	2 g/l Silbernitrat, 0,028 % Formaldehyd
Entwickler:	60 g/l Natriumcarbonat, 0,018 % Formaldehyd, 4 mg/l Natriumthiosulfat
Stopplösung:	50 % Methanol, 12 % Essigsäure
HL+-Puffer:	150 mM Natriumchlorid, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 % Igepal, 0,5 % Desoxycholat, 5 mM EDTA, frisch dazu: „Complete Mini

(ohne EDTA)“ Protease-Inhibitoren (Roche, Mannheim) aus einer 25× Stamm-Lösung (1 Tablette in 400 µl H<sub>2</sub>O)

Prot.-A-Sepharose:	50 % (v/v) Suspension von Protein-A-Sepharose in PBS
DLPC-Puffer:	150 mM Natriumchlorid, 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 2 % Sarcosyl, 0,4 % α-L-Lecithin
IP-Waschpuffer:	500 mM Natriumchlorid, 50 mM Tris/HCl pH 7,0, 1 % Sarcosyl
Homogen.-Puffer:	10 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4, 10 % (w/v) Sarcosyl
Sucrose-Kissen:	20 % (w/v) Sucrose, 0,6 M Kaliumjodid, 6 mM Natriumthiosulfat, 1 % Sarcosyl und 10 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 8,5
Oxidationspuffer:	8 M Harnstoff, 2 µM CuSO <sub>4</sub> , 50 mM Tris/HCl pH 8,5
Ni-Äquilibrierpuffer:	8 M Harnstoff, 10 mM MOPS pH 7,0
Ni-Waschpuffer:	8 M Harnstoff, 500 mM NaCl, 10 mM MOPS pH 7,0
Ni-Elutionspuffer:	7,2 M Harnstoff, 10 mM MOPS pH 7,0, 150 mM NaCl, 50 mM Imidazol
Wasch-Puffer:	670 mM Sucrose, 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 0,5 % Triton X-100, 5 mM EDTA, 1 mM Benzamidin
Resuspensionspuffer:	8 M Harnstoff, 10 mM MOPS, 1 mM EDTA, 50 mM DTT (1M)
Niedrigsalzpuffer :	8 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl pH 8,0
Hochsalzpuffer:	500 mM NaCl, 8 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl pH 8,0

#### 2.1.7.4. Lösungen und Puffer zur *in vitro* Konversion

rPrP-Konv.-Puffer:	50 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM NaCl, 0,1 % (w/v) Igepal und 50 mM Citrat-Puffer pH 6,5
Konversionspuffer:	200 mM Kaliumchlorid, 5 mM Magnesiumchlorid, 0,625 % Sarcosyl, 50 mM Citrat-Puffer pH 6,0
10× TN-Puffer:	1,5 M Natriumchlorid, 0,5 M Tris/HCl pH 7,5
Gel-Fixierlösung:	25:65:10 (v/v) von Isopropanol : H <sub>2</sub> O : Essigsäure

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Methoden zur Arbeit mit *Escherichia coli***

#### **2.2.1.1. Allgemeine Wachstumsbedingungen**

Flüssigkulturen von *E. coli* DH5 $\alpha$  und BL21(DE3)ril wurden über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C mit 250 upm in LB-Medium angezogen. Für das Wachstum auf Agarplatten wurde dem LB-Medium 1,5 % Agar zugegeben und in Petri-Schalen gegossen. Angeimpfte LB-Platten wurden in einem Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Zum selektiven Wachstum von Zellen, die mit pBluescript-SK(-), pCIneo, pGEM-T Easy, pET17b und deren Derivaten transformiert wurden, ist dem LB-Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml zugeführt worden. Bei der Kultivierung von BL21(DE3)ril wurde zusätzlich Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 34  $\mu$ g/ml hinzugegeben. Die Arbeiten mit *E. coli* wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

#### **2.2.1.2. Wachstumsmessung**

Um das Wachstum der bakteriellen Zellen in Flüssigkulturen zu verfolgen, wurde die optische Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) in einem Spectrophotometer (Typ Ultrospec 3000, Amersham Biosciences, Freiburg) gegen LB-Medium bestimmt.

#### **2.2.1.3. Erstellung von kompetenten Zellen**

Zur Transformation von Plasmid-DNS in *E. coli* DH5 $\alpha$  mittels Elektroporation wurden kompetente Zellen erstellt (Dower *et al.*, 1988). Dazu wurden 0,5 l LB-Medium mit 150  $\mu$ l einer über Nacht angezogenen 5 ml LB-Kultur angeimpft. Diese Kultur wurde bei 37°C und 250 upm bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,5 herangezogen und anschließend für 30 min auf Eis gestellt. Die gekühlte Kultur wurde bei 4°C mit 4900 upm in einer Avanti J-25 Zentrifuge (Rotortyp JLA 10.500, Beckman Coulter, Krefeld) für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 l eiskaltem H<sub>2</sub>O resuspendiert und mit den gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden anschließend in 0,25 l eiskaltem H<sub>2</sub>O aufgenommen, erneut abzentrifugiert und das entstandene Pellet

in 10 ml eiskaltem Glycerin (10 % v/v) resuspendiert. Die Zellen wurden wieder zentrifugiert und in 1,5 ml eiskaltem Glycerin (10 % v/v) aufgenommen. Von der erhaltenen Zellsuspension wurden Aliquots von 80 µl erstellt, die mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert wurden.

Zur Erzeugung kompetenter Zellen von *E. coli* BL21(DE3)ril für die „Hitzeschock“-Transformation (siehe 2.2.1.4.) wurde nach einem veränderten Protokoll von Inoue *et al.* (Inoue *et al.*, 1990) 50 ml SOB-Medium mit 1 µl einer LB-Vorkultur inokuliert und über Nacht bei Raumtemperatur bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 inkubiert. Nach Lagerung auf Eis für 10 min wurden die Zellen dann bei 2500 × g für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert (Zentrifuge 5804 R Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 16 ml eiskaltem SEM-Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubation für 10 min auf Eis wurden die Zellen erneut mit 2500 × g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 4 ml eiskaltem SEM-Puffer aufgenommen, DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % hinzugegeben und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

#### **2.2.1.4. Transformation von Plasmid-DNS**

Plasmid-DNS wurde durch Elektroporation in *E. coli* DH5α transformiert (Dower *et al.*, 1988). Ein Aliquot von 80 µl kompetenter Zellen wurde dazu auf Eis aufgetaut und mit 1-5 ng Plasmid-DNS oder 20 µl gereinigtem Ligationsansatz vermennt. Der Ansatz wurde in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Spaltbreite (Gene Pulser Cuvette, Bio-Rad, München) überführt und mit Hilfe einer Elektroporationsapparatur (Shock Pod - Capacity extender II - Pulse Controller II - Gene Pulser II, Bio-Rad, München) bei 200 Ω, 25 µF und 1,6 kV ein Impuls angelegt. Die Zellen wurden in 500 µl eiskaltem SOC-Medium (PepLab, Erlangen) aufgenommen, in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Zellen von *E. coli* BL21(DE3)ril wurden nach dem „Hitzeschock“-Verfahren (Inoue *et al.*, 1990) transformiert. Dazu wurden zu 200 µl kompetenter Zellen (siehe 2.2.1.3.) einige Nanogramm Plasmid-DNS gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 30 s im Wasserbad. Die Ansätze



wurden dann zurück auf das Eis gestellt, mit 0,8 ml SOC-Medium versehen und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Sowohl die Transformationansätze aus der Elektroporation als auch die Ansätze aus der „Hitzeschock“-Transformation wurden nach der Inkubation in SOC-Medium bei 3000 upm bei RT für 3 min mit einer Tischzentrifuge (Typ 5415 R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Hälfte abgenommen, das Pellet in dem verbleibendem SOC-Medium resuspendiert und 1/10 sowie 9/10 der Resuspension getrennt mittels eines Drigalski-Spatels auf zwei LB-Agarplatten mit entsprechenden Selektionsantibiotika ausgestrichen. Die angeimpften Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert und aus angewachsenen Bakterien-Kolonien Plasmid-DNS isoliert.

#### **2.2.1.5. Erstellung von Stammkulturen**

Zur Konservierung von bakteriellen Zellen wurden 800 µl einer Flüssigkultur mit 200 µl Glycerin (80 % v/v) vermengt und bei -80°C gelagert.

#### **2.2.1.6. Isolierung von Plasmid-DNS**

Zur Isolierung von Plasmid-DNS aus kleineren Kulturvolumina wurde eine abgewandelte Form des im Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) empfohlenen Protokolls durchgeführt. 1,5 ml Übernacht-Kultur wurden dazu mit einer Tischzentrifuge (Typ 5415 R, Eppendorf, Hamburg) bei RT mit 13.200 upm pelletiert und in 150 µl kaltem P1-Puffer aufgenommen. Nach Zugabe von 150 µl P2-Puffer wurde die Suspension bei RT für 4 min stengelassen, anschließend 150 µl kalter P3-Puffer hinzugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Ansätze in einer auf 4°C vorgekühlten Tischzentrifuge (Typ 5415 R, Eppendorf, Hamburg) bei 13.200 upm für 8 min zentrifugiert, der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit einem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und erneut bei 4°C für 15 min mit 13.200 upm zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit Ethanol (70 % v/v) gewaschen und bei RT 5 min mit 13.200 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet an der Luft getrocknet, in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

Zur Präparation von Plasmid-DNS aus 25 ml Kulturen wurde das Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll eingesetzt. Aliquots der dadurch gewonnenen DNS-Lösung wurden bei -20°C gelagert.

Mini- und Midi-Präparationsprodukte wurden in einer geeigneten Restriktionsanalyse überprüft und die DNS-Konzentration gegebenenfalls fotometrisch bestimmt (siehe 2.2.2.2.).

#### **2.2.1.7. Expression von rekombinantem Prionprotein**

Zur Expression von unglykosylierten Prionprotein in *E. coli* (rPrP) wurde der Stamm BL21(DE3)ril verwendet. Dieser wurde mit auf dem pET17b-Vektor basierenden Expressionskonstrukten transformiert, welche den *Prnp*-ORF ohne die für ER- und GPI-Anker-Signalsequenz kodierende DNS-Abschnitte beinhalteten (siehe 2.2.1.4.). Aus einer LB-Vorkultur der rPrP-exprimierenden Klone wurden 500 ml Rich-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37°C unter Schütteln mit 250 upm kultiviert. Die Expression wurde durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 1 mM induziert und die Kultur nach der IPTG-Zugabe für 2 h bei 37°C und 250 upm inkubiert. Es wurden vor der Induktion sowie 1 h und 2 h nach IPTG-Zugabe Aliquots der Bakterienkultur zur Expressionskontrolle für die SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung (siehe 2.2.4.5.1.) entnommen. Die Bakterienkultur wurde durch Zentrifugation in einer Avanti J-25 Zentrifuge (Beckman-Coulter, Krefeld) mit 5000 upm für 10 min bei 4°C geerntet, das Pellet in 10 ml Ernte-Puffer aufgenommen und die Zellsuspension bis zur Weiterverarbeitung (siehe 2.2.4.11.) bei -20°C eingefroren.

### **2.2.2. Methoden zur DNS-Analyse und Klonierung**

#### **2.2.2.1. Isolation von genomischer DNS**

Genomische DNS zur Amplifikation des PrP-Gens wurde aus 25 mg Muskel- bzw. Hirngewebe mit Hilfe des DNeasy Tissue Kits (Qiagen, Hilden) nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll gewonnen. Die Integrität der DNS-Präparation wurde mittels Gelelektrophorese überprüft und die Konzentration fotometrisch vermessen (siehe 2.2.2.2.). Die genomische DNS wurde anschließend bei 4°C gelagert.

### 2.2.2.2. Konzentrationsbestimmung der DNS

Zur Bestimmung der Konzentration von DNS-Lösungen wurden 2 µl DNS in einem Verhältnis von 1:250 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und gegen 500 µl H<sub>2</sub>O in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm die optische Dichte bei 260 nm (OD<sub>260</sub>) mit einem Spektrophotometer (Typ Ultrospec 3000, Amersham Biosciences, Freiburg) bestimmt. Ein OD<sub>260</sub>-Wert von 1 wurde dabei mit einer Konzentration von 50 µg dsDNS/ml gleichgesetzt. Um das Ausmaß an Verunreinigung mit Proteinen abzuschätzen, wurde zusätzlich die optische Dichte bei 280 nm gemessen (OD<sub>280</sub>). DNS-Lösungen mit einem Verhältnis OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> kleiner als 1,8 wurden verworfen oder aufgereinigt (siehe 2.2.2.5.).

Zur Konzentrationsbestimmung von geringen DNS-Mengen wurde ein Aliquot im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Fluoreszenzintensität unter UV-Licht mit einem DNS-Standard bekannter Konzentration verglichen.

### 2.2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation von DNS-Fragmenten und zur Einführung von Punktmutationen in Plasmid-DNS wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) angewendet (Mullis *et al.*, 1986; Saiki *et al.*, 1988). Die Amplifikation von DNS-Fragmenten mit Hilfe der *Taq*-DNA-Polymerase wurde mit dem HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen, Hilden) in 0,2 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt. Dazu wurden 25 µl des Puffer, Nukleotide und Polymerase enthaltene HotStarTaq Master Mix in 50 µl Reaktionsvolumen mit jeweils 0,5 µl einer Stammlösung (100 pmol/µl) der 3'- und des 5'-Oligodesoxynukleotide (Primer) und einer geeigneten Menge DNS versetzt. Von genomischer DNS wurden dabei 3 µl einer 1:10 Verdünnung bzw. 500 ng aufgereinigter Plasmid-DNS 500 ng hinzugegeben. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Tropfen sterilem Mineralöl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) überschichtet. Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt und mit einer Denaturierungsphase von 15 min bei 95°C begonnen. Die Reaktion wurde mit einer im Temperatur-Zyklus enthaltenen Denaturierungsphase von 45 s bei 94°C fortgesetzt. Die Anlagerungsphase betrug in der Regel 1,5 min bei 61°C, an welche sich eine Verlängerungsphase von 2 min bei 72°C anschloss. Der Zyklus von Denaturierung,

Anlagerung und Verlängerung wurde insgesamt 35-mal wiederholt und die Reaktion mit einer Verlängerungsphase von 8 min bei 72°C abgeschlossen.

Zur Erzeugung von PCR-Produkten ohne Desoxyadenylat-Überhänge, wurde die *PfuTurbo*-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. In einem Reaktionsvolumen von 100 µl wurden jeweils 2 µl der Primer-Stammlösung (100 pmol/µl), 10 µl des 10× Reaktionspuffers, 12,5 µl aus einer 4 mM Stammlösung dNTPs (Promega, Mannheim) und 2 µl *PfuTurbo*-DNA-Polymerase zusammengegeben. Die Menge an DNS sowie der Ablauf des Temperaturzyklus wurden wie bei der *Taq*-PCR eingestellt.

#### **2.2.2.4. Ortsspezifische Mutagenese**

Zur Einführung von Punktmutationen in Plasmid-DNS wurde mit Vorwärts- und Rückwärts-Mutagenese-Primern und der *PfuTurbo*-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) eine PCR durchgeführt (Kunkel *et al.*, 1987). Dabei wurden in einem 50 µl Reaktionsansatz 100 ng Plasmid-DNS mit 12,5 µl einer 4 mM Stammlösung dNTPs (Promega, Mannheim), 5 µl des 10× Reaktionspuffers, 0,3 µl der beiden Mutagenese-Primer-Stammlösungen (100 pmol/µl) und 1,5 µl *PfuTurbo*-DNA-Polymerase versehen. Die Mutagenese-Primer wurden so ausgewählt, dass neben der Punktmutation zur Veränderung der Aminosäuresequenz eine weitere stille Mutation eingefügt wurde. Diese Mutation hatte entweder die Entstehung oder den Verlust einer Schnittstelle für Restriktionsendonukleasen zur Folge, wodurch eine Identifizierung der positiven Klone durch Restriktionsanalyse möglich wurde. Die PCR-Reaktion wurde beginnend mit einer 30 s dauernden Denaturierungsphase bei 95°C in einem Thermocycler Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt und mit einer im Temperatur-Zyklus enthaltenen Denaturierungsphase von 30 s bei 95°C fortgesetzt. Die Anlagerungsphase betrug in der Regel 1 min bei 55°C, an welche sich eine Verlängerungsphase von 3,5 min bei 72°C anschloss. Der Zyklus von Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung wurde insgesamt 17-mal wiederholt und die Reaktion mit einer Verlängerungsphase von 5 min bei 72°C abgeschlossen. 5 µl des PCR-Produkts wurde gelelektrophoretisch analysiert.

Anschließend wurde der restliche PCR-Ansatz aufgereinigt, mit einer entsprechenden Menge des 10× Enzympuffers versehen, mit *DpnI* verdaut (siehe 2.2.2.6.) und in *E. coli*

transformiert (siehe 2.2.1.4.). Eine geeignete Anzahl bakterieller Klone wurde zur Plasmid-DNS-Isolation ausgewählt (siehe 2.2.1.6.), positive Klone mit Hilfe der Restriktionsanalyse identifiziert (siehe 2.2.2.6.) und durch DNS-Sequenzanalyse überprüft (siehe 2.2.2.10.).

#### **2.2.2.5. Reinigung von PCR-Produkten und Plasmid-DNS**

Zur Reinigung von PCR-Produkten, Plasmid-DNS, Ligationsreaktionen sowie zur Umpufferung von Restriktionsansätzen wurde das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach dem vom Hersteller angegebenen Protokoll verwendet. PCR-Produkte, Plasmid-DNS und Restriktionsansätze wurden dabei mit 30-60 µl und Ligationsansätze mit 20 µl H<sub>2</sub>O von dem Säulenmaterial eluiert.

#### **2.2.2.6. Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen**

Zur Spaltung mit Restriktionsenzymen wurde gereinigtes PCR-Produkt bzw. Plasmid-DNS aus Mini- oder Midi-Präparationen mit einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O verdünnt und mit dem entsprechenden Volumen des vom Hersteller gelieferten 10× Reaktionspuffers versehen. Die Lösung wurde mit 1-2 Units des Restriktionsenzym pro µg DNS versetzt, wobei das Volumen der zugegebenen Enzymlösung höchstens ein Zehntel des Reaktionsvolumens betrug. Anschließend wurde der Ansatz bei 37°C für eine Stunde inkubiert und mittels Gelelektrophorese analysiert.

#### **2.2.2.7. Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten**

Zur analytischen und präparativen Auftrennung von DNS-Fragmenten wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde Agarose (1 % w/v) in TAE-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle Moulinex Quickchef 650 (Samou, Radolfzell) gelöst und mit Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) versehen. Die Lösung wurde in eine Flachbettschale gegossen und mit einem Kamm zur Erzeugung von Geldaschen bestückt. Die Agarose wurde durch Abkühlen zum Erstarren gebracht und in eine mit TAE-Puffer gefüllte Gelkammer (Peqlab, Erlangen) überführt. Die DNS-Proben wurden in einem

Volumen-Verhältnis von 1:5 mit 5× Gel Loading Solution (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versehen und in die Geltaschen gefüllt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wurde entweder ein 100 bp- oder ein 1 kb-DNS-Standard (New England Biolabs, Frankfurt) mit auf das Gel aufgetragen. Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNS-Fragmente wurde für 20-40 min eine Spannung von 100 V angelegt. Nach Beendigung der Auftrennung wurden die DNS-Banden durch Bestrahlung mit UV-Licht visualisiert und fotografiert.

#### **2.2.2.8. Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen**

Zur Isolation von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die DNS-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt, wobei frisch angesetzter TAE-Puffer verwendet wurde. Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell unter Beleuchtung mit UV-Licht ausgeschnitten. Überschüssige Agarose wurde dabei von der DNS-haltigen Agarose sorgfältig entfernt und die Exposition des Gels mit UV-Licht so kurz wie möglich gehalten. Die ausgeschnittene Bande wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNS mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) aus der Agarose eluiert. Die Konzentration der eluierten DNS-Fragmente wurde im Agarosegel durch Vergleich mit einem Längenstandard mit bekannter Konzentration bestimmt.

#### **2.2.2.9. Ligation von DNS-Fragmenten**

Zur Verknüpfung von DNS-Fragmenten durch die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen den freien 3'-Hydroxyl- und den 5'-Phosphatgruppen wurden geeignete Mengen der gereinigten DNS in einem Reaktionsvolumen von 10 µl mit 0,5 µl (200 Units) T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt) versehen, wobei durch Zugabe von 1 µl des zugehörigen 10× Puffers die geforderten Puffer-Bedingungen eingestellt wurden. Zur Ligation von PCR-Produkten in Plasmid-Vektoren über die Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen wurden PCR-Produkte und Vektoren mit entsprechenden Restriktionsenzymen behandelt, gelelektrophoretisch aufgetrennt, die gewünschten Fragmente aus dem Gel eluiert und in der Regel in einem molkularen Verhältnis von 1:4 (Vektor : Insert) im Reaktionsansatz vorgelegt, wobei 50-200 ng Vektor-DNS eingesetzt wurde. Der Ansatz wurde in einem Thermocycler

(Eppendorf, Hamburg) über Nacht bei 16°C inkubiert, anschließend gereinigt und in kompetente Zellen von *E. coli* transformiert (siehe 2.2.1.4.).

Zur Ligation von PCR-Produkten in den pGEM-T Easy Vektor (Promega, Mannheim) über die Thymidylat-Überhänge des Vektors und den Desoxyadenylat-Überhängen der Produkte aus einer PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase („TA-Klonierung“) wurde die im pGEM-T Easy Vector System I (Promega, Mannheim) beigefügte T4-Ligase sowie der entsprechende Puffer verwendet und mit H<sub>2</sub>O ein Reaktionsvolumen von 10 µl eingestellt. Gereinigtes PCR-Produkt und der pGEM-T Easy Vektor wurden unter diesen Bedingungen bei RT für 1 Stunde oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde aufgereinigt und in Zellen von *E. coli* transformiert (siehe 2.2.1.4.).

#### **2.2.2.10. Sequenzanalyse von DNS**

Die Bestimmung der Sequenz von DNS-Fragmenten wurde entweder eigenständig durchgeführt oder bei MWG-Biotech (Ebersberg) in Auftrag gegeben. Für die eigenständig durchgeführte Sequenzbestimmung wurden Kettenabbruchreaktionen (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt und die Reaktionsprodukte in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Gellauf und die Gelanalyse erfolgte mit Hilfe des Sequenzierungsgerätes DNA Analyzer Gene Reader 4200 (LI-COR, Bad Homburg). Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden mit e-Seq V2.0 und AlignIR V1.0 (LI-COR, Bad Homburg) ausgewertet.

In beiden Fällen wurde der 5'-3'- als auch der 3'-5'-Strang des DNS-Fragments bestimmt.

##### **2.2.2.10.1. Kettenabbruchreaktionen**

Kettenabbruchreaktionen zur Sequenzbestimmung von DNS-Fragmenten wurden mit den Komponenten des SequiTherm Excel II LC DNA Sequencing Kit (für 25-41 cm Gele) (Biozym, Hessisch Oldendorf) und 5' IRD 800 modifizierten Primern (MWG Biotech, Ebersberg) durchgeführt (Sanger *et al.*, 1977). Dazu wurden in verschiedene 0,2 ml Reaktionsgefäße 2 µl G-, A-, T- oder C-Terminationslösung (dNTPs mit Kettenbruch verursachenden Didesoxynukleotiden) vorgelegt und mit einem Tropfen Mineralöl (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) überschichtet. In einem 0,5 ml Reaktionsgefäß

wurden weiterhin 7,5 µl von einem 3,5× Reaktionspuffer, 2 µl eines geeigneten Primers (0,25-1 pmol/ml), 3,8 µl H<sub>2</sub>O, 3 µl DNS-Template (100 ng/µl) und 1µl Polymerase zusammen gegeben. 3,9 µl dieser Stammlösung wurden in die vier Reaktionsgefäße mit den Terminationslösungen pipettiert und die Kettenabbruchreaktionen in einem Thermocycler Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt (einleitende Denaturierung bei 95°C für 3 min, zyklische Denaturierung bei 95°C für 0,5 min, Primer-Bindung bei 50°C für 15 s, Elongation bei 70°C für 1 min, 30 Zyklen). Den Reaktionsansätzen wurde nach Beendigung der Kettenabbruchreaktion 3 µl „Stop“-Lösung zugeführt.

#### **2.2.2.10.2. Das Sequenziergel**

Zur Erstellung des Polyacrylamid-Sequenziergels (Sanger & Coulson, 1978) wurden die Komponenten des zum DNA Analyzer Gene Reader 4200 (LI-COR, Bad Homburg) gehörigen Gelsystems (0,25 mm Geldicke, 41 cm Laufstrecke) zusammengesetzt. Die Gellösung wurde durch Lösen von 21 g Harnstoff (Amersham Biosciences, Freiburg) in 30,3 ml H<sub>2</sub>O unter Zugabe von 5 ml 10× TBE-Puffer (Amersham Biosciences, Freiburg), 6 ml „Long-Ranger“ Acrylamid (Biozym, Hessisch Oldendorf) und 500 µl DMSO erstellt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 50 µl TEMED und 350 µl APS gestartet und die Gellösung nach Filtrierung durch einen 45 µm Filter zwischen die Glasplatten des Gelsystems gegossen. Das Gel wurde für 1,5 Stunden zur Polymerisation stehen gelassen, anschließend 1,5 µl jedes Ansatzes nach Denaturierung (5 min, 70°C) auf das Gel geladen und der Gellauf in 0,8× TBE-Puffer durchgeführt.

#### **2.2.2.11. Expressionsvektoren mit Wildtyp-Prnp-Genen**

Zur Erstellung der Expressionsvektoren mit Wildtyp-Prnp-Genen wurden die unten beschriebenen Klonierungsschritte durchgeführt. Von den mit Zwischen- und Endvektor transformierten Klon-Kulturen wurden Stammkulturen erstellt und die Endvektoren durch Midi-Präparationen isoliert, welche nach geeigneter Restriktionskontrolle zur Transfektion von Säugerzellen verwendet wurden.



#### 2.2.2.11.1. pCI-cgPrP-6-10

Zur Klonierung des *Prnp*-ORFs der Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*, Genbank-Nummer AF367624) wurde genomische DNS aus Hirngewebe präpariert und mit den Primern cgHindIII-5' und cgBamHI-3' durch PCR mit der Taq-Polymerase der ORF des *Prnp*-Gens amplifiziert (Fragmentgröße: 808 bp), wobei im 5'-Ende eine *HindIII*- und im 3'-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle generiert wurden. Bei den Primern cgHindIII-5' und cgBamHI-3' handelt es sich um degenerierte Primer mit einer chimären *Prnp*-Sequenz von Maus und Rötelmaus, um die Primer-Bindung in dem unbekanntem Sequenzbereichen 5' vor dem ORF sowie 3' nach dem ORF und in dem terminalen 3'-Sequenzabschnitt des ORFs ab Basenpaar 745 zu optimieren. Das PCR-Produkt wurde mit *HindIII* und *BamHI* verdaut, der Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt, das Fragment aus dem Gel eluiert und in die *HindIII* und *BamHI*-Schnittstelle des pBluescript-SK(-)-Vektors ligiert. Der Ligationsansatz wurde gereinigt und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Positive Klone wurden nach einer Mini-Präparation durch Restriktionsanalyse mit *HindIII* und *BamHI* identifiziert, die präparierte DNS gereinigt und die Sequenz mit Hilfe der Primer Uni(-21)-800, Rev(-29)-700, cgG6147-800, G6146-700, T7-800 und T3-700 bestimmt. Zur weiteren Bearbeitung wurde der Klon pBlue-cgPrP-6 verwendet, welcher im terminalen 3'-Bereich des ORFs die Sequenz 5'-ATG GTG GGA TGA-3' aufweist. Dies entspricht dem Translations-Stop-Codon und den drei C-terminalen Aminosäuren M253, V254 und G255 aus dem GPI-Signalpeptid, welches im reifen Prionprotein abgespalten wird. Der pBlue-cgPrP-6-Vektor wurde mit *XhoI* und *XbaI* verdaut und das dadurch entstehende *Prnp*-Fragment nach Elution aus einer gelelektrophoretischen Auftrennung über die *XhoI*- und *XbaI*-Schnittstellen in den Expressionsvektor pCIneo ligiert. Das Ligationsprodukt wurde gereinigt und in *E. coli* DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert. Mittels eines Restriktionsverbaus mit *XhoI* und *XbaI* wurden positive Klone identifiziert und der Klon pCI-cgPrP-6-10 zur Transfektion von Säugerzellen ausgewählt.

#### 2.2.2.11.2. pCI-btPrP-6/5-2

Der *Prnp*-ORF des Rindes (*Bos taurus*, Genbank-Nummer AJ298878) wurde von genomischer DNS aus Muskelgewebe durch PCR mit der Taq-Polymerase und den Primern btXhoI-5' und btXbaI-3' amplifiziert (Fragmentgröße: 841 bp), wobei im

5'-Ende eine *XhoI*- und im 3'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle erzeugt wurden. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und mit Hilfe von TA-Klonierung in den pGEM-T Easy-Vektor ligiert. Das gereinigte Ligationsprodukt wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und positive Klone nach Mini-Präparation durch Restriktionsanalyse identifiziert. Der dadurch erhaltene Vektor pGEM-btPrP-6 wurde mit *XhoI* und *XbaI* geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, das entstandene *Prnp*-Fragment aus dem Gel eluiert und in die *XhoI*- und *XbaI*-Schnittstellen des pBluescript-SK(-)-Vektors ligiert. Der Ligationsansatz wurde gereinigt und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Durch Restriktionsanalyse der Mini-Präparationen wurde der Klon pBlue-btPrP-6/5 erhalten, dessen *Prnp*-Insert mit den Primern Uni(-21)-800, Rev(-29)-700, T7-800, T3-700, btG6147-800 und G6146-700 sequenziert wurde. Durch Verdau mit *XhoI* und *XbaI* wurde nach Gelelektrophorese und Gelelution das erhaltene *Prnp*-Fragment in den pCIneo-Vektor ligiert. Der gereinigte Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert, positive Transformanten durch Restriktionsanalyse identifiziert und der Klon pCI-btPrP-6/5-2 für weitere Experimente verwendet.

#### **2.2.2.11.3. pCI-oaPrP(ARQ)-12-6**

Zur Klonierung des *Prnp*-ORFs vom Schaf mit dem Genotyp A136, R154, Q171 (ARQ) (*Ovis aries*, Genbank-Nummer AJ000739) wurde eine Taq-PCR mit den Primern oaEcoRI-5' und oaXbaI-3' von genomischer DNS durchgeführt. Dadurch wurden im 5'-Ende eine *EcoRI*- und im 3'-Ende eine *XbaI*-Schnittstelle erzeugt. Nach einer Säulen-Reinigung wurde das PCR-Produkt (815 bp) in den pGEM-T Easy-Vektor ligiert („TA-Klonierung“). Das gereinigte Ligationsprodukt wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und positive Transformanten durch Restriktionsanalyse von Mini-Präparationen identifiziert. Die Basenabfolge des *Prnp*-Fragments vom Klon pGEM-oaPrP(ARQ)-12 wurden durch Sequenzierung (MWG Biotech, Ebersberg) mit den Primern T7, M13rev(-29), oaG6147 und G6146 bestimmt. Der Zwischenvektor pGEM-oaPrP(ARQ)-12 wurde mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten, der Verdau gelelektrophoretisch aufgetrennt, das *Prnp*-Fragment aus dem Gel eluiert und in die *EcoRI*- und *XbaI*-Schnittstellen des pCIneo-Vektors ligiert. Das Ligationsprodukt wurde gereinigt, in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und die positive Transformanten durch Restriktionsanalyse nach Mini-Präparation identifiziert. Der Klon pCI-oaPrP(ARQ)-12-6 wurde für die Transfektion von Säugerzellen ausgewählt.

#### **2.2.2.11.4. pCI-oaPrP(ARR)-3-1**

Zur Klonierung des *Prnp*-ORFs vom Schaf mit dem Genotyp A136, R154, R171 (ARR) (*Ovis aries*, Genbank-Nummer AJ000736) wurde der ORF durch eine *Pfu*-PCR mit den Primern oaHindIII-5' und oaEcoRI-3' von dem pScr23.4-Vektor amplifiziert. Das PCR-Produkt (815 bp) wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel eluiert und durch „blunt-end“-Ligation in die *EcoRV*-Schnittstelle des pBluescript-SK(-)-Vektors ligiert. Das Ligationsprodukt wurde gereinigt und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Positive Transformanten wurden durch Restriktionsanalyse von Mini-Präparationen identifiziert. Die Basenabfolge des *Prnp*-Fragments ausgewählter Klone wurde durch Sequenzierung mit den Primern Uni(-21)-800, Rev(-29)-700, T7-800, T3-700, G6147-800 und G6146-700 bestimmt und Klon pBlue-oaPrP(ARR)-3 zur Weiterbearbeitung ausgewählt. Der Vektor pBlue-oaPrP(ARR)-3 wurde mit *XhoI* und *XbaI* geschnitten, der Verdau gelelektrophoretisch aufgetrennt, das *Prnp*-Fragment aus dem Gel eluiert und in die *XhoI*- und *XbaI*-Schnittstellen des pCIneo-Vektors ligiert. Das gereinigte Ligationsprodukt wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und positive Transformanten nach Mini-Präparation durch einen Restriktionsverdau identifiziert. Der Klon pCI-oaPrP(ARR)-3-1 wurde für die Transfektion von Säugerzellen verwendet.

#### **2.2.2.11.5. pCI-maPrP-7-7**

Der *Prnp*-ORF des syrischen Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*, Genbank-Nummer M14054) wurde von genomischer DNS aus Hirngewebe durch PCR mit der Taq-Polymerase und den Primern maHindIII-5' und maBamHI-3' amplifiziert. Dadurch wurde im 5'-Ende eine *HindIII*- und im 3'-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle erzeugt. Das PCR-Produkt (806 bp) wurde mit *HindIII*- und *BamHI* verdaut, der Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt, das Fragment aus dem Gel eluiert und in die *HindIII*- und *BamHI*-Schnittstellen des pBluescript-SK(-)-Vektors ligiert. Der gereinigte Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und positive Klone nach Mini-Präparation durch Restriktionsanalyse mit *HindIII* und *BamHI* identifiziert. Nach Kontrolle der Basenabfolge des *Prnp*-Inserts durch Sequenzanalyse mit den Primern Uni(-21)-800, Rev(-29)-700, T7-800, T3-700, cgG6147-800 und G6146-700 wurde der Klon pCI-maPrP-7-7 zur Weiterbearbeitung ausgewählt. Dessen *Prnp*-Insert wurde mit *XhoI* und *XbaI* ausgeschnitten, der Restriktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt,

das entstandene *Prnp*-Fragment aus dem Gel eluiert und in die *XhoI*- und *XbaI*-Schnittstellen des pCIneo-Vektors ligiert. Der gereinigte Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und der Klon pCI-maPrP-7-7 durch Restriktionsanalyse der Mini-Präparationen für die weitere Verwendung ausgewählt.

#### **2.2.2.11.6. pTRE-cgPrP-8-2**

Zur Erstellung des Expressionsvektors mit induzierbarem *Prnp*-Gen der Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*, Genbank-Nummer AF367624) wurde zunächst der *Prnp*-ORF der Rötelmaus mit *EcoRI* und *XbaI* aus dem Zwischenvektor pGEM-cgPrP-8 (siehe 2.2.2.12.) geschnitten, der Verdau gelelektrophoretisch aufgetrennt, das entstehende Fragment aus dem Gel eluiert und in die *EcoRI* und *XbaI*-Schnittstellen des pTRE-Vektors ligiert. Der gereinigte Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert, der Klon pTRE-cgPrP-8-2 durch einen Verdau der Mini-Präparationen mit Restriktionsendonukleasen identifiziert und für die Transfektion von Säugerzellen verwendet.

#### **2.2.2.11.7. pET-maRekPrP-5-8**

Zur Erstellung eines Expressionsvektors mit dem Prionprotein vom Hamster (*Mesocricetus auratus*, Genbank-Nummer M14054) für die Expression in Bakterien (rPrP) wurde durch eine Taq-PCR von genomischer DNS der *Prnp*-ORF ohne die für die ER- und die GPI-Anker-Signalsequenz kodierenden Sequenzbereiche mit den Primern maRekNdeI-5' und maRekBamHI-3' amplifiziert, wodurch im 5'-Ende des PCR-Produktes (654 bp) eine *NdeI*- und im 3'-Ende eine *BamHI*-Schnittstelle generiert wurde. Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel eluiert, in den pGEM-T Easy-Vektor ligiert („TA-Klonierung“) und der gereinigte Ligationsansatz in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Durch Restriktionsverdau von Mini-Präparationen und Sequenzierung mit den Primern T7-800, cg6147-800, SP6-700, rev-700 und 6146-700 der Klon pGEM-maRekPrP-5 erhalten. Dieser Zwischenvektor wurde mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *BamHI* geschnitten und nach gelelektrophoretischer Auftrennung mit anschließender Elution des *Prnp*-Fragments in die *NdeI* und *BamHI*-Schnittstellen des pET17b-Vektors ligiert. Der Ligationsansatz wurde gereinigt, in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und positive Klone durch

Restriktionsanalyse von Mini-Präparationen identifiziert. Der Klon pET-maRekPrP-5-8 wurde zur Transformation des *E. coli*-Expressionsstamms BL21(DE3)ril verwendet.

#### **2.2.2.12. Expressionsvektoren mit mutierten *Prnp*-Genen**

Zur Erstellung der Expressionsvektoren mit mutierten *Prnp*-Genen der Rötelmaus wurde zunächst der *Prnp*-ORF der Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*, Genbank-Nummer AF367624) durch Taq-PCR mit den degenerierten Primern cgEcoRI-5' und cgXbaI-3' von dem Expressionsvektor pCI-cgPrP-6-10 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und in den pGEM-T Easy-Vektor ligiert („TA-Klonierung“). Der gereinigte Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und positive Transformanten durch Restriktionsanalyse nach Mini-Präparation identifiziert. Die Richtigkeit der Sequenz des Inserts wurde durch Sequenzierung (MWG Biotech, Ebersberg) mit den Primern T7, M13rev(-29), cgG6147 und G6146 überprüft. Für die Mutagenese wurde der Klon pGEM-cgPrP-8 verwendet, welcher im terminalen 3'-Bereich die Sequenz 5'-ATA GTG GGA TGA-3' aufweist. Dies entspricht den C-terminalen Aminosäuren I253, V254 und G255 aus dem GPI-Signalpeptid, welches im reifen Prionprotein abgespalten wird. Die Sequenz des *Prnp*-ORFs im pGEM-cgPrP-8-Vektor wurde durch eine Mutagenese-PCR mit geeigneten Primern (siehe 2.2.2.4.) verändert. Die durch Mutagenese-PCR erhaltenen Klone wurden durch Restriktionsanalyse und anschließender Sequenzierung (MWG Biotech, Ebersberg) mit den Primern T7, M13rev(-29), cgG6147 und G6146 überprüft. Es wurden Stammkulturen angelegt, Midi-Präparationen durchgeführt und die erhaltene DNS zur Transfektion von Säugerzellen benutzt.

##### **2.2.2.12.1. pCI-cgPrPM109I-3-6**

Für den Austausch von Methionin gegen Isoleucin an Codon 109 (M109I) wurde vom pGEM-cgPrP-8 eine Mutagenese-PCR mit den Primern cgM109I-for und cgM109I-rev durchgeführt (siehe 2.2.2.4.), die an Basenposition 327 den Austausch <sup>325</sup>ATG  $\rightarrow$  <sup>325</sup>ATC verursacht, was den Austausch Methionin gegen Isoleucin an Position 109 im Prionprotein zur Folge hat. Des Weiteren wurde durch die Mutagenese-PCR noch eine stille Mutation an Basenposition 333 eingefügt (<sup>331</sup>CAT GTG  $\rightarrow$  <sup>331</sup>CAC GTG), welche eine neue Schnittstelle für *PmlI* erzeugt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit *DpnI*

verdaut und nach erneuter Aufreinigung in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Positive Klone mit mutierter DNS-Sequenz wurden nach einer Mini-Präparation durch das veränderte Fragmentmuster in der Restriktionsanalyse mit *EcoRI* und *PmlI* erkenntlich und zur Sequenzierung ausgewählt. Der so erhaltene Zwischenvektor pGEM-cgPrPM109I-3 wurde mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten, der Verdau gelelektrophoretisch aufgetrennt, das entstandene Fragment eluiert und in die *EcoRI*- und *XbaI*-Schnittstellen des pCIneo-Vektors ligiert. Der gereinigte Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und positive Klone nach Mini-Präparation durch Restriktionsanalyse identifiziert. Der Vektor pCI-cgPrPM109I-3-6 wurde für die Transfektion von Säugerzellen ausgewählt.

#### **2.2.2.12.2. pCI-cgPrPM109L-1-4**

Um an Codon 109 des Prionproteins den Aminosäuren-Austausch Methionin gegen Leucin (M109L) zu erzeugen, wurde vom pGEM-cgPrP-8 eine Mutagenese-PCR mit den Primern cgM109L-for und cgM109L-rev durchgeführt (siehe 2.2.2.4.), die an Basenposition 325 den Austausch  $^{325}\text{ATG} \rightarrow ^{325}\text{CTG}$  verursacht. Durch diese Mutagenese-PCR wurde außerdem noch eine stille Mutation an Basenposition 333 eingefügt ( $^{331}\text{CAT GTG} \rightarrow ^{331}\text{CAC GTG}$ ), welche eine neue Schnittstelle für *PmlI* erzeugt. Das Produkt der PCR wurde gereinigt, mit *DpnI* verdaut und nach erneuter Aufreinigung in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Positive Klone mit mutierter DNS-Sequenz wurden durch das veränderte Fragmentmuster im Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *PmlI* nach Mini-Präparation der DNS erkenntlich und zur Sequenzierung ausgewählt. Der so erhaltene Zwischenvektor pGEM-cgPrPM109L-1 wurde mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten, der Verdau gelelektrophoretisch aufgetrennt, das entstandene Fragment eluiert und in die *EcoRI*- und *XbaI*-Schnittstellen des pCIneo-Vektors ligiert. Der Ligationsansatz wurde erneut gereinigt, in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und positive Klone nach Mini-Präparation durch Restriktionsanalyse identifiziert. Der Vektor pCI-cgPrPM109L-1-4 wurde für die Transfektion von Säugerzellen verwendet.

#### **2.2.2.12.3. pCIcgPrPN155Y-4-2**

Zur Einführung des Aminosäuren-Austausches Asparagin gegen Tyrosin an Codon 155 des Prionproteins (N155Y) wurde vom pGEM-cgPrP-8 eine Mutagenese-PCR mit den Primern cgN155Y-for und cgN155Y-rev durchgeführt (siehe 2.2.2.4.), die an

Basenposition 463 den Austausch  $^{463}\text{AAC} \rightarrow ^{463}\text{TAC}$  verursacht. Des Weiteren wurde dadurch noch eine stille Mutation an Basenposition 468 eingefügt ( $^{467}\text{GG TAC C} \rightarrow ^{467}\text{GC TAC C}$ ), welche eine Schnittstelle für *KpnI* entfernt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit *DpnI* verdaut und nach erneuter Aufreinigung in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Positive Klone mit mutierter DNS-Sequenz wurden nach einer Mini-Präparation durch Restriktionsanalyse identifiziert und zur Sequenzierung ausgewählt. Der so erhaltene Zwischenvektor pGEM-cgPrPN155Y-4 wurde mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten, der Verdau gelelektrophoretisch aufgetrennt, das entstandene Fragment eluiert und in die *EcoRI*- und *XbaI*-Schnittstellen des pCIneo-Vektors ligiert. Der gereinigte Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und positive Klone nach Mini-Präparation durch das veränderte Restriktionsmuster nach einem Verdau mit *EcoRI* und *KpnI* identifiziert. Der Vektor pCI-cgPrPN155Y-4-2 wurde für die weiteren Arbeiten verwendet.

#### 2.2.2.12.4. pCI-cgPrPN170S-2-2

Um den Aminosäuren-Austausch Asparagin gegen Serin an Codon 170 des Prionproteins der Rötelmaus zu erzeugen (N170S) wurde vom pGEM-cgPrP-8 eine Mutagenese-PCR mit den Primern cgN170S-for und cgN170S-rev durchgeführt (siehe 2.2.2.4.), die an Basenposition 509 den Austausch  $^{508}\text{AAC} \rightarrow ^{508}\text{AGC}$  verursacht. Außerdem wurde durch die Mutagenese-PCR noch eine stille Mutation an Basenposition 528 erzeugt ( $^{526}\text{GTG CAC} \rightarrow ^{526}\text{GTA CAC}$ ), welche eine Schnittstelle für *ApaLI* entfernt. Das PCR-Produkt wurde gereinigt, mit *DpnI* verdaut und nach erneuter Aufreinigung in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Klone deren DNS-Sequenz durch die PCR verändert wurde, wurden nach einer Mini-Präparation durch das veränderte Restriktionsmuster nach einem Verdau mit *EcoRI* und *ApaLI* identifiziert und zur Sequenzierung ausgewählt. Der Vektor pGEM-cgPrPN170S-2 wurde nach diesen Kriterien ausgewählt, mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten, der Verdau gelelektrophoretisch aufgetrennt, das entstandene Fragment eluiert und in die *EcoRI*- und *XbaI*-Schnittstellen des pCIneo-Vektors ligiert. Der gereinigte Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und positive Klone nach Mini-Präparation durch einen Restriktionsverdau identifiziert. Zur Transfektion von Säugerzellen wurde der Vektor pCI-cgPrPN170S-2-2 ausgewählt.

#### 2.2.2.12.5. pCI-cgPrPN155Y-N170S-2-1

Zur Einführung der zwei Mutationen für die Veränderung der Aminosäuresequenz an Codon 155 (Asparagin gegen Tyrosin, N155Y) und an Position 170 des Prionproteins (Asparagin gegen Serin, N170S) wurde vom pGEM-cgPrPN170S-2 eine Mutagenese-PCR mit den Primern cgN155Y-for und cgN155Y-rev durchgeführt (siehe 2.2.2.4.), die an Basenposition 463 den Austausch  $^{463}\text{AAC} \rightarrow ^{463}\text{TAC}$  verursacht. Des Weiteren wurde dadurch noch eine stille Mutation an Basenposition 468 eingefügt ( $^{467}\text{GG TAC C} \rightarrow ^{467}\text{GC TAC C}$ ), welche eine Schnittstelle für *KpnI* entfernt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit *DpnI* verdaut und nach erneuter Aufreinigung in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Positive Klone mit mutierter DNS-Sequenz wurden nach einer Mini-Präparation durch Restriktionsanalyse identifiziert und zur Sequenzierung ausgewählt. Der so erhaltene Zwischenvektor pGEM-cgPrPN155Y-N170S-2 wurde mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten, der Verdau gelelektrophoretisch aufgetrennt, das entstandene Fragment eluiert und in die *EcoRI*- und *XbaI*-Schnittstellen des pCIneo-Vektors ligiert. Der gereinigte Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und positive Klone nach Mini-Präparation durch das veränderte Restriktionsmuster nach einem Verdau mit *EcoRI*, *KpnI* und *ApaLI* identifiziert. Der Vektor pCI-cgPrPN155Y-N170S-2-1 wurde für die Transfektion von Säugerzellen verwendet.

#### 2.2.2.12.6. pCI-cgPrPE227D-1-5

Um den Aminosäure-Austausch Glutamat gegen Aspartat an Codon 227 des Prionproteins (E227D) zu erzeugen, wurde vom pGEM-cgPrP-8 eine Mutagenese-PCR mit den Primern cgE227D-for und cgE227D-rev durchgeführt (siehe 2.2.2.4.), die an Basenposition 681 den Austausch  $^{679}\text{GAA} \rightarrow ^{679}\text{GAC}$  hervorruft. Des Weiteren wurde durch die PCR noch eine stille Mutation an Basenposition 696 eingefügt ( $^{692}\text{CC CGC G} \rightarrow ^{692}\text{CC CGG G}$ ), welche eine neue Schnittstelle für *XmaI* erzeugt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde mit *DpnI* verdaut, der Verdau aufgereinigt und in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert. Positive Klone mit mutierter DNS-Sequenz wurden nach einer Mini-Präparation durch das veränderte Restriktionsmuster nach einem Verdau mit *EcoRI* und *XmaI* identifiziert und zur Sequenzierung ausgewählt. Der so erhaltene Vektor pGEM-cgPrPE227D-1 wurde mit *EcoRI* und *XbaI* geschnitten, der Verdau gelelektrophoretisch aufgetrennt, das entstandene Fragment eluiert und in die *EcoRI*- und *XbaI*-Schnittstellen



des pCIneo-Vektors ligiert. Der gereinigte Ligationsansatz wurde in *E. coli* DH5 $\alpha$  transformiert und positive Klone nach Mini-Präparation durch Restriktionsanalyse identifiziert. Zur Transfektion von Säugerzellen wurde der Vektor pCI-cgPrPE227D-1-5 verwendet.

### **2.2.3. Methoden zur Arbeit mit Säugerzellkulturen**

#### **2.2.3.1. Allgemeine Kultivierungsbedingungen**

Adhärente Kaninchen-Nierenepithelzellen (RK13) (McCarthy *et al.*, 1963) wurden unter sterilen Bedingungen in DMEM (4,5 g/l Glucose, ohne Glutamin), welchem Penicillin und Streptomycin (Pen/Strep) und Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe) in der vom Hersteller empfohlenen Endkonzentration sowie 10 % (v/v) FBS (Pan Biotech, Aidenbach) beigemischt wurde, in 80 cm<sup>2</sup> Flaschen (Nunc, Wiesbaden) im Brutschrank bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Stabile Zellklone wurden wöchentlich mit auf 37°C vorgewärmten DPBS (Pan Biotech, Aidenbach) gewaschen und mit 2 $\times$  Trypsin-Lösung (Invitrogen, Karlsruhe) von der Kulturschale abgelöst und 1:5 zur Weiterkultivierung in warmen DMEM (mit Pen/Strep, Glutamax und 10 % FBS) aufgenommen. Stabile Klone von konstitutiv PrP-exprimierenden RK13-Zellen (McCarthy *et al.*, 1963) wurden mit 0,5 mg/ml Hygromycin B (Roche, Mannheim) kultiviert. Stabile Klone von induzierbar PrP-exprimierenden RK13-Zellen wurden mit 5  $\mu$ g/ml Puromycin kultiviert, wobei zur Induktion der Expression 4  $\mu$ g/ml Doxycyclin dem Medium zugesetzt wurden.

Die Zellkulturen wurden regelmäßig auf das Vorhandensein von Mycoplasmen getestet, wozu das PCR Mycoplasma Test Kit (AppliChem, Darmstadt) nach den Angaben des Herstellers verwendet wurde. Kontaminierte Kulturen wurden verworfen.

#### **2.2.3.2. Erzeugung stabiler Klone**

Zur Erzeugung stabiler Klone von konstitutiv PrP-exprimierenden RK13-Zellen wurden trypsinierte Zellen in eine 56,7 cm<sup>2</sup> Schale (Nunc, Wiesbaden) überführt und bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. 6  $\mu$ g Expressionsplasmid (pCIneo-Derivate, siehe 2.2.2.11. und 2.2.2.12.) und 2  $\mu$ g Resistenzplasmid (pHA58) wurden in 500  $\mu$ l

DMEM ohne FBS, Pen/Strep und Glutamax aufgenommen und mit 20  $\mu$ l in 500  $\mu$ l DMEM ohne FBS, Pen/Strep und Glutamax verdünntem Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) vermengt. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben, welche vorher mit DPBS gewaschen und mit Pen/Strep-freiem Medium überschichtet wurden. Nach 6 Stunden wurden das Transfektionsmedium von den Zellen abgenommen, mit DPBS gewaschen und frisches DMEM mit 10 % FBS und Glutamax (ohne Pen/Strep) auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 42 Stunden wurden durch die Zugabe von Hygromycin B (Roche, Mannheim) Selektionsbedingungen (1 mg/ml Hygromycin) eingestellt. Unter regelmäßigem Wechsel des Hygromycin-haltigen Mediums wurden Antibiotika-resistente Kolonien herangezogen. Um stabil PrP-exprimierende Zellklone zu erhalten, wurden die Antibiotika-resistenten Kolonien mit Trypsin von der Kulturschale gelöst (siehe 2.2.3.1.), mit DMEM mit 10 % FBS, Pen/Strep und Glutamax verdünnt und auf 96well-Kulturplatten (Nunc, Wiesbaden) vereinzelt. Die Hygromycin-resistenten Klone wurden von den 96well-Kulturplatten auf 21,5 cm<sup>2</sup> (Nunc, Wiesbaden) überführt, im Dot Blot auf ihre Expression des Prionproteins getestet und die dadurch identifizierten PrP-exprimierenden Klone zusätzlich im Western Blot analysiert. Ein geeigneter Klon wurde zur permanenten Kultivierung ausgewählt und die restlichen Klone zur Konservierung eingefroren (siehe 2.2.3.3.). Die unten gelisteten Klone wurden für die durchgeführten Experimente verwendet.

Zur Erzeugung stabiler Klone von RK13-Zellen zur Doxycyclin-induzierten Expression von PrP wurden RK13-Zellen wie für die konstitutiv exprimierenden Klone bis zu einer Konfluenz von 80-90 % kultiviert. 4  $\mu$ g Expressionsplasmid (pTRE-Derivate, siehe 2.2.2.11.6.), 2  $\mu$ g des für den Tetracyclin-Transaktivator kodierenden pTet-on und 2  $\mu$ g Resistenzplasmid (pSR2) wurden in 500  $\mu$ l DMEM ohne FBS, Pen/Strep und Glutamax aufgenommen und nach dem oben beschriebenen Protokoll für die Transfektion mit Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) fortgeföhren. Die Zellen wurden mit Puromycin (10  $\mu$ g/ml) selektioniert und es wurden, wie für die konstitutiv exprimierenden Zellen, Einzelklone erstellt. Das PrP-Expressionsniveau der Klone wurde durch Dot Blot- und Western Blot-Analyse der Lysate von mit Doxycyclin (4  $\mu$ g/ml) inkubierten Zellen überprüft.

**Tabelle 8:** Bezeichnung der Zell-Linien

Zell-Linie	Klon-Nummer
RK btPrP pHA	VIC4
RK cgPrP pHA	III B2
RK cgPrPE227D pHA	II16
RK cgPrPM109I pHA	III35
RK cgPrPM109L pHA	II20
RK cgPrPN155Y pHA	I7
RK cgPrPN155Y-N170S pHA	II14
RK cgPrPN170S pHA	I3
RK cgPrP-Tet	II C1
RK maPrP pHA	III29
RK mmPrP pHA	III34
RK oaPrP ARQ pHA	VIB3
RK oaPrPARR pHA	IV48
RK13	-

### 2.2.3.3. Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Zur dauerhaften Konservierung von RK13-Zellen wurden die entsprechenden Zell-Linien in eine 56,7 cm<sup>2</sup> Kulturschale (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 100 % kultiviert. Diese wurden dann mit DPBS gewaschen, mit 2×-Trypsin von der Kulturschale gelöst, in ein steriles 15 ml Schraubdeckelgefäß überführt und mit 500 upm für 5 min bei RT in einer pelletiert (Zentrifugen-Typ 5810R, Eppendorf, Hamburg). Das Pellet wurde in 1,8 ml FBS mit 10 % DMSO (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) resuspendiert, in ein steriles 2 ml Kryo-Gefäß (Nunc, Wiesbaden) umgefüllt und die Zellsuspension mit Hilfe eines Isopropanol-Gefriergefäßes (Nunc, Wiesbaden) langsam auf -80°C abgekühlt. Die gefrorenen Zellen wurden im Stickstofftank bei -120°C gelagert.

Zum Auftauen von gefrorener Zellen wurden diese zügig auf 37°C erwärmt und in eine 80 cm<sup>2</sup> Kulturflasche (Nunc, Wiesbaden) mit 10 ml DMEM (10 % FBS, Pen/Strep, Glutamax) überführt. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium gewechselt, um das aus dem Einfrier-Medium stammende DMSO zu entfernen.

#### **2.2.3.4. Proteinmarkierung mit <sup>35</sup>S**

Zur Markierung von zellulären Proteinen mit radioaktivem Schwefel (<sup>35</sup>S) wurden Säugerzellen in 21,5 cm<sup>2</sup> Schalen auf eine Konfluenz von 90 % Konfluenz kultiviert, mit DPBS gewaschen und mit 1,5 ml Minimal-Medium überschichtet. Zur Erzeugung von deglykosylierten Proteinen wurden dem Minimal-Medium 4 µl einer Tunicamycin-Lösung (10 mg/ml in DMSO) beigelegt. Nach einer Inkubation für 1 Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden 25 µl (0,35 mCi) Redivue-Promix (Amersham Biosciences, Freiburg) beigelegt und für 5 Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit vorgewärmten DPBS gewaschen, lysiert (siehe 2.2.4.8.) und aus den Lysaten durch Immunpräzipitation (siehe 2.2.4.9.) PrP<sup>C</sup> aufgereinigt.

#### **2.2.4. Methoden zur Protein-Analyse und Aufreinigung**

##### **2.2.4.1. Proteinkonzentrationsbestimmung**

###### **2.2.4.1.1. Bradford-Assay**

Die Bestimmung der Protein-Konzentration von Zell-Lysaten wurde durch eine modifizierte Methode von Bradford (Bradford, 1976) ermittelt. Dazu wurden 1 µl der zu analysierenden Protein-Lösung mit 200 µl Bradford-Reagenz (Bio-Rad, München) und 799 µl H<sub>2</sub>O vermischt, für 5 min bei RT inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm in einem Spectrophotometer Typ Ultrospec 3000 (Amersham Biosciences, Freiburg) fotometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration konnte anschließend anhand einer Eichkurve aus definierten BSA-Konzentrationen ermittelt werden. Es wurden in der Regel Proteinkonzentrationen von 1-10 µg/µl gemessen.

###### **2.2.4.1.2. Bicinchoninsäure-Assay**

Aufgrund der Interferenz des in der Aufreinigung von PrP<sup>Sc</sup> verwendeten Detergenz Zwittergent Sulfofetaine 3-14 (Calbiochem, Schwalbach) im Bradford-Assay wurde zur Bestimmung der Konzentration von aufgereinigten PrP<sup>Sc</sup>-Lösungen eine modifizierte Methode von Lowry *et al.* (Lowry *et al.*, 1951; Smith *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1989)

verwendet. Dazu wurden die Proben mit 1 ml Arbeitslösung des „Bicinchoninic acid“ (BCA) Kits (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versehen, nach den Angaben des Herstellers prozessiert und bei 562 nm in einem Spectrophotometer Typ Ultrospec 3000 (Amersham Biosciences, Freiburg) fotometrisch vermessen.

#### **2.2.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde eine diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) durchgeführt. Es wurden dafür Gelelektrophorese-Apparaturen für  $10 \times 10 \text{ cm}^2$  große Gele Typ Owl P8DS (VWR, Ismaning) verwendet, wobei 1/4 der Gel-Länge aus dem Sammelgel und 3/4 aus dem Trenngel bestand. Es wurden Trenngele mit 15 % und 10 % mit Acrylamid / Bisacrylamid-Lösung (Bio-Rad, München) erstellt.

Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Trenngellösung mit Isopropanol überschichtet und 30 min zur Polymerisierung bei RT stengelassen. Anschließend wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgellösung auf das Trenngel gegossen und der Kamm positioniert. Die Proteinproben wurden mit 5× Proteinprobenpuffer versetzt, 10 min bei 99°C aufgeköcht und nach Abkühlung zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard „Prestained SDS-PAGE standard – broad range“ (Bio-Rad, München) auf das Gel aufgetragen. Der Einlauf der Proben durch das Sammelgel in das Trenngel wurde durch Anlegen einer Spannung von 80 V für 40 min erreicht, wonach die Spannung für die Auftrennung der Proteine im Trenngel auf 140 V erhöht wurde.

#### **2.2.4.3. Western Blot-Analyse**

Um Proteine immunochemisch nachzuweisen, wurden eine SDS-PAGE durchgeführt und die aufgetrennten Proteine durch eine Elektroelution im „semi-dry“-Verfahren (Towbin *et al.*, 1979; Kyhse-Andersen, 1984) auf immobilisierende Immobilon-P PVDF-Membranen (Millipore, Eschborn) übertragen.

Dazu wurde die mit Methanol aktivierte Membran ( $7 \times 9 \text{ cm}$ ), das SDS-Polyacrylamidgel ohne Trenngel, sowie vier an die Größe der Membran angepasste GB 004 Gel-Blotting-Papiere (VWR, Ismaning) in Blotting-Puffer equilibriert, in der

Reihenfolge Blotting-Papiere (2×), Membran, SDS-Gel und Filterpapiere (2×) luftblasenfrei in eine Semiphor Transphor Blot-Apparatur (Amersham Biosciences, Freiburg) auf die Anoden-Platte gelegt, mit der Katoden-Platte abgedeckt und der Transfer für 1,5 h bei einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Gelfläche durchgeführt. Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation der Membran in Block-Puffer unter ständigem Schwenken für 1 h bei RT abgesättigt. Anschließend wurde die Membran in einer Lösung des in PBST-verdünnten Anti-PrP-Antikörpers über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  geschwenkt, zweimal für 30 min in PBST gewaschen, für 1 h in einer Lösung des in PBST-verdünnten Sekundär-Antikörpers geschwenkt, wieder zweimal für 30 min in PBST gewaschen und abschließend für 5 min in Chemilumineszenz-(CLZ)-Puffer inkubiert. Der CLZ-Puffer wurde abgossen, Puffer-Reste durch Abtupfen mit Zellstoff von der Membran entfernt und 0,5 ml CDP-Star Substrat-Lösung (Roche, Mannheim) auf die Membran getropft. Die Membran wurde dann mit Klarsichtfolie umhüllt, in einer Entwicklungskassette mit verschiedenen Expositionszeiten auf einen Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgelegt und in einer Entwicklungsmaschine Optimax Typ TR (MS Laborgeräte, Wiesloch) entwickelt.

Für den immunochemischen Nachweis der Proteine direkt auf der Membran wurde die Membran in 10 ml Alkalische Phosphatase-(AP)-Puffer gelegt und 45  $\mu\text{l}$  NBT- und 35  $\mu\text{l}$  BCIP-Lösung zugegeben. Die Reaktion wurde nach Erreichen einer adäquaten Proteinbandenintensität durch Spülen mit großen Mengen  $\text{H}_2\text{O}$  abgestoppt.

#### **2.2.4.4. Dot Blot-Analyse**

Zur Identifizierung PrP-exprimierender Klone bei der stabilen Transfektion von Säugerzellen (siehe 2.2.3.2.) wurden neben der Western Blot- auch eine Dot Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurde ein geeignetes Stück Nitrozellulosemembran (Bio-Rad, München) für 10 min in TBS-Puffer eingeweicht und nach den Angaben des Herstellers in die „Bio-Dot Microfiltration“ Apparatur (Bio-Rad, München) eingebaut, wobei freie Probenkammern mit Parafilm abgedichtet wurden. Die entsprechende Anzahl an Probenkammern wurde mit 100  $\mu\text{l}$  TBS-Puffer befüllt, welcher durch das Anlegen von Vakuum durch die Membran gesogen wurde, ohne jedoch die Membran vollständig auszutrocknen. Anschließend wurden 25  $\mu\text{l}$  Zell-Lysat eingefüllt, für 5 min

Vakuum angelegt, 100 µl TBS-Puffer in die Probenkammern gegeben und erneut für 5 min Vakuum angelegt. Die Apparatur wurde nach den Angaben des Herstellers auseinander gebaut, die Membran für 1 h bei RT unter Schütteln (700 upm) in Block-Puffer gegeben und für die weitere Durchführung wie bei der Western Blot-Analyse verfahren (siehe 2.2.4.3.).

#### **2.2.4.5. Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen**

Zur Visualisierung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen wurde für Proteinmengen von 0,1-5 µg die auf dem Colloidal Coomassie Brilliant Blue (Roth, Karlsruhe) beruhende Methode nach Neuhoff *et al.* (Neuhoff *et al.*, 1988) angewandt. Für Proteinmengen im Bereich von 1-100 ng wurde eine Silber-Färbung nach einem abgewandelten Protokoll von Heukeshoven und Dernick (Heukeshoven & Dernick, 1988) durchgeführt.

##### **2.2.4.5.1. Coomassie-Färbung**

In der Regel wurden die denaturierenden Polyacrylamidgele für ca. 30 min in Coomassie-Färbelösung bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Zur Entfärbung wurde das Gel für mehrere Stunden in Entfärber gegeben und unter mehrmaligem Wechsel des Entfärbers bis zu dem gewünschten Färbegrad entfärbt. Für die Färbung von Polyacrylamidgelen deren aufgetrennte Proteine noch für Massenspektrometrische Analysen herangezogen wurden, wurde Coomassie G250 verwendet.

##### **2.2.4.5.2. Silber-Färbung**

Für die Silber-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen wurden die Gele nach der Elektrophorese für 1 h in Fixierlösung geschwenkt, 3× 20 min mit Waschlösung gewaschen, anschließend 1 min in Vorbehandlungs-(VB)-Lösung inkubiert, 3× 20 s mit H<sub>2</sub>O gespült, für 20 min in Imprägnierlösung geschwenkt, erneut 3× 20 s mit H<sub>2</sub>O gespült und unter Beobachtung durch Inkubation in Entwickler die Färbungsreaktion gestartet. Die Färbezeiten betragen ungefähr 10 min und wurden bei ausreichender Färbung durch Schwenken der Gele für 10 min in Stopplösung abgebrochen.

Abschließend wurden die Gele für 20 min in Waschlösung gelegt und in H<sub>2</sub>O mit 20 % Glycerin gelagert.

#### **2.2.4.6. Proteolytischer Abbau von Proteinen mit Proteinase K**

Zum Nachweis der protease-resistenten Form des Prionproteins wurden die zu untersuchenden Proben mit Proteinase K (PK) verdaut. In der Regel wurde dafür eine PK-Konzentration von 100 µg/ml eingestellt und die Ansätze für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Der PK-Verdau wurde entweder durch Zugabe geeigneter Mengen PefaBloc Protease-Inhibitor (Roche, Mannheim) oder durch Aufkochen der Proben in SDS-PAGE-Probenpuffer (siehe 2.2.4.2.) abgestoppt. Ansätze von *in vitro* Konversionsreaktionen mit gereinigtem PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> wurden mit einer PK-Konzentration von 20 µg/ml verdaut (siehe 2.2.5.5.).

#### **2.2.4.7. Deglykosylierung von Glykoproteinen**

Die Abspaltung von Asparagin-gebundenen Zuckerresten von Glykoproteinen wurde durch Inkubation der Proteine mit PNGase F (New England Biolabs, Frankfurt) nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer durchgeführt. Es wurden 20-100 µg Protein mit 500 U PNGase F für 2 h bei 37°C inkubiert.

#### **2.2.4.8. Erstellung von Zell-Lysaten zur Protein-Analyse**

Zur Protein-Extraktion und Protein-Analyse wurden Lysate von Säugerzellkulturen erstellt. Dazu wurden die Zellen bis zur vollständigen Konfluenz auf 21,5 cm<sup>2</sup> Schalen (Nunc, Wiesbaden) kultiviert, mit vorgewärmten DPBS (Pan Biotech, Aidenbach) gewaschen und mit 200 µl kaltem HL+-Puffer überschichtet, welchem vor Gebrauch Complete Mini (ohne EDTA) Protease-Inhibitoren (Roche, Mannheim) in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration beigemischt wurden. Die Zellen wurden anschließend für 15 min bei 4°C gelagert, dann mit einem Zellschaber (Nunc, Wiesbaden) von der Kulturschale abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach kurzem Vortexen für 5 min bei 4°C mit 1000 × g in einer Tischzentrifuge



(Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

#### **2.2.4.9. Immunpräzipitation von $^{35}\text{S}$ -PrP<sup>C</sup>**

Zelluläres deglykosyliertes Prionprotein (PrP<sup>C</sup>) wurde mittels Immunpräzipitation aus Lysaten von  $^{35}\text{S}$ -markierten, Tunicamycin-behandelten Zellen (siehe 2.2.4.8.) nach einem abgewandelten Protokoll von Caughey *et al.* (Caughey *et al.*, 1999b) gewonnen. 200  $\mu\text{l}$  Zell-Lysat wurden mit 800  $\mu\text{l}$  Methanol vermischt, für mindestens eine Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert und anschließend für 20 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit  $4000 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und das Pellet in 500  $\mu\text{l}$  DLPC-Puffer unter Sonifizieren mit dem Ultraschallgenerator Sonoplus HD2200-UW2200 mit Beschallungsbecher BR30 (Bandelin, Berlin) für  $3 \times 20\text{s}$  mit 70 % Ausgangsintensität resuspendiert. Um den Anteil unspezifisch gebundener Proteine zu reduzieren wurden der Lösung 50  $\mu\text{l}$  einer 50 %igen Suspension von Protein-A-Sepharose (Amersham Biosciences, Freiburg) zugefügt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  für eine Stunde mit Hilfe eines Rotators (Neolab, Heidelberg) unter ständiger Vermischung inkubiert. Anschließend wurde die Protein-A-Sepharose abzentrifugiert ( $12000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 0,5 min), der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Präzipitations-Antikörper zugefügt (4  $\mu\text{l}$  RA3153 bzw. 200  $\mu\text{l}$  3B5 Zellkultur-Überstand) und für 3 Stunden bei  $4^{\circ}\text{C}$  rotiert. Dem Antikörper-haltigem Lysat wurden 100  $\mu\text{l}$  der 50 %igen Suspension von Protein-A-Sepharose hinzugefügt und über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die nun mit PrP<sup>C</sup> assoziierte Protein-A-Sepharose abzentrifugiert ( $12000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 0,5 min), in 500  $\mu\text{l}$  DLPC-Puffer aufgenommen, erneut abzentrifugiert und mit 1 ml IP-Waschpuffer resuspendiert. Die Suspension wurde 20 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  rotiert, zentrifugiert und der IP-Waschpuffer gewechselt. Nach weiteren 20 min der Inkubation, wurden die PrP<sup>C</sup>-Protein-A-Sepharose-Komplexe pelletiert ( $12000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ , 0,5 min), in 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen und in ein „low-binding“ Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und wieder zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und Reste des Überstandes sorgfältig mit einer feinen Spritze (Hamilton, Martinsried) abgenommen. Das zelluläre Prionprotein wurde von der Protein-A-Sepharose durch Inkubation mit 50  $\mu\text{l}$  0,1 M Essigsäure bei RT (30 min, 700 upm)

eluiert. Mit einer Hamilton-Spritze wurde das Eluat abgenommen, in ein „low-binding“ Reaktionsgefäß überführt und ein weiterer Elutionsschritt durchgeführt. Von den Eluaten wurden 4 µl mit 20 ml Rotiszint Szintillations-Cocktail (Roth, Karlsruhe) vermischt und die Aktivität in dem Szintillationsmessgerät TRI-CARB 2900TR (Perkin Elmer, Rodgau) vermessen.

#### **2.2.4.10. Aufreinigung von PrP<sup>Sc</sup>**

Zur Aufreinigung von PrP<sup>Sc</sup> wurde ein modifiziertes Protokoll nach Hope *et al.* (Hope *et al.*, 1986) verwendet. Dazu wurde aus 2 g infiziertem Hirn mittels eines vorgekühlten Glashomogenisators (Schütt Labortechnik, Göttingen) mit Homogenisierungspuffer 5 %iges Hirnhomogenat hergestellt. Ein Aliquot von 500 µl wurde für Western Blot- bzw. Silbergel-Analysen bei -80°C eingefroren. Das restliche Homogenat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aufgeteilt und in einer auf 10°C gekühlten Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) für 30 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und zusammengeführt. Ein Aliquot von 500 µl wurde für Western Blot- bzw. Silbergel-Analysen weggefroren. Der restliche Überstand wurde auf drei Polyallomer-Röhrchen (Science Service, Augsburg) verteilt und in einer Ultrazentrifuge Typ Optima LE-80K (Beckman-Coulter, Krefeld) im SW40Ti-Rotor für 2,5 Stunden bei 10°C mit 34.800 upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen, zusammengeführt, ein Aliquot von 500 µl bei -80°C eingefroren und die drei Pellets jeweils in 700 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Das Volumen wurde auf 1,4 ml aufgefüllt und mit 70 µl Tris-Puffer (1M Tris-HCl pH 8,0) versetzt. Dazu wurde RNase A (Roche, Mannheim) in einer Endkonzentration von 5 ng/µl gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die RNase-verdauten Ansätze wurden jeweils auf 4,5 ml aufgefüllt, wobei mit geeigneten Stamm-Lösungen 0,6 M Kaliumjodid, 6 mM Natriumthiosulfat, 1 % Sarcosyl und 10 mM Natriumphosphat pH 8,5 eingestellt wurde. Die drei Ansätze wurden vereint und auf zwei frische Polyallomer-Röhrchen (Science Service, Augsburg) aufgeteilt, in denen 2 ml eines Sucrose-Kissens vorgelegt wurde. Anschließend wurden die Ansätze bei 10°C für 1,5 Stunden bei 40.000 upm mit dem SW40Ti-Rotor zentrifugiert (Beckman-Coulter, Krefeld). Der Überstand wurde erneut abgenommen und vereint, ein Aliquot von 500 µl für Western Blot- bzw. Silbergel-Analysen abgenommen, das Pellet mit 1 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) bei 10°C für 30 s pelletiert. Der Überstand wurde

verworfen und das Pellet mit Hilfe des Ultraschallgenerators Sonoplus HD2200-UW2200 mit Beschallungsbecher BR30 (Bandelin, Berlin) für 2× 20 s bei 40 % Ausgangsintensität in 100 µl PBS mit 0,5 % (w/v) Zwittergent Sulfofetaine 3-14 (Calbiochem, Schwalbach) resuspendiert und in ein 1,5 ml „low-binding“ Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt.

Für die durchgeführten Experimente wurden von jedem Prion-Stamm insgesamt 8 g Hirn benötigt. Die erstellten PrP<sup>Sc</sup>-Präparationen sind in Tabelle 9 aufgelistet.

**Tabelle 9:** Bezeichnung der PrP<sup>Sc</sup>-Isolate

Organismus	Prion-Stamm	Herkunft	Bezeichnung
CL57/BI6 Wt-Maus, <i>Prnp-a</i>	RML	ZNP (München)	RML
CL57/BI6 Wt-Maus, <i>Prnp-a</i>	ME7	ZNP (München)	ME7
Hamster	263K	RKI (Berlin)	263K
Rind	BSE	VLA (Weybridge, UK)	BSE
Rötelmaus	139A	ISS (Rom, Italien)	cg139A
Rötelmaus	Scrapie Italy (Ss3)	ISS (Rom, Italien)	cgSs3
Rötelmaus	301C	ISS (Rom, Italien)	cg301C
Rötelmaus	BSE-SH	ISS (Rom, Italien)	cgBSE
Schaf (ARQ/ARQ)	Scrapie UK	VLA (Weybridge, UK)	Scrap UK
Schaf (ARQ/ARQ)	Scrapie Italy (Ss3)	ISS (Rom, Italien)	Scrap Italy

Die Konzentration in den PrP<sup>Sc</sup>-Präparationen wurde durch Western Blot-Analyse (siehe 2.2.4.3.) nach PK-Verdau und Deglykosylierung im Vergleich mit rekombinantem Prionprotein mit definierter Menge ermittelt. Die Gesamt-Proteinkonzentration wurde mit der BCA-Methode vermessen und zur Kontrolle der Reinheit SDS-Gele mit anschließender Silberfärbung angefertigt (siehe 2.2.4.5.2.).

**Tabelle 10:** Protein-Konzentrationen und PrP<sup>Sc</sup>-Gehalt der PrP<sup>Sc</sup>-Präparationen

Prion Stamm	Gesamt-Protein [µg/µl]	PrP <sup>Sc</sup> (Western Blot) [ng/µl]
cg139A	1,2	130
cgSs3	1,4	104
cgBSE	0,7	113

cg301C	0,8	305
ME7	1,2	216
RML	0,8	-
Scrap UK	0,7	225
Scrap Italy	7,0	186
BSE (Präp. I)	0,6	121
BSE (Präp. II)	0,4	86
263K	1,0	235

#### 2.2.4.11. Aufreinigung von rekombinantem Prionprotein

Rekombinantes Prionprotein (rPrP) wurde aus in Ernte-Puffer resuspendierten Expressionskulturen von *E. coli* (siehe 2.2.1.7.) nach einem abgewandelten Protokoll von Liemann und Glockshuber (Liemann & Glockshuber, 1999; Giese *et al.*, 2004) aufgereinigt. Nach Lyse der Zellen wurde das rPrP aus den intrazellulären Einschlusskörpern gelöst, durch Ionen-Austauscherchromatographie von dem Großteil der zellulären Proteine getrennt, oxidiert, über eine Nickel-Affinitätssäule aufgereinigt und abschließend in die  $\alpha$ -helikale Form zurückgefaltet.

Für die Lyse der Zellen wurde der Zellsuspension Benzonase (0,075 U/ $\mu$ l), RNase (0,38  $\mu$ g/ml), Lysozym (1,8 mg/ml) und Triton X-100 (0,75 %) zugefügt und die Zellen durch Inkubation für 20 min bei 37°C unter Schütteln bei 250 upm aufgeschlossen. Das Lysat wurde durch Zentrifugation mit 12.000 upm bei 4°C für 25 min zentrifugiert (Zentrifuge 5804 R, Eppendorf, Hamburg), das Pellet in 15 ml kaltem Wasch-Puffer resuspendiert, wieder zentrifugiert (30 min, 12.000 upm, 4°C), das Pellet erneut in 15 ml kaltem Wasch-Puffer resuspendiert und für 15 min bei 4°C mit 12.000 upm zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde in 10 ml kaltem Resuspensionspuffer aufgenommen, für 5 min zentrifugiert (4°C, 12.000 upm), der Überstand in Polyallomer-Röhrchen (Science Service, Augsburg) überführt und mit 35.000 upm bei RT für 30 min in einer Ultrazentrifuge Typ Optima LE-80K (Beckman-Coulter, Krefeld) im SW40Ti-Rotor zentrifugiert. Die bei diesen Resuspensionsschritten anfallenden Überstände wurden durch Coomassie-Färbung einer SDS-PAGE-Analyse auf ihren rPrP-Gehalt überprüft.

Der durch die Ultrazentrifugation gewonnene rPrP-haltige Überstand wurde zur weiteren Aufreinigung einer Kationen-Austauscherchromatographie unterzogen. Dazu wurde eine Säule aus Fractogel EMD-SO<sub>3</sub> (VWR, Ismaning) nach den Empfehlungen

des Herstellers erstellt und in eine FPLC-Einheit (Amersham Biosciences, Freiburg) integriert, wobei der EMD-SO<sub>3</sub>-Säule zur Vorreinigung durch Anionen-Austauscherchromatographie noch eine Säule aus Fractogel EMD-DEAE (VWR, Ismaning) vorgeschaltet wurde. Die Säulen wurden mit Niedrigsalzpuffer equilibriert und der rPrP-haltige Überstand aus dem Zellaufschluss durch die Säulen geleitet. Die Elution der auf der EMD-SO<sub>3</sub>-Säule gebundenen rPrP-Moleküle erfolgte durch Anhebung der NaCl-Konzentration von 150 mM auf 400 mM, indem der Anteil an Hochsalzpuffer in der Durchflusslösung graduell von 30 % auf 80 % erhöht wurde. Das Eluat wurde in Fraktionen von 2 ml aufgefangen, wobei die Elution durch Messung der Leitfähigkeit und der Absorption bei 280 nm verfolgt wurde. Der Anteil an rPrP im Durchlauf und in den Eluaten wurde durch Coomassie-Färbung einer SDS-PAGE überprüft.

Die rPrP-haltigen Eluate wurden zusammengeführt, mit Oxidationspuffer auf 100 ml aufgefüllt und für 3 h bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 mM EDTA und Absenken des pH-Wertes auf pH 7,0 abgestoppt.

Nach der Oxidation wurde die Aufreinigung mit einer Nickel-Affinitätschromatographie fortgesetzt. Dazu wurde 75 %ige Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences, Freiburg) mit 0,1 M NiCl<sub>2</sub> inkubiert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Ni-Äquilibriumspuffer gewaschen. Auf 2 ml vorbehandelter Sepharose wurden mit 50 mg rPrP gegeben, welches vorher mit 0,1 mM NiCl<sub>2</sub> versetzt wurde. Der Ansatz wurde für 3 h bei RT inkubiert und die Suspension in mit einer Filterplatte versehene Polyprep Chromatographiesäule (Bio-Rad, München) gegeben. Die Säule wurde dreimal mit Ni-Waschpuffer gewaschen und das gebundene rPrP durch wiederholte Gabe von Elutionspuffer von der Säule gelöst. Der Durchlauf, die durchgelaufenen Waschlösungen und die Eluate wurden durch Coomassie-Färbung einer SDS-PAGE analysiert. Die rPrP-haltigen Eluate wurden zusammengefügt, durch Kationenaustauscherchromatographie mit einer Säule aus Fractogel EMD-SO<sub>3</sub> (VWR, Ismaning) aufkonzentriert und durch langsames Verdünnen (1:50) in 10 mM MES-Puffer pH 6,0 unter Rühren bei 4°C für 4 h zurückgefaltet.

Das zurückgefaltete rPrP wurde anschließend mittels Centriprep YM10 (Millipore, Eschborn) bei 2.000 × g aufkonzentriert und dreimal gegen 0,5 Liter 2 mM MES-Puffer pH 6,0 dialysiert. Durch Zentrifugation für 30 min mit 17.000 upm bei 4°C wurden

verbleibende rPrP-Aggregate abzentrifugiert, der Überstand mit einem gleichen Volumen Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

#### **2.2.4.12. Umpufferung von rekombinantem Prionprotein**

Zur Markierung von rPrP mit Fluoreszenzfarbstoffen und zur Erzeugung von rPrP-Oligomeren nach Post *et al.* (Post *et al.*, 1998) wurde das nach Dialyse in 50 % Glycerin bei -20°C gelagerte rPrP durch Gelfiltration in 10 mM Natriumphosphat-Puffer überführt. Abhängig von den weiterführenden Experimenten wurde ein pH-Wert von pH 6,0 oder pH 7,2 eingestellt, sowie dem Puffer 0,1 % NP40 oder 0,2 % SDS beigefügt. Dazu wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß 200 µl Sephadex G-15 (Amersham Biosciences, Freiburg) gegeben und in 1 ml Natriumphosphat-Puffer aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 800 µl in eine Microspin Mobicols Säule (MoBiTec, Göttingen) gegeben, dessen Ausfluß welche vorher mit einer Filterscheibe (35 µm Porengröße) versehen wurde. Die Säulen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt, für 1 min mit 700 × g bei RT zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend wurden 300 µl Natriumphosphat-Puffer auf die Säule gegeben, erneut für 1 min bei 700 × g bei RT zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dies wurde 3× wiederholt und die Säule abschließend für 2 min mit 700 × g bei RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die rPrP-Stammlösung auf die Säule gegeben (max. 50 µl pro Säule) und für 2 min mit 700 × g bei RT zentrifugiert.

#### **2.2.4.13. Fluoreszenz-Markierung von rPrP**

Um die Aggregation von rPrP mittels Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (FCS) zu untersuchen, wurden die rPrP-Moleküle mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor488 und Alexa Fluor647 (MoBiTec, Göttingen) markiert. Dabei wurde die Reaktion der als Succinimidylester vorliegenden Farbstoffe mit den Aminogruppen der Lysin-Seitenketten des Proteins für die Verknüpfung ausgenutzt.

Um die Reaktion durchführen zu können, wurden 10 µg der in 50 % Glycerin bei -20°C gelagerten rPrP-Stammlösung (siehe 2.2.4.11.) durch Gelfiltration in Natriumphosphat-Puffer (10 mM, pH 6,0) mit 0,1 % NP40 umpuffert (siehe 2.2.4.12.). Die umpufferte rPrP-Lösung wurde mit 0,1× Volumen Natrium-Bicarbonatlösung (1M,

pH 8,3) versehen und mit geeigneten Mengen einer Verdünnung (1:10 in DMSO) der Farbstoffe versehen. Die Farbstoffmenge wurde dabei so gewählt, dass im Durchschnitt zwei Farbstoffmoleküle an ein rPrP-Molekül gebunden wurden. Die Reaktion wurde über Nacht bei 4°C unter Lichtausschluss durchgeführt und anschließend durch Zentrifugation der Ansätze durch zwei wie in 2.2.4.12. mit Natrium-Phosphatpuffer (10mM, pH 6,0, 0,1 % NP40) erstellte Säulen aus Sephadex G-25 (Amersham Biosciences, Freiburg) von freien Farbstoffmolekülen getrennt. Zur Kontrolle der Markierungsrate wurden 1:100 Verdünnungen in Natriumphosphat-Puffer (10 mM, pH 7,2) mit 0,2 % SDS erstellt und eine FCS-Analyse vor und nach einem PK-Verdau (0,1 mg/ml) durchgeführt. Die Ansätze wurden abschließend aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### **2.2.4.14. Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie**

Das Aggregationsverhalten von Fluoreszenz-markierten, rekombinanten Prionproteinen wurde mittels Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (FCS) untersucht (Schwille *et al.*, 1997; Giese *et al.*, 2000; Giese *et al.*, 2004). FCS-Messungen wurden bei Raumtemperatur mit einem Insight Reader (Evotec OAI, Hamburg) in mit einem Glasboden versehenen 96well-Platten (Evotec OAI, Hamburg) in einem Reaktionsvolumen von 20-30 µl durchgeführt. Zur Anregung der mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa488 und Alexa647 markierten rPrP-Moleküle (siehe 2.2.4.13.) wurden zwei Laser mit den Wellenlängen 488 nm und 633 nm durch ein 40× Objektiv in das Probevolumen fokussiert. Die Anregungsleistung betrug dabei 200 µW bei 488 nm und 300 µW bei 633 nm. Die Messzeit lag in der Regel zwischen 10 und 20 s. Bei Messungen mit "Beams Scanner" wurde im Probenvolumen eine Strecke von 100 µm mit 50 Hz auf einer Länge von 2000 µm von den Lasern gescannt. Das von den markierten rPrP-Molekülen emittierte Licht wurde durch eine entsprechende Optik mit einer Blende von 70 µm auf zwei Photonen-Detektoren geleitet. Die so erhaltenen Fluoreszenzdaten wurden mit der FCSppEvaluation Software v2.0 (Evotec OAI, Hamburg) ausgewertet.

#### 2.2.4.15. Kovalente Vernetzung von PrP-Aggregaten

Um Aggregate des Prionproteins kovalent zu verknüpfen, wurde eine foto-induzierte Vernetzungsmethode abgewandelt nach Fancy und Kodadek (Fancy & Kodadek, 1999) angewendet. Die zu vernetzenden Proben (20-500  $\mu$ l) wurden dazu bei reduziertem Raumlicht in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und eine geeignete Konzentration an Ruthenium-Bipyridylchlorid (Ru(bpy)) und Ammonium Persulfat (APS) eingestellt. Die Ansätze wurden anschließend bis zum Deckelrand durch eine kreisförmige Öffnung (1 cm Durchmesser) in den Innenraum einer mit Aluminiumfolie ausgekleideten Pappschachtel ( $10 \times 14 \times 5 \text{ cm}^3$ ) geschoben, welche in 5 cm Entfernung von der Probe mit einer Öffnung von 2 cm Durchmesser versehen war. Durch diese Öffnung wurde die Probe mit einem Fotoblitz Mecablitz 32CT3 (Metz, Zirndorf) 1-10 $\times$  belichtet, wobei Neutralfilter (Linos, München) mit unterschiedlicher Durchlässigkeit (0,1 %, 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 50 % und 100 %) zwischen Lichtquelle und Probe gebracht wurden, wodurch die Intensität des auf die Probe treffenden Lichts und damit der Grad an kovalenter Vernetzung beeinflusst werden konnte.

Es wurden sowohl Aggregate von rPrP (in Natriumphosphat-Puffer 10 mM pH 7,2 mit 0,01-0,2 % SDS), aufgereinigtes PrP<sup>Sc</sup> (in PBS mit 0,5 % Zwittergent Sulfbetaine 3-14) als auch PrP<sup>Sc</sup> in 10 %igem Hirnhomogenat nach dieser Methode vernetzt, wobei die eingestellte Konzentration von Ru(bpy) und APS abhängig von der Proteinkonzentration und dem gewünschten Vernetzungsgrad variierte. PrP<sup>Sc</sup> in 10 %igem Hirnhomogenat wurde durch 1:100 Verdünnung von Hirnhomogenat aus infizierten Hamstern mit Hirnhomogenat aus gesunden Tieren erstellt und vor der Vernetzung einem Zyklus PMCA unterzogen. In der Regel wurde für die Vernetzung von rPrP in nanomolaren Konzentrationen mit 5  $\mu$ M Ru(bpy) und 100  $\mu$ M APS gearbeitet und für die Vernetzung von gereinigtem PrP<sup>Sc</sup> und rPrP in micromolaren Konzentrationen 0,1 mM Ru(bpy) und 2 mM APS eingestellt. Durch Variation der Konzentrationen von Ru(bpy) und APS sowie durch die Verwendung von Neutralfiltern mit unterschiedlicher Durchlässigkeit wurden die Vernetzungsbedingungen für die einzelnen Experimenten optimiert.

Die Vernetzungsprodukte wurden entweder durch FCS-Messung, Western Blot-Analyse oder Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE analysiert, wobei vor der Western Blot-Analyse von vernetztem PrP<sup>Sc</sup> ein PK- und PNGase-Verdau durchgeführt wurde. Das



Molekulargewicht der Vernetzungsprodukte wurde von Abbildungen der Western Blot-Analyse bzw. Coomassie-Färbungen nach SDS-PAGE mit Hilfe der Software GeneTools v3.04.04 (SynGene, Cambridge, UK) bestimmt.

#### **2.2.4.16. Massenspektrometrie**

Zur massenspektrometrischen Analyse von vernetzten Prionprotein-Aggregaten (siehe 2.2.4.15.) wurde eine SDS-PAGE der zu untersuchenden Proben durchgeführt und das Gel einer Coomassie-Färbung (Coomassie G250) unterzogen. Die dadurch sichtbaren Proteinbanden wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten, in 500 µl H<sub>2</sub>O überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Zur weiteren Prozessierung wurden die Proteine durch einen tryptischen Verdau aus der Gelbande eluiert. Dazu wurden die Gelbanden zweimal für 30 min bei 37°C in 200 µl H<sub>2</sub>O und anschließend zweimal für 5 min bei 37°C in 150 µl Acetonitril (50 %) inkubiert. Die auf diese Weise vorbehandelten Bande wurden dann für 5 min zum Trocknen stehen gelassen, mit 2 µl einer 200 ng/µl Trypsin-Lösung (Promega, Mannheim) versehen und mit 50 µl Ammonium-Bicarbonat-Lösung überschichtet. Der Trypsin-Verdau wurde über Nacht bei 37°C mit 700 upm durchgeführt, wodurch die entstehenden Peptide aus dem Gel in die Bicarbonat-Lösung diffundierten, welche abgenommen und in ein frisches 1,5 ml “low binding”-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) überführt wurde. Die Peptid-Lösung wurde mit Hilfe der Kationenaustauscher-Spitzen ZipTip C18 (Millipore, Eschborn) nach den Empfehlungen des Herstellers aufgereinigt und für die massenspektrometrische Analyse eingesetzt. Die massenspektrometrische Analyse mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorptions-Ionisations-Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) oder Elektrospray-Ionisation-Flugzeitmassenspektrometrie (ESI-TOF-MS) wurde im Zentrallabor für Proteinanalytik (ZfP, München) durchgeführt.

#### **2.2.5. *In vitro* Konversionsreaktionen**

##### **2.2.5.1. *In vitro* Konversion durch Inkubation von Hirnhomogenat**

*In vitro* Konversionsreaktionen basierend auf der Inkubation von Hirnhomogenat wurden nach Lucassen *et al.* durchgeführt (Lucassen *et al.*, 2003). Ähnlich wie bei der PMCA (siehe 2.2.5.2.) wurde dazu mit Hilfe eines Glashomogenisators (Schütt

Labortechnik, Göttingen) ein 10 %iges (w/v) Hirnhomogenat von Prion-infizierten und uninfizierten Tieren (Hamstern oder Rötelmäusen) in PBS erstellt. Bei der Erstellung des Hirnhomogenates der uninfizierten Tiere wurde jedoch kein Detergens verwendet. Bei der Erstellung des Hirnhomogenats der infizierten Tiere wurde 1 % (v/v) Triton X-100 hinzugegeben. Die Homogenate wurden mit  $200 \times g$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Complete Protease-Inhibitoren ohne EDTA (Roche, Mannheim) versehen und in Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Reaktionen wurde das infizierte Hirnhomogenat in der Regel 1:50 in PBS mit 1 % (v/v) Triton X-100 verdünnt und dann 1:1 mit uninfiziertem Hirnhomogenat vermengt. Die Reaktionsansätze (Endkonzentrationen: 5 %iges Hirnhomogenat mit 0,5 % Triton X-100) wurden in 50-100  $\mu\text{l}$  Aliquots für 16 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln (300 upm) inkubiert. Zur Auswertung wurden 20  $\mu\text{l}$  der Reaktionsansätze mit Proteinase K verdaut (100  $\mu\text{g/ml}$ ) und im Western Blot analysiert. Durch den Vergleich der Bandenintensitäten vor und nach der Inkubationsreaktion wurde der Amplifikationsfaktor ermittelt ( $F_{\text{Amp}} = I_{+\text{Ink}} / I_{-\text{Ink}}$ ). Eine Variante dieser Reaktion ist die serielle Inkubationsreaktion, bei der nach 16 h Inkubation der Ansatz in 5 % Hirnhomogenat von gesunden Tieren mit 0,5 % Triton X-100 verdünnt und erneut einer Inkubation von 16 h unterzogen wird. Wird dies mehrmals hintereinander durchgeführt, kommt es zu einer starken Verdünnung des eingesetzten  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Materials.

#### **2.2.5.2. "Protein Misfolding Cyclic Amplification"-Reaktion**

Die „Protein Misfolding Cyclic Amplification“-Reaktion (PMCA) ist ein *in vitro* Konversionsverfahren, bei dem die misgefaltete Form des Prionproteins in 10 %igem Hirnhomogenat amplifiziert wird (Saborio *et al.*, 2001). Dazu wurde mit Hilfe eines Glashomogenisators (Schütt Labortechnik, Göttingen) 10 %iges (w/v) Hirnhomogenat von Prion-infizierten und uninfizierten Tieren (Hamstern oder Rötelmäusen) in PBS mit 0,5 % (v/v) Triton X-100 und 0,05 % SDS (w/v) erstellt, welches mit  $1000 \times g$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 5 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde mit Complete Protease-Inhibitoren ohne EDTA (Roche, Mannheim) versehen und in Aliquots bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zum Ansetzen der Reaktion wurde Hirnhomogenat infizierter Tiere in der Regel 1:100 mit uninfiziertem Homogenat verdünnt. 200  $\mu\text{l}$  dieses Ansatzes wurden mit einem Ultraschallgenerator Sonoplus HD2200-UW2200 mit Stabsonotrode SH 70G / MS 73

(Bandelin, Berlin) in der Regel  $5 \times 1$  s bei 40 % Ausgangsintensität sonifiziert und anschließend für 1 h bei 37°C mit 300 upm inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend kurz zentrifugiert, gevortext und erneut sonifiziert und inkubiert. Diese Runden von Sonifizieren und Inkubieren wurden für einen vollen PMCA-Zyklus in der Regel zehn Mal durchgeführt, wobei die Sonotrode nach jeder Runde mit H<sub>2</sub>O gespült wurde.

Für bestimmte Fragestellungen wurde eine Variante der PMCA, die sogenannte serielle PMCA (sPMCA) durchgeführt (Bieschke *et al.*, 2004; Piening *et al.*, 2005; Castilla *et al.*, 2005). Dazu wurde nach jedem PMCA-Zyklus der Reaktionsansatz mit Hirnhomogenat uninfizierter Tiere verdünnt und ein erneuter PMCA-Zyklus durchgeführt. Durch die mehrfache Wiederholung dieser Verdünnungsschritte mit anschließendem PMCA-Zyklus wurde eine starke Verdünnung des eingesetzten infektiösen Ausgangsmaterials erreicht.

20 µl der PMCA-Reaktionsansätze wurden zur Auswertung mit Proteinase K verdaut (100 µg/ml) und im Western Blot analysiert. Durch Vergleichen der Bandenintensitäten vor und nach der PMCA wurde der Amplifikationsfaktor ermittelt ( $F_{\text{Amp}} = I_{+\text{PMCA}} / I_{-\text{PMCA}}$ ).

Zur Beurteilung der Infektiösität von PMCA-Proben wurden die Reaktionsansätze 1:10 in PBS verdünnt und 50 µl intrazerebral (*i.c.*) nach der Methode von Kimberlin und Walker (Kimberlin *et al.*, 1986) durch die Arbeitsgruppe von Miachel Beekes am Robert-Koch-Institut (Berlin) geblindet in syrische Goldhamster inokuliert (9 Tiere pro Kontrollgruppe) und die Inkubationszeiten bis zur terminalen Erkrankung und der infektiöse Titer [50 % *i.c.* lethale Dosis (LD<sub>50</sub>)] mit Hilfe von Dosis-Inkubationszeit-Kurven nach Kimberlin und Walker (Kimberlin *et al.*, 1986) ermittelt.

### **2.2.5.3. *In vitro* Konversion mit Hirnhomogenat und Zell-Lysat**

Die Konversion des zellulären Prionproteins in seine misgefaltete Form ist *in vitro* auch durch die Inkubation von Zell-Lysat mit infektiösem Hirnhomogenate möglich (Vorberg *et al.*, 1999). Dazu wurden PrP<sup>C</sup>-exprimierenden Zellen in geeigneter Dichte mit einem Zell-Schaber (Nunc, Wiesbaden) von der Kulturschale gelöst und in PBS mit 0,5 % (v/v) Triton X-100, 0,05 % (w/v) SDS und Complete Protease-Inhibitoren ohne EDTA (Roche, Mannheim) ein 10% (w/v) Zell-Lysat erstellt. Das Lysat wurde mit  $1000 \times g$  für 1 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand 8:1 mit infektiösem

10 %igem Hirnhomogenat versetzt. Das infektiöse Hirnhomogenat wurde in PBS mit 0,5 % Triton X-100 und 0,05 % SDS nach dem Protokoll der PMCA erstellt (siehe 2.2.5.2.). Die Ansätze wurden 96 h bei 37°C unter Schütteln (300 upm) inkubiert und mit PK (20 µg/ml) für 1 h bei 37°C verdaut. Durch geeignete Kombination von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> sowie durch geeignete Wahl des Antikörpers wurde neugebildetes PK-resistentes PrPres differentiell in der Western Blot-Analyse detektiert.

#### **2.2.5.4. *In vitro* Konversion mit gereinigtem rPrP und PrP<sup>Sc</sup>**

Zur *in vitro* Konversion von gereinigtem rekombinanten Prionprotein (rPrP) durch gereinigtes PrP<sup>Sc</sup> nach Kirby *et al.* (Kirby *et al.*, 2003) wurde 200 ng aufgereinigtes rPrP (siehe 2.2.4.11.) mit 1 µg gereinigtem PrP<sup>Sc</sup> (siehe 2.2.4.10.) in rPrP-Konversionspuffer in einem Reaktionsvolumen von 20 µl für 24 h bei 37°C unter Schütteln (300 upm) inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf 40 µl aufgefüllt und 1/20 des Reaktionsansatzes mit 43 µl H<sub>2</sub>O und 2 µl BSA (10 mg/ml) versetzt und mit vier Volumen Methanol bei -20°C über Nacht gefällt. Die restlichen 19/20 wurden einem PK-Verdau (0,06 mg/ml) durch Inkubation bei 37°C für 1h unterzogen. Der PK-Verdau wurde durch Zugabe von PefaBloc (Roche, Mannheim) abgestoppt (1 mM) und nach Zugabe von 2 µl BSA (10 mg/ml) mit vier Volumen Methanol bei -20°C über Nacht gefällt. Die Ansätze wurden durch Zentrifugation mit 14.000 upm bei 4°C für 30 min pelletiert, der Überstand sorgfältig abgenommen und das Pellet mit Protein-Probenpuffer für die Western Blot-Analyse vorbereitet (siehe 2.2.4.3.). Durch eine geeignete Kombination von rPrP und PrP<sup>Sc</sup> sowie durch die Wahl des primären Antikörpers konnte neu gebildetes PrPres in der Western Blot-Analyse differentiell detektiert werden.

#### **2.2.5.5. *In vitro* Konversion mit gereinigtem PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>**

Für *in vitro* Konversionsexperimente mit gereinigtem PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> wurde PrP<sup>C</sup>, welches durch Immunpräzipitation aus <sup>35</sup>S-markiertem Säugerzell-Lysat gewonnen wurde (siehe 2.2.4.9.), mit aufgereinigtem PrP<sup>Sc</sup> (siehe 2.2.4.10.) in Konversionspuffer für 3 Tage in einem Reaktionsvolumen von 30 µl bei 37°C in „low binding“ Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) nach einer abgewandelten Methode von Caughey *et al.* inkubiert (Caughey *et al.*, 1999b). Dabei wurden 15.000 cpm PrP<sup>C</sup>

eingesetzt und die dadurch variierende Menge an Essigsäure im Reaktionsansatz durch Zugabe von Essigsäure (0,1 M) ausgeglichen. Bei Überschreiten des Essigsäurevolumens über 20 % des Reaktionsvolumens wurde das PrP<sup>C</sup>-Volumen vor der Reaktion eingeengt.

Die zugeführte PrP<sup>Sc</sup>-Menge variierte abhängig vom untersuchten Prion-Stamm (ca. 0,4-1 µg) und wurde anhand von Konzentrationsreihen, in denen die Konversionseffizienz im homologen System (PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> mit gleicher Aminosäuresequenz) bei verschiedenen PrP<sup>Sc</sup>-Mengen ermittelt wurde, optimiert. Es wurde die PrP<sup>Sc</sup>-Menge, mit welcher die höchste Konversionseffizienz erzielt werden konnte, für alle weiteren Reaktionen eingesetzt. Abhängig vom Prion-Stamm wurde dem Reaktionspuffer noch 0,4 M (Scrap Italy, BSE) bzw. 0,7 M (Scrap UK) Guanidinium-Hydrochlorid (GndHCl) beigefügt.

Nach Inkubation der Konversionsreaktionen wurden die Ansätze für 0,5 min bei 5000 upm zentrifugiert und ein Zehntel des Reaktionsansatzes in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in welches 11 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl 10× TN-Puffer und 4 µl Thyroglobulin (5 mg/ml) vorgelegt wurden. Dieser Teil der Ansätze wurde nicht mit Proteinase K behandelt. Der verbleibende Reaktionsansatz wurde mit 61 µl H<sub>2</sub>O, 10 µl 10× TN-Puffer und 2 µl einer Proteinase K-Lösung (1 mg/ml) versehen und für eine Stunde bei 37°C inkubiert (PK-Endkonzentration: 20 µg/ml).

Der Verdau wurde anschließend durch Zugabe von 5 µl einer Stammlösung (100 mM) PefaBloc Protease-Inhibitor (Roche, Mannheim) abgestoppt und den Ansätzen 8 µl Thyroglobulin (5 mg/ml) zugeführt. Thyroglobulin diente als „Carrier“-Protein in der sich anschließenden Methanol-Fällung, die durch die Zugabe von 4 Volumen Methanol zu den verdauten (450 µl) und den unverdauten (80 µl) Proben initiiert wurde. Die Proben wurden nach Inkubation über Nacht bei -20°C für 45 min mit 14.000 upm bei 4°C zentrifugiert, der Methanol-Überstand sorgfältig abgenommen und das Pellet durch Zugabe von 15 µl H<sub>2</sub>O und 5 µl 5× Proben-Puffer für die SDS-PAGE-Analyse vorbereitet (siehe 2.2.4.2.).

Die Gele wurden nach Abschluss der Elektrophorese für 30 min in Gelfixierlösung geschwenkt, anschließend in Amplify (Amersham Biosciences, Freiburg) überführt und für weitere 30 min inkubiert. Die auf diese Art vorbehandelten Gele wurden mit einem Geltrockner Modell 583 (Bio-Rad, München) bei 80°C für 2 h unter Vakuum getrocknet und für 3 Tage auf eine Fujifilm „Imaging plate“ BAS-IP MS 2325 bzw. 2025 (Raytest,

Straubenhardt) zur Exposition aufgelegt. Die Platten wurde in einem Fujifilm Phosphorimager Typ BAS 1800 II (Raytest, Straubenhardt) ausgelesen und die Daten mit der Densitometrie-Software AIDA V3.44.035 (Raytest, Straubenhardt) ausgewertet. Dabei wurde von den verdauten und unverdauten Proben die Banden-Intensitäten vermessen und die Intensität abzüglich der Intensität des Hintergrundes bestimmt. Bei den verdauten Proben wurden nur die Banden im Bereich von 18-24 kDa in die Rechnung einbezogen. Die Konversionseffizienz (KVE) wurde durch die Formel  $KVE [\%] = [I_{+PK} / (I_{-PK} * 10)] * 100$  ermittelt. Zusätzlich wurden die getrockneten Gele anschließend noch auf einen Kodak BioMax MR1 Film (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgelegt, für 2 Wochen bei -80°C exponiert und anschließend entwickelt.

#### **2.2.5.6. *In vitro* Konversion von rekombinantem Prionprotein**

Zur Erzeugung von Oligomeren aus rPrP nach Post *et al.* (Post *et al.*, 1998) wurden ein Aliquot der Glycerin-haltigen rPrP-Stammlösung (siehe 2.2.4.11.) in Natriumphosphat-Puffer (10 mM pH 7,2) mit 0,2 % SDS umgepuffert (siehe 2.2.4.12.). Zur Initiierung der rPrP-Aggregation wurde die umgepufferte rPrP-Lösung mit Natriumphosphat-Puffer (10 mM, pH 7,2) verdünnt, wodurch eine SDS-Konzentration von 0,01-0,03 % eingestellt wurde. Die Ansätze wurden anschließend bei RT für 3-5 h unter Schütteln mit 300 upm inkubiert.

Es wurden sowohl unmarkierte als auch Fluoreszenz-markierte (siehe 2.2.4.13.) rPrP-Moleküle mit dieser Methode in Oligomere überführt. Die Aggregation von unmarkiertem rPrP wurde nach kovalenter Vernetzung der Oligomere (siehe 2.2.4.15.) durch Coomassie-Färbung oder Western Blot-Analyse nach SDS-PAGE überprüft (siehe 2.2.4.5.1. und 2.2.4.3.). Die Aggregation von markiertem rPrP wurde im Insight Reader (Evotec OAI, Hamburg) über die Zeit bzw. als Endpunktmessung analysiert oder nach kovalenter Vernetzung der Oligomere eine Western Blot-Analyse durchgeführt (siehe 2.2.4.14 und 2.2.4.3.).

In der Regel wurde die Oligomerisierung für FCS-Messungen mit einer Proteinkonzentrationen von 2 nM, für Western Blot-Analysen von 20 nM und für die Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE mit einer Proteinkonzentrationen von 1 µM durchgeführt.

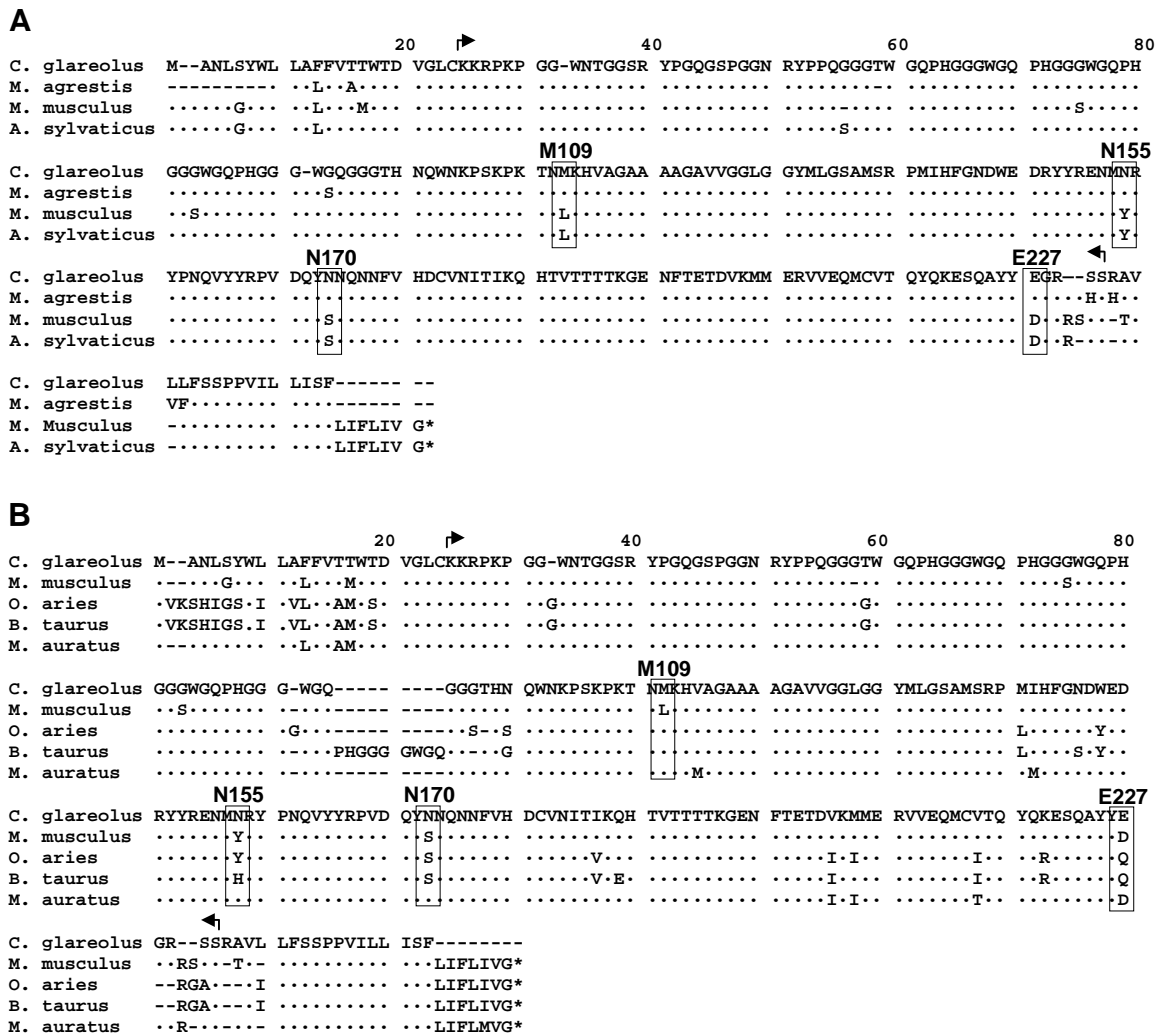
## 3. Ergebnisse

### 3.1. Primärsequenz und Speziesbarriere

#### 3.1.1. Vergleich der Aminosäuresequenzen

Infektionsstudien an Rötelmäusen (*Clethrionomys glareolus*) haben gezeigt, dass diese wilde Nagetierspezies im Vergleich zur Hausmaus (*Mus musculus*) weitaus sensitiver gegenüber einer Infektion mit Scrapie aus Schafen ist und sich als resistent gegenüber einer Infektion mit BSE aus Rindern erweist (Cartoni *et al.*, 2005) (Agrimi, unveröffentlicht). Die Inokulation weiterer wild-lebender Mausarten zeigte, dass die Erdmaus (*Microtus agrestis*) bezüglich der Infektion mit Schaf-Scrapie Ähnlichkeiten zur Rötelmaus zeigt, wohingegen die Infektionsdaten der Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) Ähnlichkeiten mit denen der Hausmaus aufweisen. Da die Speziesbarriere bei der Übertragung von Prionkrankheiten unter anderem durch die Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz der Prionproteine der Empfängerspezies und des inokulierten PrP<sup>Sc</sup> bestimmt wird (Scott *et al.*, 1989; Scott *et al.*, 1993; Schätzl *et al.*, 1995; Prusiner & Scott, 1997), ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der untersuchten Nagerspezies sinnvoll, um Aminosäurereste in der Primärsequenz auszumachen, welche für die differentielle Empfindlichkeit der Rötelmaus gegenüber Scrapie und BSE verantwortlich sein könnten (Abbildung 1A). Im reifen Prionprotein lassen sich vier Codons ausmachen (109, 155, 170, 227), an denen sich die Aminosäuresequenz der Rötelmaus und der Erdmaus gleichen, jedoch von der Hausmaus und der Waldmaus unterscheiden. Bemerkenswerterweise spiegelt die Sequenzidentität des Prionproteins die taxonomische Gliederung wieder, da Rötel- und Erdmaus zu den *Arvicolinae* und *Microtinae*, Haus- und Waldmaus hingegen zu den *Murinae* gezählt werden.

Auch ein Vergleich der Aminosäuresequenzen des Prionproteins von Rötel- und Hausmaus mit denen vom Schaf (*Ovis aries*) und Rind (*Bos taurus*) macht deutlich, dass vor allem die Codons 155, 170 und 227 Unterschiede aufweisen (Abbildung 1B).



**Abbildung 1:** Vergleich der Aminosäuresequenzen des Prionproteins

A) Sequenzvergleich des Prionproteins von Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*; Genbank-Nummer: AF367624), Erdmaus (*Microtus agrestis*; Genbank-Nummer: AF367625), Hausmaus (*Mus musculus*; Genbank-Nummer: U29186) und Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*; Genbank-Nummer: AF367623). B) Sequenzvergleich des Prionproteins von Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*; Genbank-Nummer: AF367624), Hausmaus (*Mus musculus*; Genbank-Nummer: U29186), Schaf (Genotyp ARQ) (*Ovis aries*; Genbank-Nummer: AJ000739), Rind (*Bos taurus*; Genbank-Nummer: AJ298878) und Syrischer Goldhamster (*Mesocricetus auratus*; Genbank-Nummer: M14054). Die Aminosäurereste, die für die differentielle Empfindlichkeit der Rötelmaus gegenüber Scrapie und BSE verantwortlich sein könnten, sind mit einem Rahmen markiert. Die Nummerierung der Codons erfolgte auf Grundlage der Sequenz der Rötelmaus. Die Pfeile markieren den Sequenzbereich des reifen Prionproteins nach Abspaltung der ER- und GPI-Anker-Signalsequenz. Punkte markieren Sequenzidentität mit der Rötelmaus, Striche innerhalb der Sequenzen markieren Lücken in der Sequenzausrichtung aufgrund von zusätzlichen Aminosäureresten, Striche am N- oder C-Terminus symbolisieren unbekannte Sequenzbereiche und Sterne markieren Stop-Codons.



### **3.1.2. Evaluation verschiedener Konversionsreaktionen**

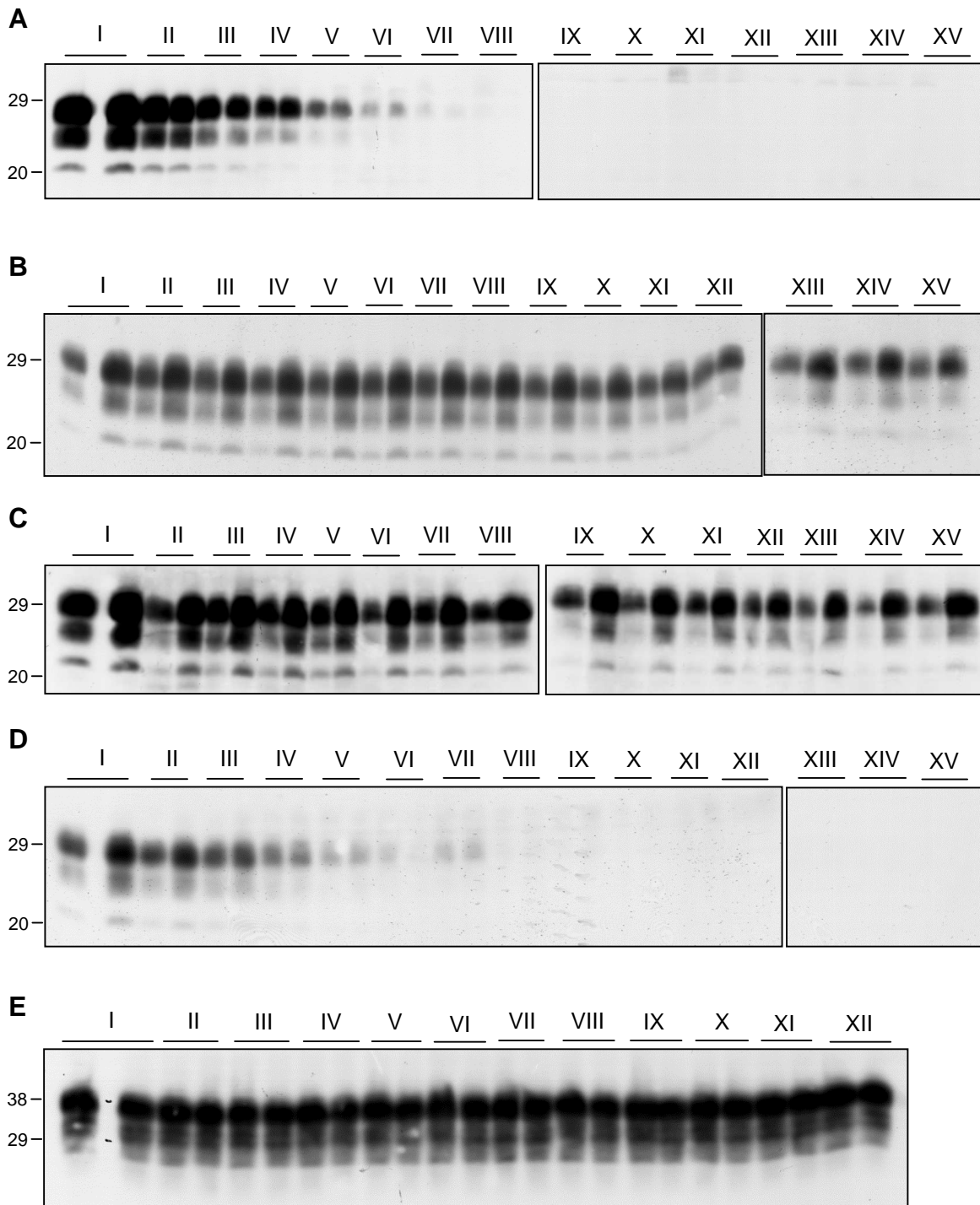
Zur Beurteilung der Rolle der Primärsequenz für die differentielle Empfindlichkeit der Rötelmaus gegenüber einer Infektion mit Scrapie vom Schaf und BSE vom Rind, wurden verschiedene *in vitro* Konversionsreaktionen auf ihre Eignung überprüft, die missgefaltete Form des Prionproteins der Rötelmaus zu propagieren und die Rolle der Primärsequenz zu beurteilen.

#### **3.1.2.1. Konversionsreaktionen basierend auf Hirnhomogenat**

##### **3.1.2.1.1. Voraussetzungen zur Erzeugung von Infektiösität *in vitro***

Auf der Grundlage von Hirnhomogenat konnte mit zwei verschiedenen Reaktionsvarianten die Konversion des Prionproteins in seine missgefaltete Form *in vitro* gezeigt werden (Saborio *et al.*, 2001; Lucassen *et al.*, 2003). Beide Methoden ähneln sich in ihren Reaktionsbedingungen und beinhalten die Verdünnung von Hirnhomogenat von infizierten Tieren mit Hirnhomogenat von uninfizierten Tieren (siehe 2.2.5.1. und 2.2.5.2.). Bei der Methode von Lucassen *et al.* wird der Reaktionsansatz bei 37°C inkubiert (Lucassen *et al.*, 2003), bei der Technik von Saborio *et al.* wird die Inkubationszeit noch von Ultraschallbehandlungen regelmäßig unterbrochen (Saborio *et al.*, 2001). Beide Reaktionen sind für die Konversion von Hamster-PrP<sup>C</sup> durch den Hamster-Prionenstamm 263K optimiert. Eine Variante der PMCA-Technik ist die sogenannte serielle PMCA (sPMCA). Dabei wird das Reaktionsprodukt eines PMCA-Zyklus mit Hirnhomogenat von gesunden Individuen verdünnt und erneut einem PMCA-Zyklus unterzogen. Dies wird seriell über mehrere PMCA-Zyklen wiederholt und führt zu einer entsprechenden Verdünnung des PrP<sup>Sc</sup>-Ausgangsmaterials. Durch die sPMCA konnte die autokatalytische Vermehrung von PrPres demonstriert werden (Bieschke *et al.*, 2004).

Um die allgemeinen Reaktionsbedingungen zu optimieren und genauer zu beurteilen, welche Faktoren für die autokatalytische Vermehrung von PrPres entscheidend sind, wurde basierend auf Hamster-PrP<sup>C</sup> und 263K eine vergleichende Analyse der sPMCA und seriellen Inkubationsreaktionen nach Lucassen *et al.* durchgeführt (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Western Blot-Analyse von seriellen PrPres Amplifikationsreaktionen

In seriellen PMCA-Reaktionen (A-C) bestand ein Amplifikationszyklus aus 10 Runden alternierender Ultraschallbehandlung und Inkubation. Die Proben wurden 1:2,0 (A, B) oder 1:2,5 (C) mit uninfiziertem Hirnhomogenat verdünnt und erneut 10 Runden alternierender Ultraschallbehandlung und Inkubation unterzogen. Dies wurde 15-fach wiederholt (I-XV). Aliquots von 20  $\mu$ l wurden vor und nach einem Amplifikationszyklus entnommen, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, mit Proteinase K verdaut und im Western Blot analysiert. Wenn die Probenanzahl die

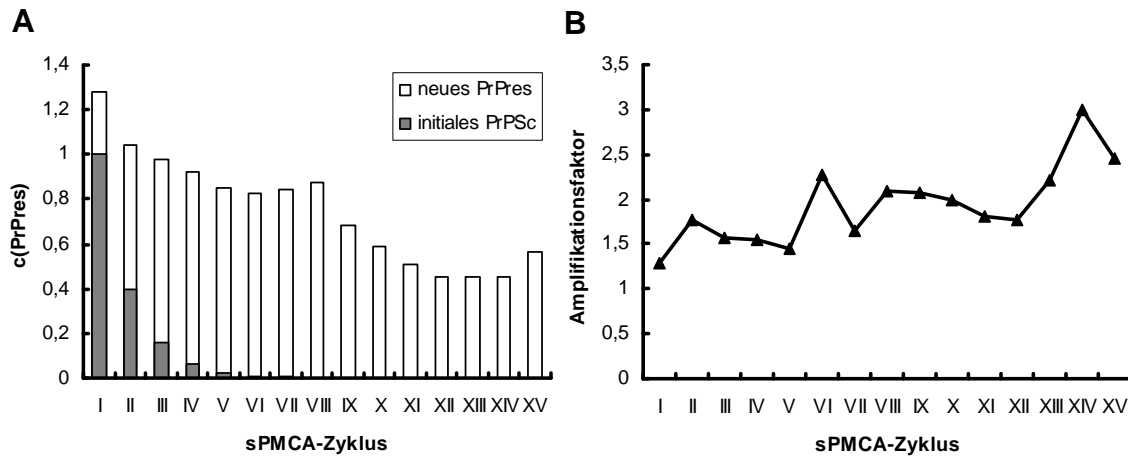
Ladepazität des Gels überstieg (A-D), wurden zwei Gele mit Referenzproben verwendet und gleichzeitig analysiert. Zur Kontrolle wurden Reaktionen ohne Inkubation durchgeführt (A). In seriellen Amplifikationsreaktionen ohne Ultraschallbehandlung (D, E) bestand der Amplifikationszyklus aus 16 h Inkubation. Die Ansätze wurden anschließend 1:2,0 in uninfiziertem Hirnhomogenat verdünnt und wieder einer Inkubation von 16 h unterzogen. Insgesamt wurden 15 Inkubationszyklen (I-XV) durchgeführt. Wie auch bei den Proben der seriellen PMCA wurden vor und nach der Amplifikation Aliquots entnommen, bei -80°C gelagert und ohne (E) oder mit (D) Behandlung durch Proteinase K im Western Blot analysiert. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards sind linksseitig dargestellt (in kDa).

Abbildung 2B und 2C zeigt eine Western Blot-Analyse einer sPMCA-Reaktion mit vierzehn sequenziellen 2,0- bzw. 2,5-fachen Verdünnungen. Das initiale PrP<sup>Sc</sup>-Material wurde dabei um den Faktor 16.384 bzw. 372.529 verdünnt. Für den Reaktionsansatz mit 2,5-facher Verdünnung lag nach dem letzten Zyklus noch ungefähr 57 % des Ausgangssignals vor (Abbildung 3A). Der Amplifikationsfaktor variierte während der Reaktion zwischen 1,3 und 3,0 (Abbildung 3B), woraus sich ein durchschnittlicher Amplifikationsfaktor von  $1,9 \pm 0,2$  und eine über 200.000-fache Gesamtamplifikation des PrPres nach 15 Zyklen errechnet. In dem Experiment mit der 2,0-fachen Verdünnung wurde eine über 10.000-fache Gesamtamplifikation von PrPres mit einem durchschnittlichen Amplifikationsfaktor von  $1,8 \pm 0,02$  erreicht.

Um auszuschließen, dass die Ultraschallbehandlung oder andere experimentelle Bedingungen außer des initialen PrP<sup>Sc</sup> die PrPres-Bildung hervorruft, wurden Reaktionen ohne PrP<sup>Sc</sup> nur mit Hirnhomogenat uninfizierter Tiere durchgeführt. Nach Verdau der Proben mit Proteinase K konnte zu keinem Zeitpunkt des Experiments PrPres detektiert werden (Daten nicht abgebildet), was verdeutlicht, dass die PrPres-Bildung von dem eingesetzten PrP<sup>Sc</sup> abhängig ist.

Die Vergrößerung der PrP<sup>Sc</sup>-Aggregate während der Inkubationsphase, ihre Zerkleinerung durch die Ultraschallbehandlung und die dadurch erzeugte Vermehrung von neuen Aggregationskeimen ist die theoretische Grundlage der PrPres-Amplifikation durch die PMCA (Saborio *et al.*, 2001). Daher müssten sowohl die Inkubationsphasen als auch die Ultraschallbehandlungen für eine effiziente autokatalytische Vermehrung des missgefalteten Prionproteins entscheidend sein. Um dies darzustellen, wurden Reaktionen durchgeführt, in welchen die Proben ohne Inkubation nur sonifiziert wurden (Abbildung 2A). Die reine Ultraschallbehandlung erzeugte keine PrPres-Amplifikation,

wodurch das PrPres-Signal, ähnlich wie bei Proben, die ohne Inkubation und Ultraschall nur verdünnt wurden (Daten nicht abgebildet), schon nach dem siebten Verdünnungsschritt unter die Nachweisgrenze des Western Blots fiel.



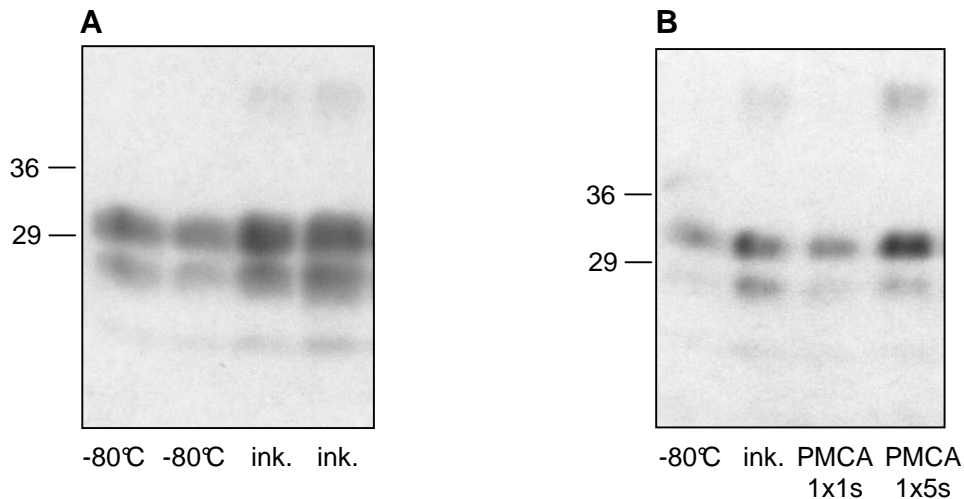
**Abbildung 3:** Auswertung der seriellen PMCA-Reaktion

Western Blot-Analysen der seriellen PMCA-Reaktion mit 2,5-facher Verdünnung (Abbildung 2C) wurden quantifiziert. A) Darstellung des Verlaufs der relative Menge des initialen PrP<sup>Sc</sup> (gefüllte Balken) und der Menge des neu gebildeten PrPres (ungefüllte Balken) während der sPMCA-Reaktion. B) Die Amplifikationsfaktoren nach jedem Zyklus wurden durch den Vergleich der Bandenintensitäten nach ( $I_{nachAmp}$ ) und vor ( $I_{vorAmp}$ ) der Amplifikation ermittelt (Amplifikationsfaktor =  $I_{nachAmp} / I_{vorAmp}$ ).

Um zu überprüfen, ob die Inkubation alleine effizient genug ist, um PrPres über mehrere Verdünnungen zu amplifizieren, wurde die Amplifikationsreaktion von Lucassen *et al.* durchgeführt, welche ohne die Ultraschallbehandlung die PrPres-Bildung begünstigt (Lucassen *et al.*, 2003). Wie bei der seriellen PMCA wurden abwechselnd Inkubations- und Verdünnungsschritte durchgeführt. Für die Western Blot-Analyse wurden vor und nach den Verdünnungen Proben genommen und einem PK-Verdau unterzogen (Abbildung 2D). Nach der ersten Inkubationsphase wurde, ähnlich wie in jedem sPMCA-Zyklus (Abbildung 3B), ein Amplifikationsfaktor von 2,1 erreicht (Abbildung 1D, Zyklus I). Trotzdem sank der Amplifikationsfaktor nach dem ersten und zweiten Verdünnungsschritt auf 1,4 bzw. 1,1 (Abbildung 2D, Zyklus II und III). Als Folge des schnell absinkenden Amplifikationsfaktors fiel das PrPres-Niveau schon nach der siebten Verdünnung unter die Nachweisgrenze des Western Blots.

Obwohl die Experimente unter sterilen Bedingungen durchgeführt und frisches Hirnhomogenat nach jedem Inkubationsschritt von 16 h hinzugefügt wurde, ist eine Degradation von PrP<sup>C</sup> während dieser langen Inkubationsperiode von insgesamt 240 h denkbar. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden Western Blot-Analysen von den Proben der seriellen Inkubationsreaktion ohne PK-Verdau durchgeführt (Abbildung 2E). Das PrP<sup>C</sup>-Niveau war über alle Passagen konstant, weshalb eine Substratdegradation als Ursache für den abnehmenden Amplifikationsfaktor ohne Ultraschallbehandlung ausgeschlossen werden kann. Es ist daher anzunehmen, dass das Zerschneiden der Aggregate durch die Ultraschallbehandlung und die damit einhergehende Vermehrung von konversionsaktiven Einheiten eine Voraussetzung für die effiziente autokatalytische Propagation von PrPres *in vitro* darstellt (Piening *et al.*, 2005).

Durch intrazerebrale Inokulation des sPMCA-Produkts nach 15 PMCA-Zyklen mit 2,5-facher serieller Verdünnung aus Abbildung 2B in Hamster konnte für das neugebildete PrPres Infektiösität nachgewiesen werden. Ein Vergleich mit der Infektiösität von Proben, welche ohne Inkubation und Ultraschallbehandlung um den Faktor 372.529 verdünnt wurden, ergab, dass die Infektiösität der sPMCA-Proben um den Faktor 1840 amplifiziert wurde. Die Infektiösität des *in vitro* erzeugten PrPres war jedoch wie auch von Castilla *et al.* in ähnlichen Versuchen beobachtet wurde (Castilla *et al.*, 2005) geringer als die Infektiösität des sPMCA-Ausgangsmaterials (Weber *et al.*, *Nature*, submitted). Der infektiöse Titer der sPMCA-Proben betrug  $4,6 \times 10^2$  LD<sub>50i.c.</sub> und der des Ausgangsmaterials  $1,3 \times 10^4$  LD<sub>50i.c.</sub>. Durch Koppelung des generierten PrPres an Nitrozellulose konnte der Unterschied in der Infektiösität des sPMCA-Produkts und des Ausgangsmaterials ausgeglichen werden. Nach Kopplung des sPMCA-Produkts und des Ausgangsmaterials an Nitrozellulose betrug der infektiöse Titer der sPMCA-Proben  $8,8 \times 10^2$  LD<sub>50i.c.</sub> und der des Ausgangsmaterials  $2,8 \times 10^3$  LD<sub>50i.c.</sub>. Dies deutet darauf hin, dass sich *in vitro* durch sPMCA-Reaktionen erzeugtes PrPres bezüglich der Infektiösität nicht von aus infizierten Hirnen gewonnenem PrP<sup>Sc</sup> unterscheidet, wenn die PrPres-Aggregate einer bestimmten Größenverteilung gerecht werden (Weber *et al.*, *Nature*, submitted).



**Abbildung 4:** *In vitro* Konversionsreaktionen auf der Grundlage von Hirnhomogenat

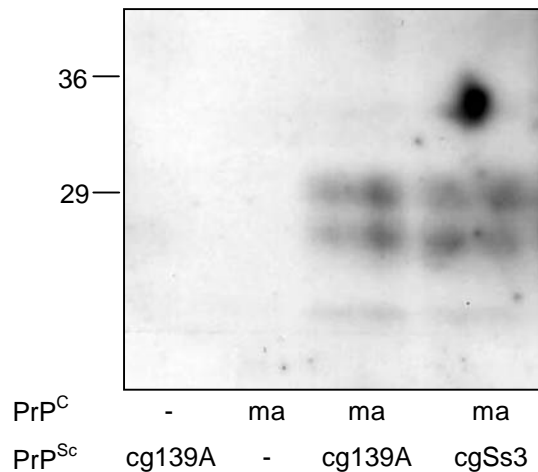
A) Inkubationsreaktion mit Hirnhomogenat von Rötelmäusen. Hirnhomogenat von mit 139A infizierten Tieren wurde 1:100 mit Hirnhomogenat uninfizierter Tiere verdünnt und 16 h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne Inkubation bei -80°C bis zur Western Blot-Analyse gelagert. Abgebildet sind jeweils zwei unabhängigen Ansätze. B) PMCA-Reaktionen mit Hirnhomogenat von Rötelmäusen. Hirnhomogenat von Tieren infiziert mit 139A wurde mit Hirnhomogenat uninfizierter Tiere 1:100 verdünnt und 10 Runden alternierender Ultraschallbehandlung (1x 1 s oder 1x 5 s; 40% Ausgangsintensität) und Inkubation bei 37°C unterzogen. Als Kontrollen wurde ein Ansatz ohne PMCA direkt bei -80°C eingefroren und ein Ansatz ohne Ultraschallbehandlung bei 37°C inkubiert. Western Blot-Analysen wurden nach einem Verdau der Proben durch Proteinase K mit dem polyklonalen Antikörper RA3153 durchgeführt. Der Molekulargewichtsstandard ist linksseitig in kDa angegeben.

### 3.1.2.1.2. Beurteilung der Rolle der Rötelmaus-Speziesbarriere

Die Protease-resistente Isoform des Prionproteins der Rötelmaus lässt sich sowohl mit der Inkubationsreaktion von Lucassen *et al.* als auch durch die PMCA amplifizieren (Abbildung 4). Da diese Reaktionen jedoch auf Hirnhomogenat, also auf einer komplexen Lösung aus Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden, basieren und da ohne entsprechende transgene Tiere, die Analyse von Punktmutationen schwierig ist, sind diese *in vitro* Konversionsreaktionen zwar zur Untersuchung von Prion-Erregerstämmen einsetzbar (Soto *et al.*, 2005), jedoch zur Beurteilung der Rolle der Primärsequenz für die Speziesbarrieren der Rötelmaus eher ungeeignet.

### 3.1.2.2. Konversionsreaktion mit Hirnhomogenat und Zell-Lysat

Eine Variante der auf Hirnhomogenat basierenden *in vitro* Konversionsreaktionen ist die Methode von Vorberg *et al.* (Vorberg *et al.*, 1999). Bei diesem *in vitro* Konversionsverfahren wird das PrP<sup>Sc</sup> auch über Hirnhomogenat infizierter Tiere in die Reaktion gegeben, das PrP<sup>C</sup> jedoch über Lysate von Zellkulturen bereitgestellt. Abbildung 5 zeigt, dass sich durch diese Technik die Konversionsaktivität von Rötelmaus-PrP<sup>Sc</sup> *in vitro* demonstrieren lässt. Allerdings wurde dabei als PrP<sup>C</sup>-Quelle eine Hamster-PrP<sup>C</sup>-exprimierende RK13-Zell-Linie verwendet. Dies ermöglicht die Unterscheidung des neu gebildeten PrPres von dem eingesetzten PrP<sup>Sc</sup> durch die Wahl des Antikörpers in der anschließenden Western Blot-Analyse PK-verdauter Proben. Das Bindungsepitop des 3F4-Antikörpers ist M109 / M112. Der Antikörper erkennt daher das neu gebildete Hamster-PrPres (M109 / M112) aber nicht das eingesetzte PrP<sup>Sc</sup> der Rötelmaus (M109 / V112). Die Konversion des Hamster-PrP<sup>C</sup> ist sowohl mit dem Errgerstamm 139A als auch mit Ss3 aus Rötelmäusen möglich. Ohne die Zugabe von PrP<sup>C</sup> oder ohne PrP<sup>Sc</sup> entsteht kein PK-resistentes Prionprotein.



**Abbildung 5:** *In vitro* Konversion auf der Grundlage von Hirnhomogenat und Zell-Lysat  
Zell-Lysat von Hamster-PrP<sup>C</sup> exprimierender RK13-Zellen (ma) wurde mit Hirnhomogenat von Rötelmäusen infiziert mit 139A (cg139A) oder Ss3 (cgSs3) inkubiert. Die Proben wurden nach einem PK-Verdau im Western Blot mit dem 3F4-Antikörper analysiert. Der Molekulargewichtsstandard ist links in kDa angegeben.

Die Verwendung von Zellkultur-Lysat als PrP<sup>C</sup>-Quelle ermöglicht grundsätzlich die Einführung von Punktmutationen und somit die Analyse der Rolle der Primärsequenz für die Speziesbarriere. Da jedoch komplexes Zell-Lysat und nicht aufgereinigtes Protein eingesetzt wird, ist eine differentielle Trennung von eingesetztem PrP<sup>Sc</sup> und neugebildetem PrPres über eine radioaktive Proteinmarkierung nicht möglich. Wie in Abbildung 5 dargestellt ist jedoch eine Unterscheidung über ein differentielles Antikörper-Epitop möglich. Da aber die zur Verfügung stehenden Antikörper, wie z.B. 3F4 oder 7G5 in Bereichen liegen (Kascsak *et al.*, 1987; Kascsak *et al.*, 1997), die für die Speziesbarrieren der Rötelmaus verantwortlich sein könnten (siehe 3.1.1.), ist dieser *in vitro* Konversionsassay für umfangreiche Analysen zur Rolle der Primärsequenz ungeeignet.

### 3.1.2.3. Konversionsreaktionen mit gereinigtem rPrP und PrP<sup>Sc</sup>

Die Unterscheidung von eingesetztem PrP<sup>Sc</sup> und neu gebildetem PrPres durch ein differentielles Antikörper-Epitop ist auch in Abbildung 6A dargestellt. Hier wurde allerdings nach einer Methode von Kirby *et al.* (Kirby *et al.*, 2003) gereinigtes rekombinantes Prionprotein vom Hamster (M109 / M112) mit gereinigtem PrP<sup>Sc</sup> aus Rötelmäusen (M109 / V112) inkubiert und das neu gebildete PrPres über den 3F4-Antikörper im Western Blot detektiert. Durch die Verwendung von gereinigtem rPrP und gereinigtem PrP<sup>Sc</sup> sind die an der Reaktion beteiligten Makromoleküle im Wesentlichen auf rPrP und PrP<sup>Sc</sup> beschränkt. Wie aus Abbildung 6A ersichtlich, sind in den Kontrollreaktionen jedoch neben rPrP in der Western Blot-Analyse mit dem 3F4-Antikörper noch weitere Banden zu erkennen. Diese Banden stammen von dimeren Prionproteinen aus der rPrP-Präparation, sowie von Kreuzreaktionen mit dem zur Protein-Präzipitation verwendeten BSA und von Kreuzreaktionen mit Verunreinigungen aus der PrP<sup>Sc</sup>-Präparation. Deutlich ist jedoch das Auftreten von Protease K-resistenten Banden aus der Konversion von Hamster-rPrP durch 139A der Rötelmaus, wodurch wie auch bei dem *in vitro* Konversionsverfahren nach Vorberg *et al.* (Vorberg *et al.*, 1999) (siehe 3.1.2.2.) die generelle Konvertierbarkeit von Hamster-PrP durch PrP<sup>Sc</sup> der Rötelmaus deutlich wird. Ohne rPrP und bei Inkubation mit einer Präparation aus uninfizierten Rötelmäusen entsteht kein Hamster-PrPres.

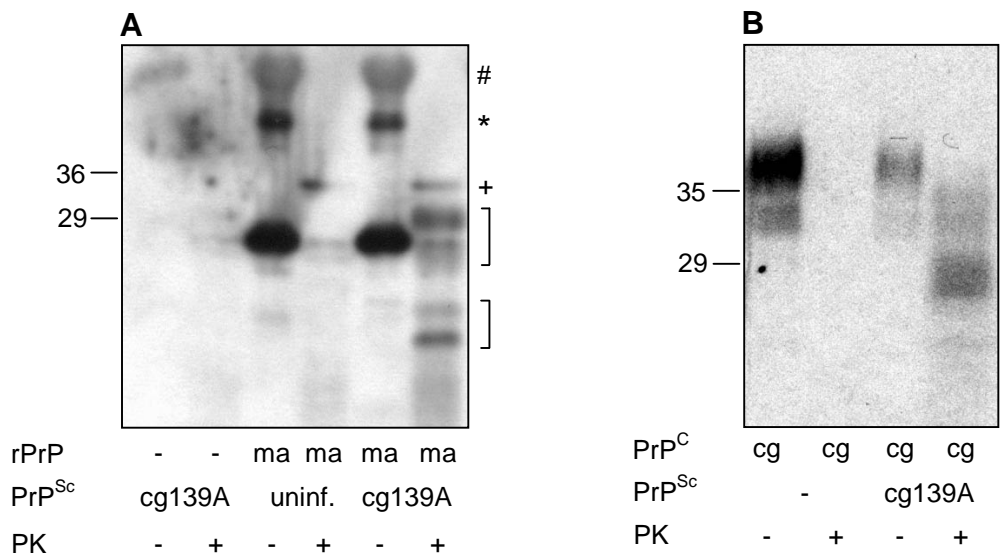
Da in dem Protokoll nach Kirby *et al.* rekombinantes PrP verwendet wird, ist die Analyse von Punktmutationen zur Beurteilung der Rolle der Primärsequenz für die



Speziesbarrieren der Rötelmaus mit dieser Methode durchführbar. Wie oben beschrieben (siehe 3.1.2.2.), eignet sich die Verwendung eines differentiellen Antikörper-Epitops jedoch nicht für umfangreiche Studien zur Speziesbarriere. Daher müsste aufgereinigtes, radioaktiv markiertes rPrP eingesetzt werden. Dies erfordert jedoch ein mit entsprechenden Aufreinigungsgeräten ausgestattetes Isotopenlabor.

### 3.1.2.4. Konversionsreaktionen mit gereinigtem PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>

Aufgrund der technischen Anforderungen an die Durchführung des Konversionsprotokolls nach Kirby *et al.* wurde ein ähnliches Verfahren getestet, welches auf der Inkubation von gereinigtem PrP<sup>Sc</sup> mit radioaktiv markiertem, durch Immunpräzitation gereinigtem PrP<sup>C</sup> aus Zellkultur basiert (Kocisko *et al.*, 1994; Caughey *et al.*, 1999a). In Abbildung 6B ist die Auswertung einer Konversionsreaktion mit diesem Protokoll abgebildet.



**Abbildung 6:** *In vitro* Konversionsreaktionen mit gereinigtem rPrP bzw. PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>

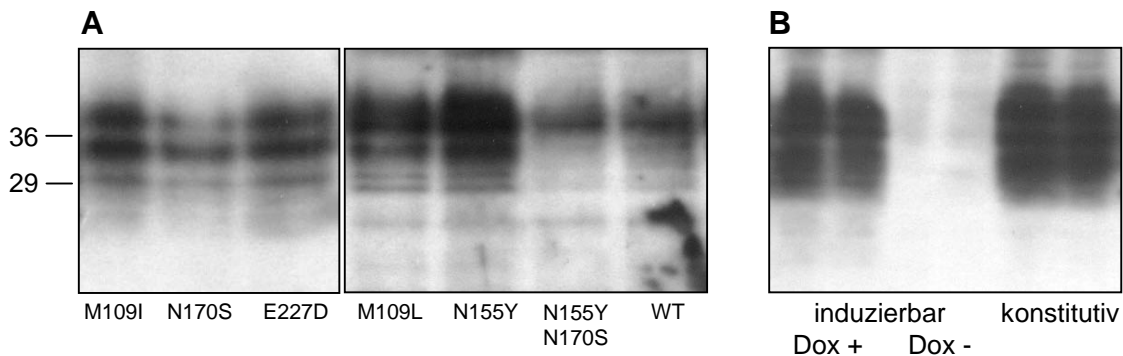
A) Western Blot-Analyse mit dem 3F4-Antikörper der *in vitro* Konversion von Hamster-rPrP (ma) mit aufgereinigtem 139A aus Rötelmäusen (cg139A). 19/20 des Reaktionsansatzes wurden mit Proteinase K verdaut und 1/20 wurde ohne Verdau aufgetragen. Kreuzreaktionen des Antikörpers mit BSA (#) und Verunreinigungen aus der PrP<sup>Sc</sup>-Präparation (+) sind an der rechten Seite markiert. Neu gebildetes PrPres aus der Konversion von dimeren rPrP(\*) und monomeren rPrP ist mit Klammern gekennzeichnet. B) Phosphorimage der *in vitro* Konversion von Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> (cg) durch aufgereinigtes 139A aus Rötelmäusen (cg139A). Das PrP<sup>C</sup> wurde durch Immunpräzitation aus RK13-Zellen nach Markierung mit radioaktivem Schwefel

(<sup>35</sup>S) gewonnen. 9/10 des Reaktionsansatzes wurden mit Proteinase K verdaut und 1/10 des Reaktionsansatzes wurde unverdaut aufgetragen. Neu gebildetes radioaktives PrPres ist auf der rechten Seite mit einer Klammer markiert. Das Molekulargewicht ist auf der linken Seite angegeben (in kDa).

Wie auch bei der Methode von Kirby *et al.* ist ohne die Zugabe von PrP<sup>Sc</sup> kein neu gebildetes radioaktives PrPres zu detektieren. Weiterhin wird aus der Abbildung deutlich, dass nach der Immunpräzipitation von PrP<sup>C</sup> aus dem Lysat radioaktiv markierter RK13-Zellen keine Fremdproteine aus dem Zell-Lysat zu detektieren sind. Durch die radioaktive Markierung des PrP<sup>C</sup> lässt sich das neu gebildete PrPres vom eingesetzten PrP<sup>Sc</sup> unterscheiden und ohne Nebenbanden abbilden. Durch die Verwendung von aufgereinigtem PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> wird der Einfluss von anderen Makromolekülen auf die Konversionsreaktion minimiert und da Punktmutationen zur Analyse der Rolle der Primärsequenz für die Speziesbarriere eingefügt werden können, wurde diese Methode für die weiteren Analysen zur Rolle der Primärsequenz verwendet.

Um die Unterschiede zwischen Hausmaus und Rötelmaus bezüglich der Infektion mit Scrapie vom Schaf und BSE vom Rind im Hinblick auf die Primärsequenz zu untersuchen, wurden Punktmutationen in die Rötelmaus-Sequenz eingefügt. Die Sequenz des Prionproteins der Rötelmaus wurde an den Codons 109, 155, 170 und 227 (siehe 3.1.1.) in Maus-spezifische Aminosäure-Reste umgewandelt. Am Codon 109 wurde Methionin in Isoleucin (M109L), am Codon 155 Asparagin in Tyrosin (N155Y), am Codon 170 Asparagin in Serin (N170S) und an Codon 227 Glutamat in Aspartat (E227D) umgewandelt. Weiterhin wurde in Anlehnung an den bei Rötelmäusen vorkommenden Polymorphismus am Codon 109, welcher die Inkubationszeit beeinflusst (Cartoni *et al.*, 2005), Methionin gegen Isoleucin ausgetauscht (M109I). Der Polymorphismus M109I der Rötelmäuse entspricht dem Polymorphismus L108F bei Hausmäusen, welcher zusammen mit T189V die Inkubationszeit beeinflusst. Die Kombination L108 / T189 („a Allel“) ist mit einer kurzen und F108 / V189 („b Allel“) mit einer langen Inkubationszeit assoziiert (Westaway *et al.*, 1987). Des Weiteren wurden Konstrukte mit der Doppelmutation N155Y-N170S erstellt. Abbildung 7A zeigt eine Western Blot-Analyse von Lysaten von RK13-Zellen, welche aufgrund einer transienten Transfektion die verschiedenen PrP<sup>C</sup>-Varianten exprimieren. Aus der Abbildung wird deutlich, dass alle mutierten Prion-Proteine von den Zellen normal

prozessiert werden. Es wurden daher RK13-Zellen mit entsprechenden Konstrukten zur konstitutiven Expression stabil transfiziert und für die weiteren Experimente verwendet. RK13-Zellen wurden mitunter deshalb verwendet, weil für diese Zell-Linie das Fehlen einer detektierbaren endogene PrP<sup>C</sup>-Expression beschrieben wurde (Vilette *et al.*, 2001; Sabuncu *et al.*, 2003). Dies konnte durch Western Blot-Analysen und durch Immunpräzipitation aus radioaktiv markierten RK13-Zellen bestätigt werden (Daten nicht abgebildet).

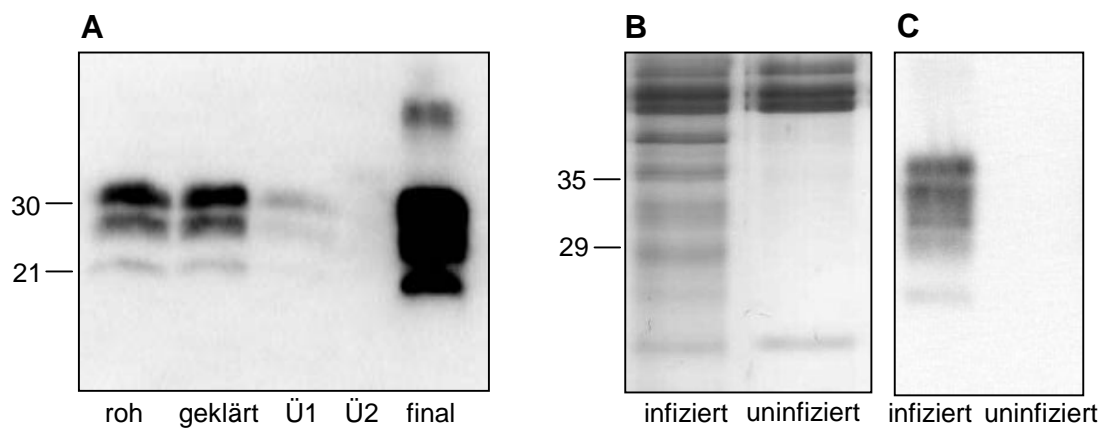


**Abbildung 7:** Expression von PrP<sup>C</sup> der Rötelmaus in Zellkultur

A) Detektion von PrP<sup>C</sup> mit verschiedenen Punktmutationen im Lysat von transient exprimierenden RK13-Zellen. B) Detektion von PrP<sup>C</sup> der Rötelmaus im Lysat von Zell-Linien die PrP<sup>C</sup> entweder durch Zugabe von Doxycyclin ins Kulturmedium induziert oder konstitutiv exprimieren. Die Western Blot-Analysen wurden mit dem monoklonalen 6H4-Antikörper durchgeführt. Molekulargewichtsstandards sind links in kDa angegeben.

Im Vergleich zu Zell-Linien, bei denen die PrP<sup>C</sup>-Expression durch Zugabe von Doxycyclin ins Kulturmedium induziert werden kann, konnte bei konstitutiv exprimierenden Zellen auch nach mehrfacher Passagierung keine Reduktion des Expressionsniveaus festgestellt werden, weshalb für die weiteren Experimente konstitutiv exprimierende Zell-Linien verwendet wurden. Weiterhin wurden stabile Zell-Linien erstellt, welche die Wildtyp-PrP<sup>C</sup>-Sequenzen vom Schaf mit dem Genotyp ARQ (A136, R154, Q171) und ARR (A136, R154, R171) konstitutiv exprimieren. Der Genotyp ARR ist bei Schafen mit einer erhöhten Unempfindlichkeit gegenüber einer Scrapie-Infektion assoziiert (Goldmann *et al.*, 1990). Weitere stabile RK13-Linien wurden für die konstitutive Expression des PrP<sup>C</sup> von Rind, Maus und Hamster erstellt. Um das Verhalten der verschiedenen Varianten des zellulären Prionproteins gegenüber unterschiedlichen Erregerstämmen zu untersuchen, wurde PrP<sup>Sc</sup> aus verschiedenen

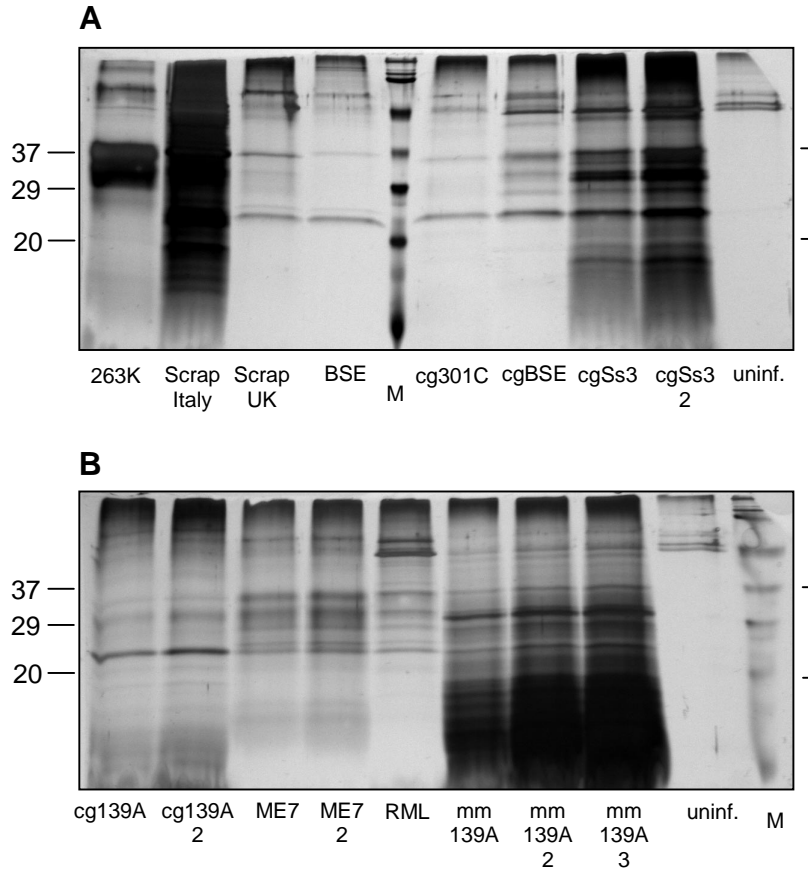
infizierten Spezies aufgereinigt (siehe 2.2.4.10.). Zur Überprüfung der Anreicherung wurde die Aufreinigungsprozedur durch Western Blot-Analysen von Aliquots der einzelnen Aufreinigungsfractionen verfolgt. Der Großteil des PrP<sup>Sc</sup> aus dem Hirnhomogenat war in der Suspension des finalen Pelletes wiederzufinden (Abbildung 8A). Durch Silbergel-Analysen und einen Vergleich mit parallel im Western Blot analysierten Proben wurde der Grad der Aufreinigung beurteilt und mit einer Aufreinigung von uninfizierten Hirnen verglichen (Abbildung 8B und C).



**Abbildung 8:** Aufreinigung von PrP<sup>Sc</sup> aus Gehirnen infizierter Rötelmäuse

A) Aufreinigung von PrP<sup>Sc</sup> aus 1,9 g Hirngewebe von Rötelmäusen infiziert mit 139A. Die Western Blot-Analyse wurde nach PK-Verdau mit dem 6H4-Antikörper durchgeführt. roh: 20 µl (von 34 ml) des 5%igen Roh-Homogenats; geklärt: 20 µl (von 30 ml) des durch Zentrifugation geklärten Homogenats; Ü1: 20 µl (von 30 ml) des Überstandes der ersten Ultrazentrifugation; Ü2: 20 µl (von 17,5 ml) des Überstandes der zweiten Ultrazentrifugation; final: 5 µl (von 200 µl) der Suspension des finalen Pelletes. B) Silberfärbung einer SDS-PAGE von 2 µl des gereinigten 139A aus (A). Parallel wurde 2 µl einer Kontroll-Präparation von uninfizierten Rötelmäusen aufgetragen. C) Parallel bearbeitete Western Blot-Analyse (Antikörper RA3153) der Proben aus (B). Molekulargewichtsmarker sind auf der linken Seite in kDa angegeben.

Obwohl die Suspension des finalen Pelletes überwiegend aus PrP<sup>Sc</sup> bestand, konnte eine gewisse Kontamination mit anderen Gewebsproteinen, dessen Grad von dem aufgereinigten Erregerstamm abhing, festgestellt werden (Abbildung 9). Der Proteingehalt der PrP<sup>Sc</sup>-Präparationen wurde mit dem BCA-Assay bestimmt und die PrP<sup>Sc</sup>-Konzentration über eine Eichgerade aus rekombinanten PrP mit bekannter Menge ermittelt (Tabelle 10, siehe 2.2.4.10.).

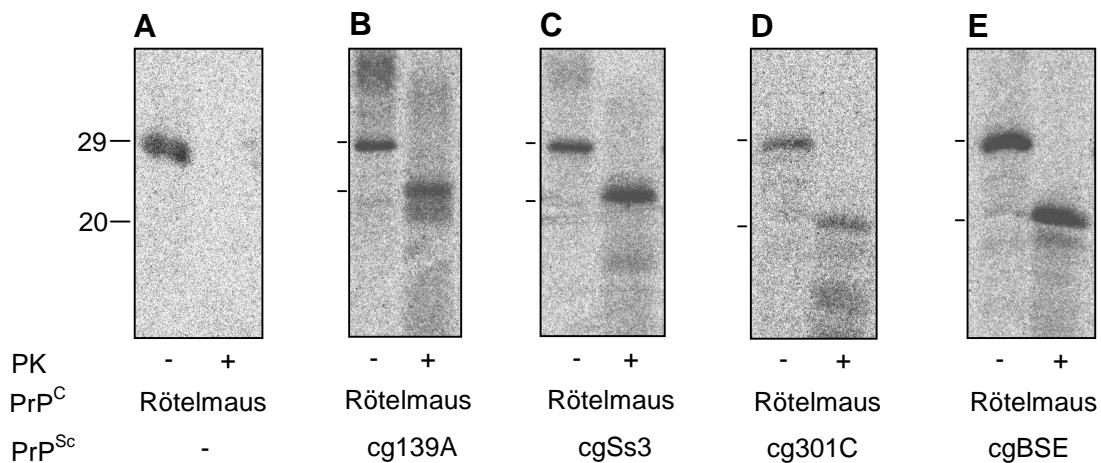


**Abbildung 9:** Silberfärbung einer SDS-PAGE verschiedener PrP<sup>Sc</sup>-Präparationen

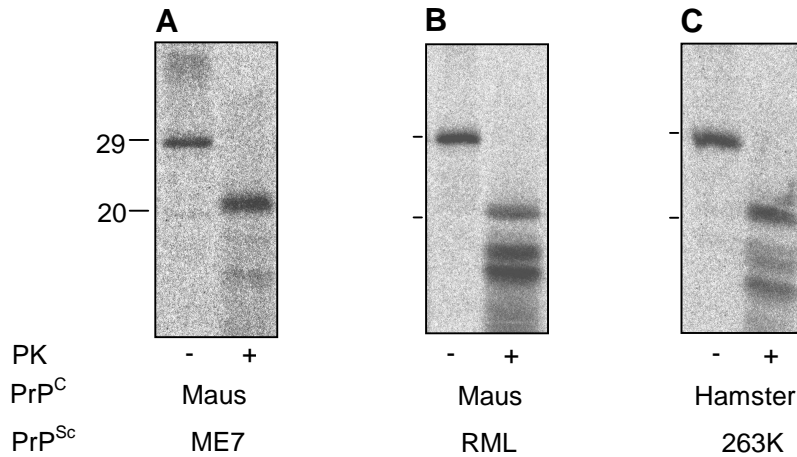
Die Suspension des finalen Pellets aus der Aufreinigung verschiedener Erregerstämme (siehe 2.2.4.10) wurde in einer SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen. Wenn nicht anders angegeben (2: 2 µl; 3: 3 µl) wurde 1 µl der Suspension des finalen Pellets ohne PK-Verdau aufgetragen. Die Banden von PrP<sup>Sc</sup> sind mit Klammern rechts markiert. Zur Kontrolle wurde eine Aufreinigung mit Hirnen uninfizierter Rötelmäuse durchgeführt (uninf.) und 2 µl davon mit auf das Gel aufgetragen. Die Größen des Molekulargewichtsstandards sind auf der linken Seite in kDa angegeben. M: Molekulargewichtsstandard.

Wie aus Abbildung 6B und 10A ersichtlich ist, wurde bei der Konversionsmethode nach Kocisko *et al.* PrP<sup>C</sup> ohne das Vorhandensein von PrP<sup>Sc</sup> nicht in PrP<sup>Sc</sup> konvertiert. Dies war auch dann nicht der Fall, wenn anstelle von PrP<sup>Sc</sup> eine vergleichbare Menge von einer Präparation aus uninfizierten Hirnen in die Reaktion gegeben wurde (Daten nicht abgebildet). Auch die mutierten Prionproteine bildeten unter den angelegten Reaktionsbedingungen ohne PrP<sup>Sc</sup> keine Protease-Resistenz aus (Daten nicht gezeigt).

Um die Auswertung der Konversionseffizienzen zu erleichtern, wurde das radioaktiv markierte PrP<sup>C</sup> aus Zellen gewonnen, die mit Tunicamycin behandelt worden waren, wodurch die Glykosylierung des PrP<sup>C</sup> unterbunden wurde und daher nicht drei sondern nur eine PrP<sup>C</sup>-spezifische Bande in der SDS-PAGE zu erkennen war (Abbildung 10-12). Im Gegensatz zu PrP<sup>C</sup> waren bei dem neugebildeten PrPres teilweise mehrere Banden zu erkennen, was möglicherweise auf die Existenz von unterschiedlichen Faltungsintermediaten mit differierendem Protease-resistenten Proteinbereich zurückzuführen ist (Kocisko *et al.*, 1995). Das Bandenmuster wies dabei eine Erregerstamm-Spezifität auf (Abbildung 10-12).

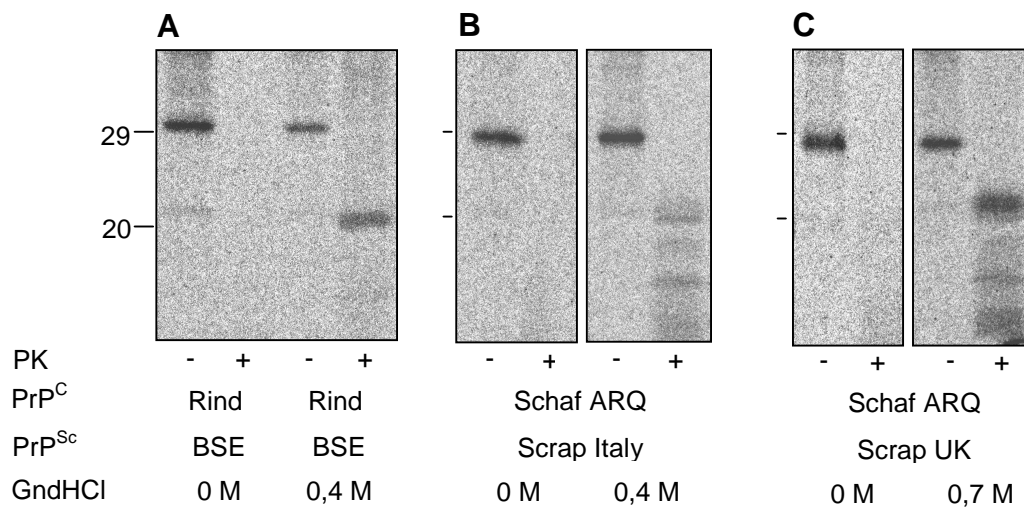


**Abbildung 10:** *In vitro* Konversion von Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> durch verschiedene Erregerstämme  
 Phosphorimage der Konversion von deglykosyliertem, <sup>35</sup>S-markiertem Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> in PrPres durch verschiedene in Rötelmäusen passagierten Erregerstämme. 9/10 des Reaktionsansatzes wurden mit Proteinase K verdaut und 1/10 des Reaktionsansatzes wurde unverdaut aufgetragen. cg139A: 139A aus der Maus mehrfach passagiert in Rötelmäusen; cgSs3: Scrapie (Italy) vom Schaf mehrfach passagiert in Rötelmäusen; cg301C: BSE-verwandter Stamm aus der Maus mehrfach passagiert in Rötelmäusen; cgBSE: BSE passagiert in Schafen und anschließend mehrfach passagiert in Rötelmäusen. Das Molekulargewicht ist auf der linken Seite angegeben (in kDa).



**Abbildung 11:** Homologe *in vitro* Konversionsreaktionen von Maus und Hamster

Phosphorimage der homologen Konversion (PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> mit gleicher Aminosäuresequenz) von <sup>35</sup>S-markiertem PrP<sup>C</sup> der Maus und des Hamsters. 9/10 des Reaktionsansatzes wurden mit Proteinase K verdaut und 1/10 des Reaktionsansatzes wurde unverdaut aufgetragen. ME7 und RML: Erregerstämme der Maus; 263K: Hamster-Erregerstamm. Der Molekulargewichtsstandard ist linksseitig in kDa angegeben.



**Abbildung 12:** Homologe Konversionsreaktionen von Rind und Schaf

Phosphorimage der homologen Konversion von Rind und Schaf mit dem Genotyp ARQ (A136, R154, Q171). Die Konversionseffizienz ist abhängig von der GdnHCl-Konzentration. 9/10 des Reaktionsansatzes wurden mit Proteinase K verdaut und 1/10 des Reaktionsansatzes wurde unverdaut aufgetragen. BSE: Erregerstamm des Rindes; Scrap Italy: Scrapie-Erregerstamm eines aus Italien stammenden Scrapie-Falles; Scrap UK: Scrapie-Erregerstamm eines aus Großbritannien stammenden Scrapie-Falles. GdnHCl: Guanidinium-Hydrochlorid. Der Molekulargewichtsstandard ist auf der linken Seite in kDa angegeben.

Des Weiteren mussten abhängig vom verwendeten Erregerstamm durch Zugabe von Guanidinium-Hydrochlorid (GndHCl) zum Reaktionspuffer leicht denaturierende Bedingungen eingestellt werden, um die Bildung von PrPres zu ermöglichen (Abbildung 12). Die optimierten GndHCl-Konzentrationen waren für BSE und Scrap Italy 0,4 M und für Scrap UK 0,7 M. Bei Reaktionen mit cg139A aus Rötelmäusen erzeugte die Zugabe von GndHCl eine Verringerung der Konversionseffizienz. Bei ME7 und RML war zwar unter nicht-denaturierenden Bedingungen eine PrPres-Bildung zu verzeichnen, die Zugabe von GndHCl verbesserte jedoch die Konversionseffizienz (Daten nicht abgebildet). Um weitgehend nicht-denaturierende, physiologische Bedingungen herzustellen, wurde nur bei Reaktionen mit Erregerstämmen, bei denen GndHCl zur Bildung von PrPres zwingend erforderlich war, GndHCl dem Reaktionsansatz beigefügt.

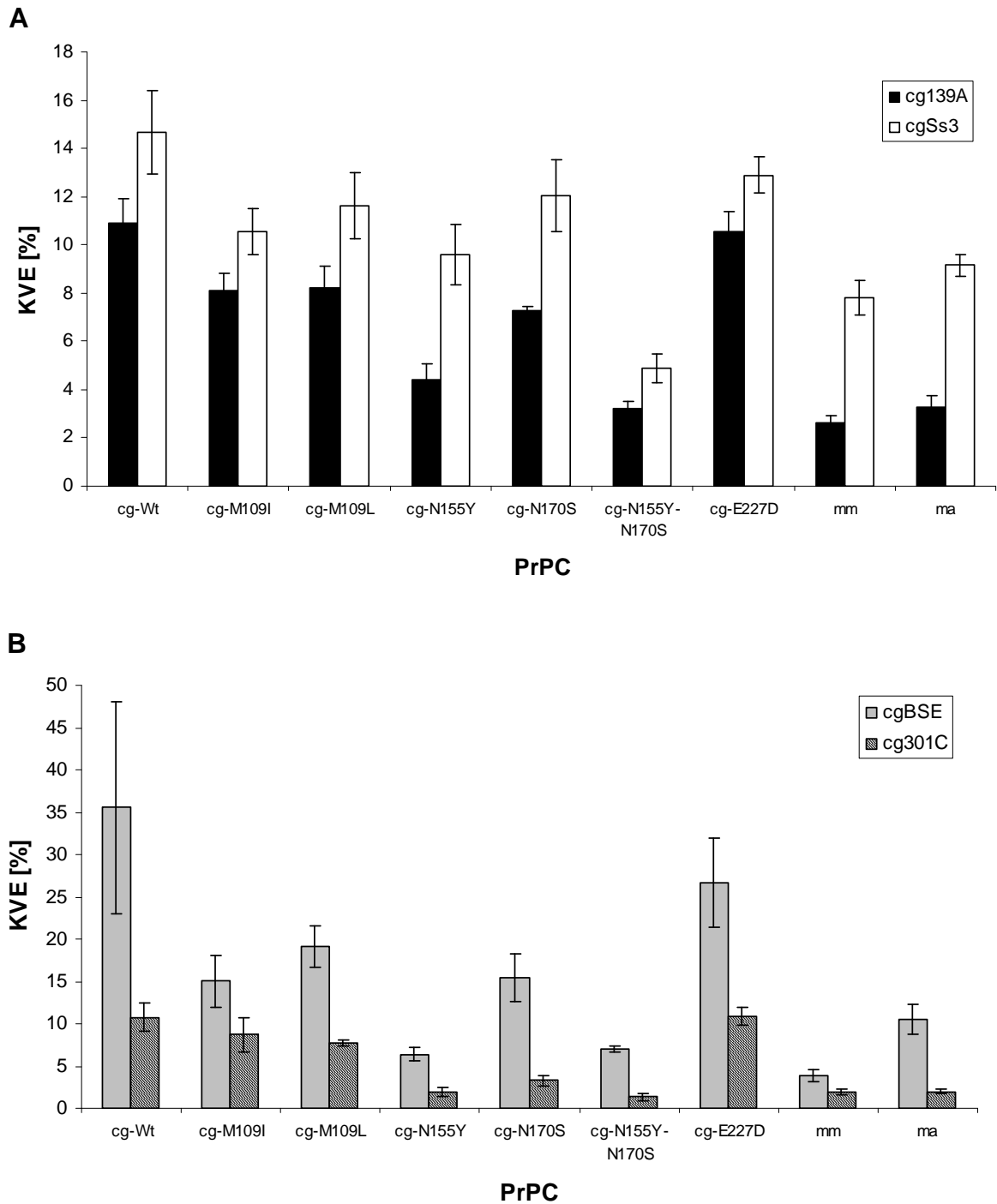
### **3.1.3. Einfluss der Punktmutationen auf die Konversionseffizienz**

#### **3.1.3.1. Homologe Konversion**

Um den Einfluss der Mutationen M109I, M109L, N155Y, N170S, N155Y-N170S und E227D auf die Umfaltung von PrP<sup>C</sup> der Rötelmaus in die Protease-resistente Isoform zu untersuchen, wurden nach einem abgewandelten Protokoll von Kocisko *et al.* (Kocisko *et al.*, 1994; Caughey *et al.*, 1999a) *in vitro* Konversionsreaktionen mit den Erregerstämmen cg139A, cgSs3, cgBSE und cg301C aus Rötelmäusen durchgeführt. Zum Vergleich wurde die Konversion des PrP<sup>C</sup> der Hausmaus („a Allel“) und des Hamsters untersucht. Aus einer Reihe Einzelreaktionen wurden die mittleren Konversionseffizienzen bestimmt und im Vergleich dargestellt (Abbildung 13).

Abbildung 13A zeigt die Konversionseffizienzen von Scrapie-verwandten Erregerstämmen (cg139A, cgSs3) und Abbildung 13B die von BSE-verwandten Erregerstämmen (cgBSE, cg301C). Die Konversionseffizienz der homologen Reaktionen (PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> haben die gleiche Aminosäuresequenz) lagen abhängig vom Erregerstamm bei 10-35%. Bei allen Erregerstämmen hatten die Mutationen an Codon 155 und 170 einen reduzierenden Einfluss auf die Konversionseffizienz. Die Mutation E227D verursachte bei keinem der verwendeten Erregerstämme eine signifikante Veränderung in der Bildung von PrPres.





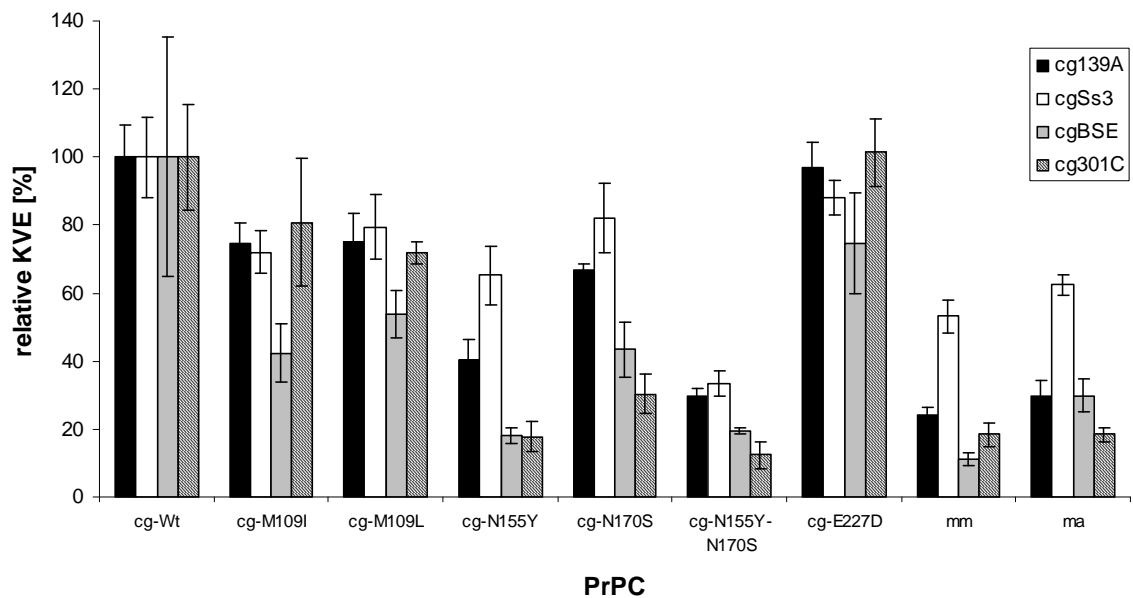
**Abbildung 13:** Konversion von verändertem Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> durch Rötelmaus-Erregerstämme <sup>35</sup>S-PrP<sup>C</sup> wurde durch Immunpräzipitation mit dem Antikörper RA3153 aufgereinigt und mit Erregerstämmen der Rötelmaus inkubiert. Aus dem Vergleich der Bandenintensitäten vor und nach PK-Verdau wurden die Konversionseffizienzen von verschiedenen PrP<sup>C</sup> / PrP<sup>Sc</sup>-Kombinationen ermittelt ( $KVE [\%] = [I_{+PK} / (I_{-PK} * 10)] * 100$ ). Dargestellt ist der Mittelwert aus einer Anzahl von Einzelmessungen (n) und der Standardfehler. A) Konversion durch 139A aus Mäusen und Schaf-Scrapie eines Isolats aus Italien (Ss3) jeweils passagiert in Rötelmausen (cg139A und cgSs3); n ≥ 6. B) Konversion durch BSE propagiert in Schafen und der BSE-

verwandte Erregerstamm 301C aus Mäusen jeweils passagiert in Rötelmäusen (cgBSE und cg301C);  $n \geq 4$ . cg-Wt: Rötelmaus Wildtyp-PrP<sup>C</sup>; cg-M109I: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(M109I); cg-M109L: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(M109L); cg-N155Y: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(N155Y); cg-N170S: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(N170S); cg-N155Y-N170S: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(N155Y-N170S); cg-E227D: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(E227D); mm: Maus Wildtyp-PrP<sup>C</sup>(a Allel); ma: Hamster Wildtyp-PrP<sup>C</sup>.

Maus-PrP<sup>C</sup> und Hamster-PrP<sup>C</sup> zeigten bei der Inkubation mit Erregerstämmen der Rötelmaus eine geringe Konversionsfähigkeit, wobei die Konversionseffizienz bei der Inkuabtion mit Maus-PrP<sup>C</sup> noch niedriger als die Konversionseffizienz von Hamster-PrP<sup>C</sup> war.

Der natürliche Polymorphismus an Codon 109 bewirkte in seiner Isoleucin-Ausprägung eine reduzierte Konversionseffizienz und auch der Austausch von Methionin gegen Leucin an dieser Position wies diese Tendenz auf. Außer bei cgBSE und cg301C hatte die Doppelmutation N155Y-N170S den am stärksten reduzierenden Effekt auf die Konversionseffizienz und war in der Lage, den Unterschied zwischen Rötelmaus und Hausmaus bei der Inkubation mit cg139A und cg301C vollständig zu nivellieren. Bei den Reaktionen mit cgSs3 lag die Konversionseffizienz bei Inkubation mit der Doppelmutation N155Y-N170S sogar noch unterhalb der von Maus-PrP<sup>C</sup>. Dass der Grad der Veränderung von Konversionseffizienzen durch die Einführung von Punktmutationen vom verwendeten Erregerstamm abhing, wird aus der Darstellung der relativen Konversionseffizienzen deutlich (Abbildung 14).

Vor allem die Konversionsfähigkeit von PrP<sup>C</sup> mit Mutationen an den Codons 155 und 170 war abhängig von dem verwendeten Erregerstamm. Aber auch die Konversion von anderen Wildtyp-PrP<sup>C</sup>-Sequenzen, wie vom Hamster oder von der Maus, zeigt eine Erregerstammspezifität, wobei insbesondere bei dem Erregerstamm cgSs3 eine höhere Konversionseffizienz bei diesen Wildtyp-PrP<sup>C</sup>-Sequenzen ermittelt wurde. Bezüglich der Reaktion auf die Mutationen an Codon 155 und 170 lassen sich die zwei BSE-verwandten Stämme von den Scrapie-verwandten Stämme unterscheiden, da sowohl bei der Inkubation mit cgBSE als auch mit cg301C die Konversion von PrP<sup>C</sup>(N155Y), PrP<sup>C</sup>(N170S) und PrP<sup>C</sup>(N155Y-N170S) stärker reduziert ist als bei den Stämmen cg139A und cgSs3 (Piening *et al.*, *J. Biol. Chem.*, submitted).

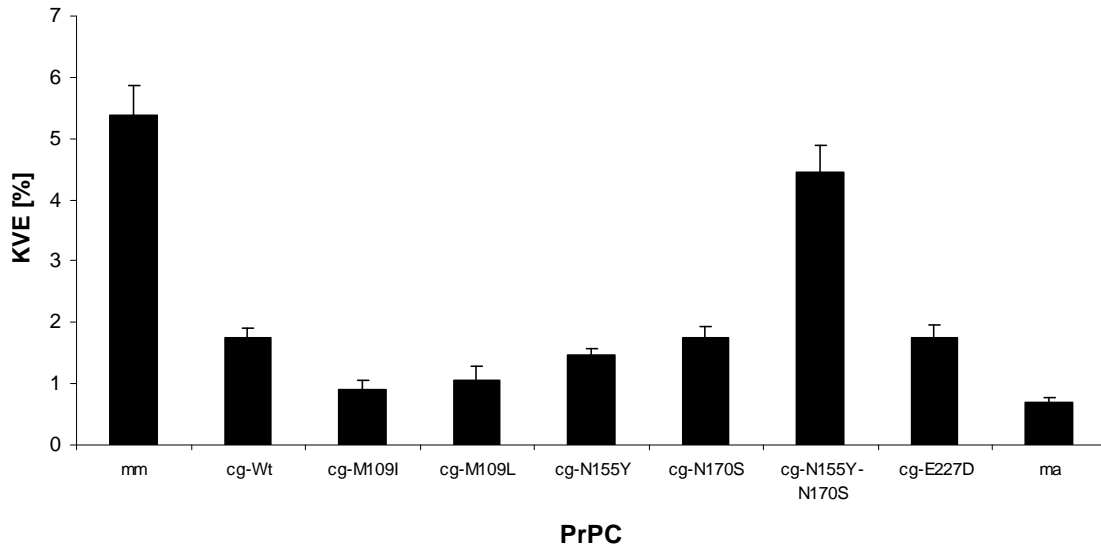


**Abbildung 14:** Relative Konversionseffizienz verschiedener Rötelmaus-Erregerstämme

Die Mittelwerte aus Abbildung 13 wurden mit ihren Standardfehlern auf die jeweilige homologe Reaktion ( $\text{PrP}^{\text{C}}$  und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  haben die gleiche Aminosäuresequenz) normiert (relative KVE [%] =  $[(\text{KVE}_{\text{cg-Mutation}} / \text{KVE}_{\text{cg-Wt}}) * 100]$ ). cg-Wt: Rötelmaus Wildtyp- $\text{PrP}^{\text{C}}$ ; cg-M109I: Rötelmaus  $\text{PrP}^{\text{C}}$ (M109I); cg-M109L: Rötelmaus  $\text{PrP}^{\text{C}}$ (M109L); cg-N155Y: Rötelmaus  $\text{PrP}^{\text{C}}$ (N155Y); cg-N170S: Rötelmaus  $\text{PrP}^{\text{C}}$ (N170S); cg-N155Y-N170S: Rötelmaus  $\text{PrP}^{\text{C}}$ (N155Y-N170S); cg-E227D: Rötelmaus  $\text{PrP}^{\text{C}}$ (E227D); mm: Maus Wildtyp- $\text{PrP}^{\text{C}}$ (a Allel); ma: Hamster Wildtyp- $\text{PrP}^{\text{C}}$ .

### 3.1.3.2. Konversion durch Erregerstämme aus Maus und Hamster

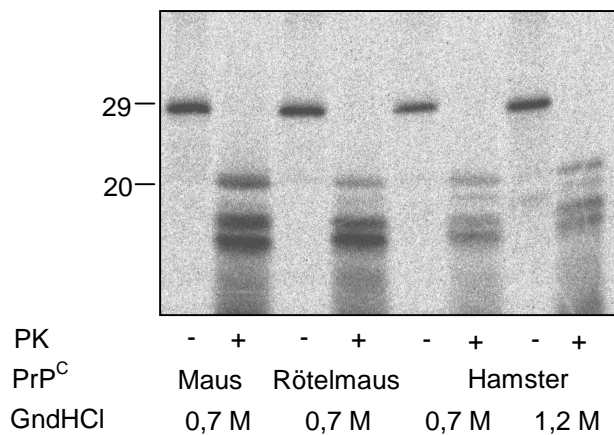
Durch die Veränderung der Sequenz des  $\text{PrP}^{\text{C}}$  der Rötelmaus an den Codons 155 und 170 in Maus-spezifische Aminosäuren konnte bei der Inkubation mit Rötelmaus-Erregerstämmen eine Angleichung der Konversionseffizienz von Rötelmaus-Wildtyp- $\text{PrP}^{\text{C}}$  an die Konversionseffizienz von Maus-Wildtyp- $\text{PrP}^{\text{C}}$  festgestellt werden (Abbildung 13, 14). Dass sich die Bedeutung der Codons 155 und 170 für die Speziesbarriere zwischen Rötelmaus und Maus auch in umgekehrter Richtung verdeutlichen lässt, ist in Abbildung 15 dargestellt.



**Abbildung 15:** Konversion veränderter Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> durch ME7 aus Maus

<sup>35</sup>S-PrP<sup>C</sup> wurde durch Immunpräzipitation mit dem Antikörper RA3153 aufgereinigt und mit ME7 aus der Maus inkubiert. Die Konversionseffizienzen wurden wie in Abbildung 13 nach der Formel  $KVE [\%] = [I_{+PK} / (I_{-PK} * 10)] * 100$  ermittelt und der Mittelwert mit Standardfehler von  $n \geq 6$  dargestellt. mm: Maus Wildtyp-PrP<sup>C</sup> (a Allel); cg-Wt: Rötelmaus Wildtyp-PrP<sup>C</sup>; cg-M109I: Rötelmaus PrP<sup>C</sup> (M109I); cg-M109L: Rötelmaus PrP<sup>C</sup> (M109L); cg-N155Y: Rötelmaus PrP<sup>C</sup> (N155Y); cg-N170S: Rötelmaus PrP<sup>C</sup> (N170S); cg-N155Y-N170S: Rötelmaus PrP<sup>C</sup> (N155Y-N170S); cg-E227D: Rötelmaus PrP<sup>C</sup> (E227D); ma: Hamster Wildtyp-PrP<sup>C</sup>.

Inkubation mit dem aus Mäusen gewonnenen Erregerstamm ME7 ergab eine deutlich geringere Konversionseffizienz für das PrP<sup>C</sup> der Rötelmaus im Vergleich zum Maus-PrP<sup>C</sup>. Durch die Doppelmutation N155Y-N170S konnte dieser Unterschied ausgeglichen werden, wobei die Einzelmutationen N155Y und N170S nur eine geringe Veränderung bewirkten. Wie aufgrund der Ergebnisse aus der Inkubation mit Rötelmaus-Erregerstämmen erwartet, zeigte das am Codon 227 abgewandelte Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> (E227D) eine Konversionseffizienz vergleichbar mit der Rötelmaus-Wildtyp-Sequenz. Die im Hinblick auf den natürlichen Polymorphismus an Codon 109 interessante Mutation M109I bewirkte eine Reduktion der Konversionseffizienz, allerdings rief auch die Veränderung der Rötelmaus-Wildtypsequenz an der gleichen Position in die Maus-spezifische Aminosäure Leucin eine Reduktion hervor. Hamster-PrP<sup>C</sup> war durch ME7 unter den angewandten Reaktionsbedingungen nur mit einer sehr geringen Effizienz zu konvertieren (Piening *et al.*, *J. Biol. Chem.*, submitted).

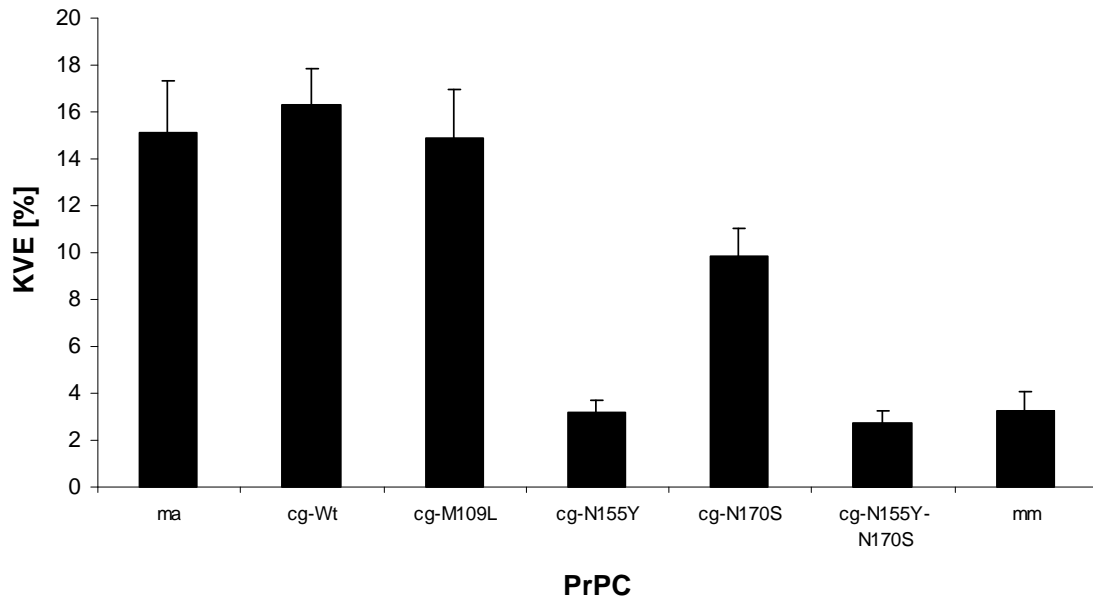


**Abbildung 16:** Konversion von Maus-, Rötelmaus- und Hamster-PrP<sup>C</sup> durch RML

Phosphorimage der Konversion von Maus-, Rötelmaus- und Hamster-PrP<sup>C</sup> durch RML aus Maus. 9/10 des Reaktionsansatzes wurden mit Proteinase K verdaut und 1/10 des Reaktionsansatzes wurde unverdaut auf das Gel aufgetragen. GndHCl: Guanidinium-Hydrochlorid. Der Molekulargewichtsstandard ist auf der linken Seite in kDa angegeben.

Aus *in vivo* Daten geht hervor, dass die Speziesbarriere zwischen Hamster und Maus relativ stark ausgeprägt ist (Kimberlin *et al.*, 1987; Scott *et al.*, 1989; Priola & Chesebro, 1995). Allerdings konnte *in vitro* für den aus Maus isolierten Erregerstamm RML unter denaturierenden Bedingungen Protease-resistentes Prionprotein des Hamsters mit einer höheren Effizienz erzeugt werden (Kocisko *et al.*, 1995), als es in dieser Arbeit mit ME7 möglich war (Abbildung 15). Daher wurden Kontrollreaktionen mit RML unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Wie in Abbildung 16 dargestellt, ist Hamster-PrP<sup>C</sup> mit dem Maus-Erregerstamm RML deutlich in PrPres konvertierbar, jedoch mit einer geringeren Effizienz als Maus-PrP<sup>C</sup>.

Obwohl sich die Aminosäuresequenz des Hamsters und der Rötelmaus sehr ähnlich sind, war die Konversion von Hamster-PrP<sup>C</sup> durch Rötelmaus-Erregerstämme relativ ineffizient (Abbildung 13, 14). Bei der Inkubation von Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> mit dem Hamster-Erregerstamm 263K hingegen konnte eine Konversionseffizienz ermittelt werden, die der von Hamster-PrP<sup>C</sup> entspricht (Abbildung 17). Die Maus-spezifischen Mutationen N155Y und N170S in der Rötelmaussequenz führten zu einer Abnahme der Konversionseffizienz, wobei die Mutation N155Y die Konversionseffizienz auf das Niveau von Maus-PrP<sup>C</sup> reduzierte, welches sich mit Hamster-263K nur sehr ineffizient konvertieren lässt (Piening *et al.*, *J. Biol. Chem.*, submitted).



**Abbildung 17:** Konversion veränderter Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> durch 263K aus Hamster  
 Durch Immunpräzipitation mit dem Antikörper RA3153 wurde <sup>35</sup>S-PrP<sup>C</sup> aufgereinigt und mit 263K aus Hamstern inkubiert. Die Konversionseffizienzen wurden nach der Formel  $KVE [\%] = [I_{+PK} / (I_{-PK} * 10)] * 100$  ermittelt und der Mittelwert mit Standardfehler von n = 4 (bei cg-M109L: n = 3) dargestellt. ma: Hamster Wildtyp-PrP<sup>C</sup>; cg-Wt: Rötelmaus Wildtyp-PrP<sup>C</sup>; cg-M109L: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(M109L); cg-N155Y: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(N155Y); cg-N170S: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(N170S); cg-N155Y-N170S: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(N155Y-N170S); mm: Maus Wildtyp-PrP<sup>C</sup>(a Allel).

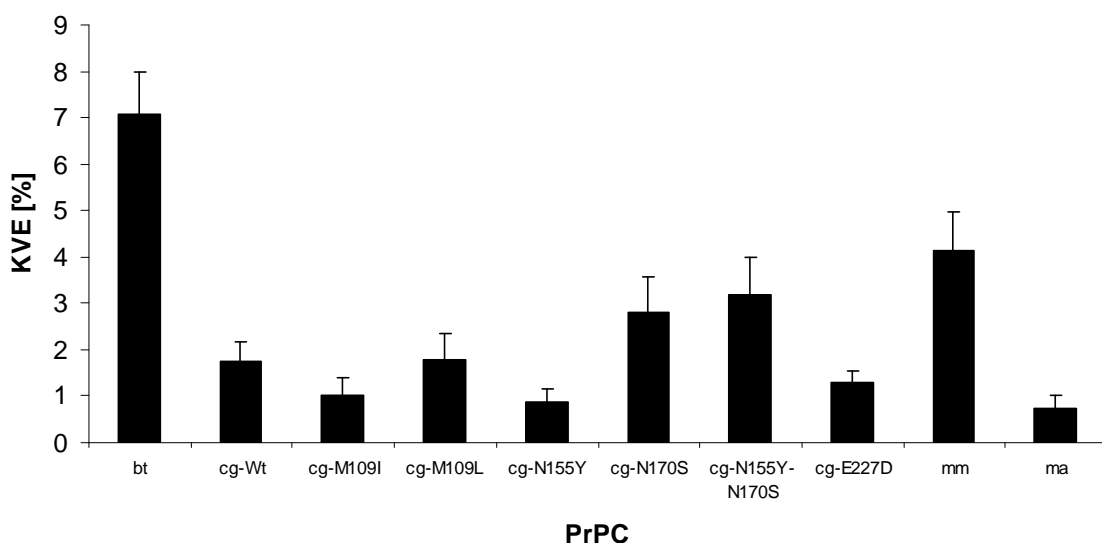
### 3.1.3.3. Konversion durch Erregerstämme aus Rind und Schaf

Zur Beurteilung der Rolle der Primärsequenz für die hohe Empfindlichkeit der Rötelmaus im Vergleich zur Hausmaus gegenüber Schaf-Scrapie sowie der Resistenz gegenüber einer BSE-Infektion wurden *in vitro* Konversionsreaktionen mit gereinigtem BSE aus Rind und Schaf-Scrapie durchgeführt.

Im Vergleich zum PrP<sup>C</sup> der Rötelmaus wurde mit Maus-PrP<sup>C</sup> bei der Konversion durch BSE eine höhere Konversionseffizienz ermittelt (Abbildung 18). Der Unterschied ließ sich durch die Einführung der Doppelmutation N155Y-N170S ausgleichen, wobei auch die Mutation N170S eine Erhöhung der Konversionseffizienz verursachte. Die Einzelmutation N155Y bewirkte hingegen eine Reduktion der Konversionseffizienz. Die Mutation E227D bewirkte im Vergleich zur Rötelmaus-Wildtypsequenz keine

Veränderung in der Konversionfähigkeit durch BSE. Hamster-PrP<sup>C</sup> ließ sich durch BSE nur sehr ineffizient konvertieren.

Entgegen den Erwartungen aus den *in vivo* Daten wurde das PrP<sup>C</sup> der Maus auch mit Schaf-Scrapie besser konvertiert als das PrP<sup>C</sup> der Rötelmaus (Abbildung 19). Dies zeigte sich sowohl für den Erregerstamm aus Großbritannien (Scrap UK) als auch für den Erregerstamm aus Italien (Scrap Italy). Die Mutationen an den Codons 155 und 170 bewirken eine Erhöhung der Konversionseffizienz, wobei die Doppelmutation N155Y-N170S den Unterschied zwischen Maus und Rötelmaus ausgleichen konnte.

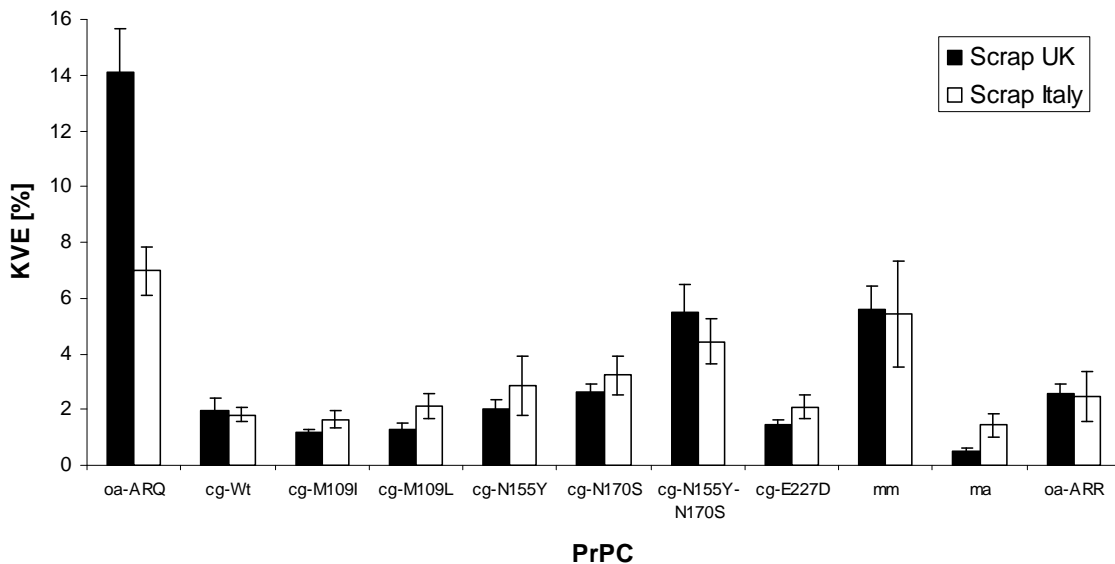


**Abbildung 18:** Konversion veränderter Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> durch BSE aus Rind

<sup>35</sup>S-PrP<sup>C</sup> wurde durch Immunpräzipitation mit dem Antikörper 3B5 aufgereinigt und mit BSE aus Rind bei 0,4 M GndHCl inkubiert. Die Konversionseffizienzen wurden nach  $KVE [\%] = [I_{+PK} / (I_{-PK} * 10)] * 100$  ermittelt und der Mittelwert mit Standardfehler von  $n \geq 6$  dargestellt. bt: Rind Wildtyp-PrP<sup>C</sup>; cg-Wt: Rötelmaus Wildtyp-PrP<sup>C</sup>; cg-M109I: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(M109I); cg-M109L: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(M109L); cg-N155Y: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(N155Y); cg-N170S: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(N170S); cg-N155Y-N170S: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(N155Y-N170S); cg-E227D: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(E227D); mm: Maus Wildtyp-PrP<sup>C</sup>(a Allel); ma: Hamster Wildtyp-PrP<sup>C</sup>.

Die Konversionseffizienz des PrP<sup>C</sup> mit der Mutation E227D war vergleichbar mit der ermittelten Konversionseffizienz der Rötelmaus-Wildtypsequenz. Hamster-PrP<sup>C</sup> wurde durch Schaf-Scrapie nur sehr ineffizient konvertiert. Neben der homologen Reaktion mit Schaf-PrP<sup>C</sup>(ARQ) wurden noch als negative Kontrolle Reaktionen mit Schaf-PrP<sup>C</sup>

vom Genotyp ARR (A136, R154, R171) durchgeführt. Der ARR-Genotyp ist mit der erhöhten Resistenz gegenüber einer Scrapie-Infektion bei Schafen assoziiert (Goldmann *et al.*, 1990). Dem entsprechend war Schaf-PrP<sup>C</sup>(ARR) im Vergleich zu Schaf-PrP<sup>C</sup>(ARQ) durch Schaf-Scrapie nur ineffizient zu konvertieren (Piening *et al.*, *J. Biol. Chem.*, submitted).



**Abbildung 19:** Konversion veränderter Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> durch Schaf-Scrapie

Durch Immunpräzipitation mit dem Antikörper 3B5 wurde <sup>35</sup>S-PrP<sup>C</sup> aufgereinigt und mit Scrapie vom Schaf eines Falles aus Großbritannien (Scrap UK) und eines Falles aus Italien (Scrap Italy) inkubiert. Reaktionen mit Scrap UK wurden mit 0,7 M GndHCl und Reaktionen mit Scrap Italy mit 0,4 M GndHCl durchgeführt. Die Konversionseffizienzen wurden nach  $KVE [\%] = [I_{+PK} / (I_{-PK} * 10)] * 100$  ermittelt und der Mittelwert mit Standardfehler von  $n \geq 6$  dargestellt. oa-ARQ: Schaf Wildtyp-PrP<sup>C</sup>(Genotyp ARQ); cg-Wt: Rötelmaus Wildtyp-PrP<sup>C</sup>; cg-M109I: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(M109I); cg-M109L: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(M109L); cg-N155Y: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(N155Y); cg-N170S: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(N170S); cg-N155Y-N170S: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(N155Y-N170S); cg-E227D: Rötelmaus PrP<sup>C</sup>(E227D); mm: Maus Wildtyp-PrP<sup>C</sup>(a Allel); ma: Hamster Wildtyp-PrP<sup>C</sup>; oa-ARR: Schaf Wildtyp-PrP<sup>C</sup>(Genotyp ARR).

### 3.2. Vernetzung von PrP-Aggregaten und molekulare Architektur

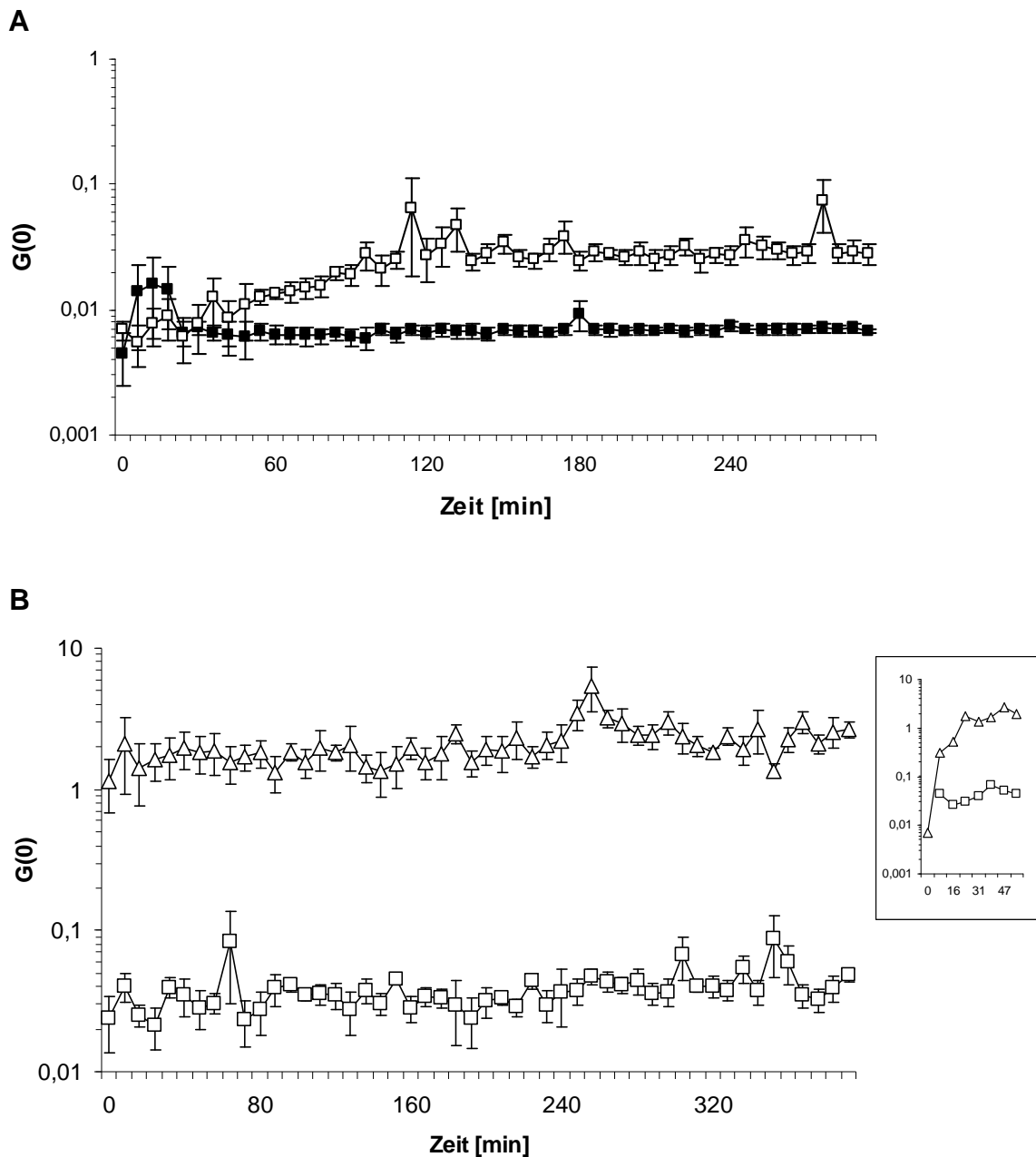
Nach der Prion-Hypothese ist für die Konversion von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> eine direkte Wechselwirkung der beiden PrP-Isoformen erforderlich (Prusiner, 1998). Veränderungen in der Aminosäuresequenz beeinflussen die Effizienz der strukturellen



Umwandlung höchstwahrscheinlich durch eine Veränderung der dafür nötigen Interaktionsflächen. Diese Interaktionsflächen sind aufgrund der Flüchtigkeit der Aggregationsintermediate und der Unzugänglichkeit von PrP<sup>Sc</sup> für die klassische Strukturaufklärung weitgehend unbekannt. Es wurde daher der Versuch unternommen, PrP-Aggregate durch kovalente Vernetzung zu stabilisieren und sie dadurch biochemischen und strukturellen Analysen zugänglich zu machen.

### 3.2.1. Vernetzung von rPrP-Aggregaten

Um Aggregate von rekombinantem Prionprotein (rPrP) zu erzeugen, wurde ein etablierter Detergenz-Verdünnungsassay eingesetzt (Post *et al.*, 1998). Dieser Assay beruht auf der Löslichkeit von  $\alpha$ -helicalem rPrP in wässrigem Puffer (pH 7,2) mit Natriumdodecylsulfat (SDS) in einer Konzentrationen von über 0,2 % und der Eigenschaft von rPrP eine  $\beta$ -Faltblattreiche Struktur anzunehmen und Oligomere zu bilden, sobald die SDS-Konzentration herabgesetzt wird. Mit einer Mischung aus zwei unterschiedlich markierten rPrP-Fractionen kann der so hervorgerufene Aggregationsprozess mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) untersucht werden (Schwille *et al.*, 1997). Eine Aggregationskinetik von humanem rPrP nach Reduktion der SDS-Konzentration ausgewertet über die Kreuzkorrelationsamplitude ( $G(0)$ ), als Maß für die Proteinaggregation, ist in Abbildung 20A dargestellt. Aufgrund der Aggregation des markierten rPrP erhöht sich die Kreuzkorrelationsamplitude im Vergleich zu Kontroll-Reaktionen mit 0,2 % SDS (■) wenn die SDS-Konzentration auf 0,02 % abgesenkt wird (□). Die Kreuzkorrelationsamplitude steigt weiter an, wenn die SDS-Konzentration auf 0,01 %, abgesenkt wird, wie Abbildung 20B (□) verdeutlicht. Werden voraggregierte Oligomere von unmarkiertem rPrP als Aggregationskeime („Seeds“) in die Reaktion gegeben (Abbildung 20B,  $\Delta$ ), wird die Kreuzkorrelationsamplitude abermals erhöht. Obwohl in einigen Einzelmessungen die initiale Oligomerisierung verfolgt werden konnte (Box in Abbildung 20B), hatte im Mittel die Aggregation vor der ersten Messung schon ein hohes Niveau erreicht, was verdeutlicht, dass die Induktion der Aggregation durch vorgeformte Oligomere einer schnellen Kinetik folgt.



**Abbildung 20:** Aggregation von humanen rPrP

A) Eine Mischung von Alexa 488- und Alexa 633-markiertem rekombinanten Prionprotein (ca. 30 nM) wurde in Phosphatpuffer mit 0,2% (■) bzw. 0,02% (□) SDS für 5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Während dessen wurden die Ansätze mittels FCS untersucht (gescannte Messungen alle 6 min). Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Kreuzkorrelationsamplitude  $G(0)$  von vier unabhängigen Experimenten. B) Unmarkiertes rPrP (2  $\mu$ M) wurde durch Inkubation für 3 h bei Raumtemperatur in Phosphatpuffer mit 0,02% SDS aggregiert. Ein Aliquot dieses voraggregierten, unmarkierten rPrP wurde 1:20 in eine Lösung von Fluoreszenzmarkiertem rPrP (ca. 3 nM) in Phosphatpuffer mit 0,01% SDS überführt ( $\Delta$ ). Die Ansätze

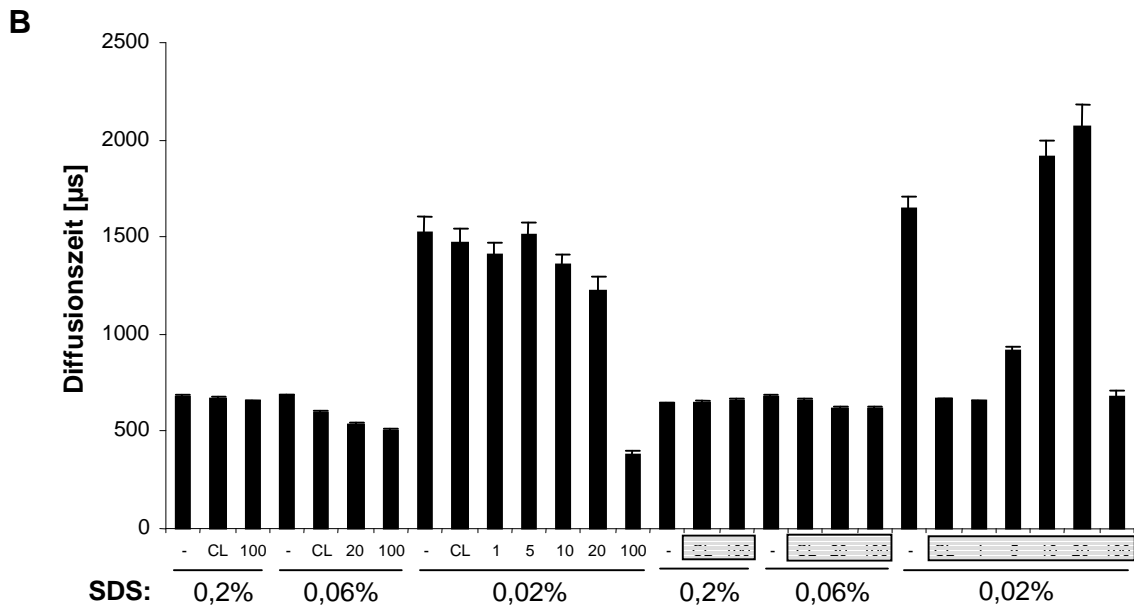
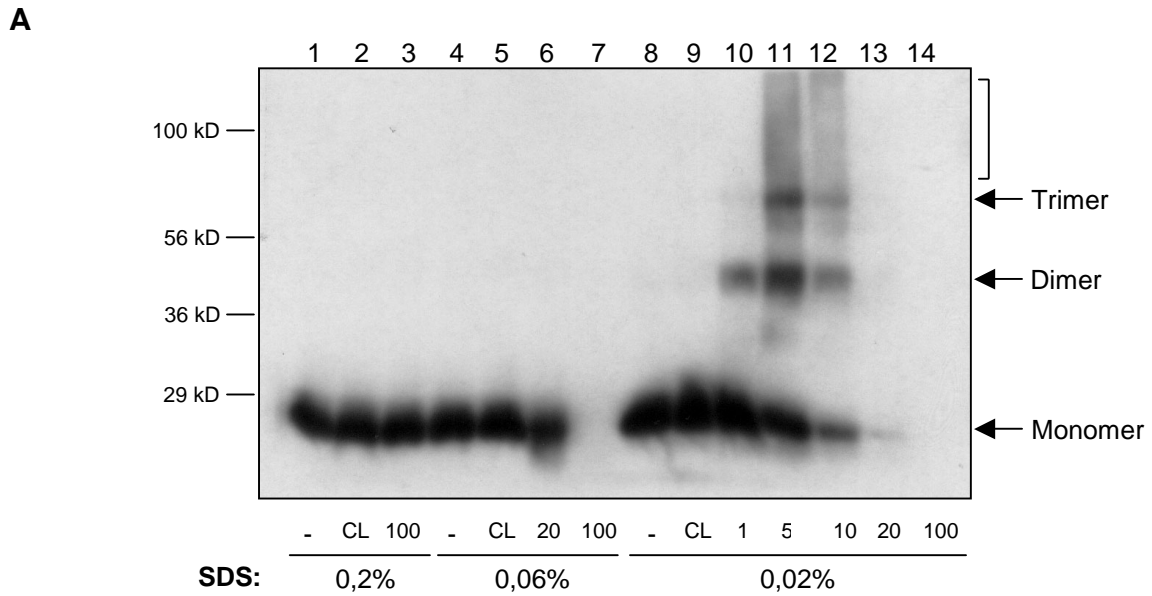
wurden für weitere 5 h inkubiert und während dessen mittels FCS untersucht (gescannte Messungen). Als Kontrolle wurden Ansätze ohne die Zugabe von voraggregiertem, unmarkiertem rPrP untersucht (□). Die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Kreuzkorrelationsamplitude ( $G(0)$ ) von vier unabhängigen Experimenten sind abgebildet. Die Kurven in der seitlich abgebildeten Box stellen einen Ausschnitt aus einer repräsentativen Einzelmessung dar und verdeutlichen die schnelle Kinetik der induzierten Aggregation.

Aggregate von rPrP, welche durch die Verdünnung der SDS-Konzentration erzeugt wurden, lösen sich auf, wenn sie wieder höheren SDS-Konzentrationen ausgesetzt werden (Levin *et al.*, 2005), weshalb sich biochemische Untersuchungen an diesen Aggregaten als schwierig erweisen. Mit einer foto-induzierten Vernetzungsmethoden, welche auf der direkten Vernetzung von Proteinen über Aminosäurereste (vorzugsweise Tyrosin) beruht (Fancy & Kodadek, 1999), konnten rPrP-Aggregate stabilisiert werden, wodurch sie resistent gegenüber einer Auflösung durch hohe SDS-Konzentrationen wurden (Abbildung 21). Die Vernetzungseffizienz wurde durch Western Blot-Analyse sowie mittels FCS ausgewertet. Eine Western Blot-Analyse von vernetzten rPrP-Aggregaten ist in Abbildung 21A dargestellt. Fluoreszenz-markiertes rPrP wurde dazu bei unterschiedlichen SDS-Konzentrationen (0,2 %, 0,06 %, und 0,02 %) inkubiert und Aliquots zur foto-induzierten Vernetzung durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Rutheniumbipyridylchlorid (Ru(pby)) und anschließender Belichtung mit unterschiedlichen Lichtintensitäten entnommen. Als Kontrollen wurden Aliquots unbehandelt belassen (-) oder nur mit den Vernetzungskomponenten (APS und Ru(bpy)) versetzt und ohne anschließende Belichtung analysiert (CL).

Von Ansätzen mit hohen SDS-Konzentrationen (0,2 %) konnten nur Banden mit dem Molekulargewicht von monomerem rPrP detektiert werden (Abbildung 21A, Spur 1-3). Sogar die höchste Belichtungsintensität (100 %) konnte keine Bandensignale oberhalb des Molekulargewichtes von monomerem rPrP hervorrufen, was darauf hindeutet, dass bei gelöstem rPrP die reaktiven Aminosäurereste für eine Vernetzung nicht dicht genug beieinander liegen. Im Gegensatz dazu zeigten die Ansätze, die mit geringen SDS-Konzentrationen (0,02 %), also unter Aggregations-fördernden Bedingungen (Abbildung 20A), inkubiert wurden, eine Reihe von Banden mit höherem Molekulargewicht, welche auf die Vernetzung von rPrP-Molekülen zu Dimeren, Trimeren und Multimeren höherer Ordnung zurückzuführen sind (Abbildung 21A, Spur 10-12). Dass das Auftreten von Vernetzungsprodukten bei den Ansätzen mit 0,02 % SDS auf dem Aggregationszustand und nicht auf der SDS-Konzentration beruht, konnte

dadurch gezeigt werden, dass sich mit rPrP unmittelbar nach Verdünnung der SDS-Konzentration ohne Inkubationsphase keine Vernetzungsprodukte erzeugen ließen (Daten nicht abgebildet).

Mit stärkeren Lichtintensitäten erhöhte sich die Stärke der Banden mit höherem Molekulargewicht, wohingegen die Intensität der Monomer-Banden abnahm, was auf die Einbindung der Monomere in Oligomer-Komplexe zurückzuführen ist. Wenn rPrP-Aggregate ohne anschließende Belichtung nur mit den Vernetzungskomponenten APS und Ru(bpy) versetzt wurden oder wenn die Proben ohne die Vernetzungskomponenten belichtet wurden, konnten keine Signale von Komplexen höherer Ordnung detektiert werden (Spur 8 und 9). Ansätze von rPrP die bei intermediären SDS-Konzentrationen (0,06 %) inkubiert wurden, zeigten keine Banden mit einem Molekulargewicht höher als monomeres rPrP, allerdings konnte bei einer Belichtung mit 100 % Intensität weder monomeres noch multimeres rPrP detektiert werden (Spur 7). Eine reduzierte Bandenintensität im Western Blot war auch für rPrP, welches bei 0,02 % SDS aggregiert wurde, zu beobachten, wenn die Belichtung mit einer Intensität von 10 % bzw. 20 % durchgeführt wurde. Eine Belichtung mit 100 % Intensität führte zu einem totalen Verlust der Banden in der Western Blot-Analyse. Es ist anzunehmen, dass sich bei der Verwendung von hohen Lichtintensitäten große Multimerkomplexe bilden, deren Molekulargewicht die Porengröße der SDS-PAGE (10 % Acrylamide) überschreitet und die denaturierten Proteine daher nicht in die Gelmatrix eindringen können. Ein weiterer Effekt, der zum Abnehmen der Bandenintensität führen könnte, ist die in der Dot Blot-Analyse beobachtete reduzierte Reaktivität der vernetzten Proteine mit dem Antikörper, welche durch eine verminderte Zugänglichkeit der Antikörper-Epitope zustande kommen könnte (Daten nicht abgebildet). Um die Vernetzung auf einzelmolekularer Ebene zu untersuchen, wurden FCS-Messungen von 10-fachen Verdünnungen der für den Western Blot aus Abbildung 21A verwendeten Proben durchgeführt. Die mittlere Diffusionszeit der Partikel durch den Laser-Focus der FCS-Apperatur, welche ein Maß für die Partikelgröße darstellt, ist in 21B gezeigt. Wie auch in der Western Blot-Analyse beobachtet, zeigen die Proben mit hohen (0,2 %) oder mittleren (0,06 %) SDS-Konzentrationen Diffusionszeiten, welche charakteristisch für monomeres, Fluoreszenz-markiertes rPrP sind.

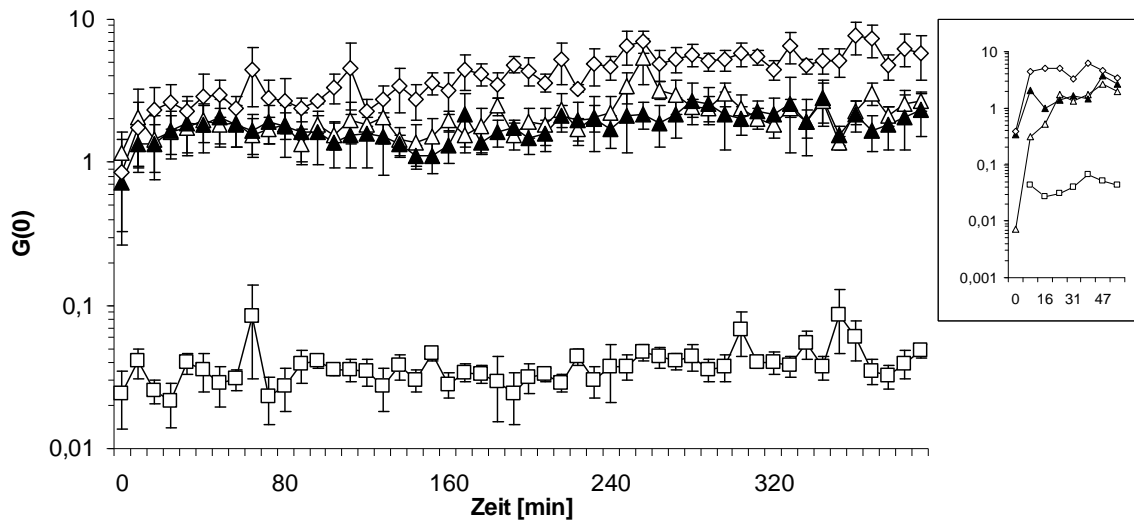


**Abbildung 21:** Stabilisierung von rPrP-Aggregaten

A) Fluoreszenz-markiertes rekombinantes Prionprotein (ca. 30 nM) wurde in Phosphatpuffer mit 0,2 %, 0,06 % oder 0,02 % SDS für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert, vernetzt und im Western Blot mit dem Antikörper 3B5 analysiert. Die durch intermolekulare Vernetzung entstandenen Multimere sind mit Pfeilen markiert, wobei mit einer Klammer an der rechten Seite die diffusen Signale von Multimeren mit hohem Molekulargewicht gekennzeichnet sind. B) Die Proben von Fluoreszenz-markiertem rPrP aus Abbildung 22A wurden nach der kovalenten Vernetzung 1:10 in ihrem Inkubationspuffer verdünnt und mittels FCS untersucht. Die durch graue Hinterlegung markierten Proben wurden in Phosphatpuffer mit 0,2% SDS verdünnt, um unstabilisierte Aggregate aufzulösen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Diffusionszeiten aus

der Auto-Korrelationsanalyse von 3 unabhängigen Ansätzen, die jeweils fünf Mal gemessen wurden. Die Proben wurden im Western Blot und mittels FCS entweder unbehandelt (-), nach Zugabe der Vernetzungskomponenten (100  $\mu$ M APS, 5  $\mu$ M Ru(bpy)) jedoch ohne Belichtung (CL) oder nach der Zugabe der Vernetzungskomponenten mit anschließender Belichtung mit Neutralfiltern unterschiedlicher Durchlässigkeit (1 %, 5 %, 10 %, 20 % oder 100 %) analysiert.

Im Gegensatz dazu ist die mittlere Diffusionszeit in den Ansätzen mit geringen SDS-Konzentrationen (0,02 %) erhöht und entspricht einer durchschnittlichen Partikelgröße von ungefähr 10-20 rPrP-Monomere (Abbildung 21B, Spuren auf der linken Seite). Diese Diffusionszeiten blieben unverändert, wenn die Proben einer foto-induzierten Vernetzung unterzogen wurden, weshalb anzunehmen ist, dass die Vernetzung die Struktur der Aggregate und den Grad der Oligomerisierung nicht beeinträchtigt (außer mit 100 % Lichtintensität). Wurden die rPrP-Aggregate durch eine Erhöhung der SDS-Konzentration von 0,02 % auf 0,2 % aufgelöst, sank die Diffusionszeit auf das Niveau von unaggregiertem rPrP ab, wenn die Aggregate nicht durch die foto-induzierte Vernetzung stabilisiert wurden (Abbildung 21B; CL, 0,02 % SDS => 0,2 % SDS). Ansätze die einer Vernetzungsprozedur unterzogen wurden, behielten ihre verlängerte Diffusionszeit auch nach der Erhöhung der SDS-Konzentration, wenn die Proben mit einer geeigneten Intensität belichtet wurden (10 % und 20 %). Mit geringeren Intensitäten fiel die Diffusionszeit nach SDS-Konzentrationserhöhung wieder auf das Niveau von monomerem rPrP (1 %) bzw. auf ein mittleres Niveau (5 %) ab, was darauf hindeutet, dass die Aggregate unter diesen Bedingungen nur partiell vernetzt und nicht vollständig stabilisiert wurden. Bei mit sehr hohen Lichtintensitäten (100 %) behandelten Proben, wurde eine unerwartet geringere Diffusionsgeschwindigkeit gemessen. Im Hinblick auf die Ergebnisse der Western Blot-Analyse (Abbildung 21A, Spur 14) ist dies wahrscheinlich auf eine „Über-Vernetzung“ zurückzuführen, wodurch mehrere in sich stabilisierte Oligomere vernetzt werden und so Multimere mit einem überhöhten Molekulargewicht entstehen, die nicht in die Matrix der SDS-PAGE eindringen können bzw. welche sich aufgrund ihrer Größe und daher ihrer langen Diffusionszeiten einer ungescannten FCS-Messung entziehen. Diese großen Partikel konnten jedoch in gescannten FCS-Messungen, bei denen ein größerer Bereich des Reaktionsvolumens von dem Anregungslaser „abgetastet“ wird, erfasst werden (Daten nicht abgebildet).



**Abbildung 22:** „Seeding“-Kapazität von stabilisierten rPrP-Oligomeren

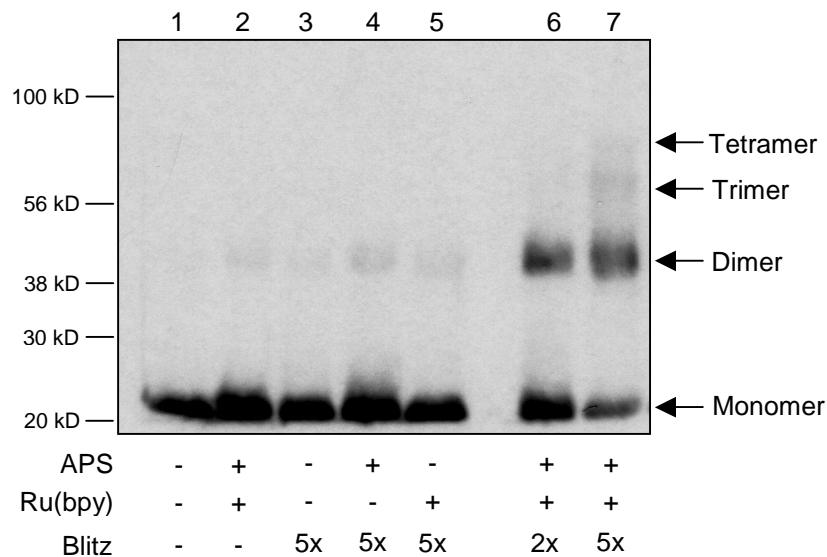
Unmarkiertes rPrP (2  $\mu\text{M}$ ) wurde durch Inkubation in Phosphatpuffer mit 0,02% SDS für 3 h in Oligomere überführt. Aliquots dieses voraggregierten, unmarkierten rPrP wurden entweder unbehandelt belassen ( $\Delta$ ), ohne anschließende Belichtung mit den Vernetzungskomponenten versetzt (333  $\mu\text{M}$  APS, 16  $\mu\text{M}$  Ru(bpy)) ( $\blacktriangle$ ) oder 2x mit 100 % Intensität nach der Zugabe von 333  $\mu\text{M}$  APS und 16  $\mu\text{M}$  Ru(bpy) belichtet ( $\diamond$ ) und in einem Verhältnis von 1:20 in eine Lösung von Fluoreszenz-markiertem rPrP (ca. 5 nM) in Phosphatpuffer mit 0,01 % SDS gegeben. Die Ansätze wurden anschließend für weitere 5 h inkubiert, während dieser Zeit mittels FCS untersucht (Messungen von 10 s jede 8 min) und mit Ansätzen verglichen, zu denen keine voraggregierten, unmarkierten rPrP-Oligomere gegeben wurden ( $\square$ ). Die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Kreuzkorrelationsamplituden ( $G(0)$ ) von vier unabhängigen Experimenten sind abgebildet. Die Kurven in der seitlich abgebildeten Box zeigen einen Ausschnitt aus einer repräsentativen Einzelmessung und verdeutlichen die schnelle Kinetik der Aggregationsinitiation.

Die stabilisierten rPrP-Oligomere wurden weiterhin auf ihre Fähigkeit überprüft, als „Seed“ eine Aggregation zu induzieren. Wie schon in Abbildung 20B dargestellt, wurden Aggregationsreaktionen durchgeführt, zu denen vorgeformte, unmarkierte Aggregate gegeben wurden. Die vorgeformten „Seeds“ wurden jedoch vorher einer foto-induzierten Vernetzung unterzogen (Abbildung 22,  $\diamond$ ). Im Vergleich zu den Reaktionen, in denen die Aggregation durch Zugabe von unstabilisierten, vorgeformten Aggregaten beschleunigt wurde (Abbildung 20B und Abbildung 22,  $\Delta$ ), zeigten die stabilisierten Oligomere keine Beeinträchtigung ihrer Fähigkeit, Aggregation zu

induzieren. Dies deutet darauf hin, dass durch die intermolekulare Vernetzung die Aggregatstruktur zwar stabilisiert, jedoch Epitope, die für das “Seeding“ von Bedeutung sind, nicht beeinträchtigt werden (Piening *et al.*, *Amyloid*, in revision).

### 3.2.2. Stabilisierung von infektiösem PrP<sup>Sc</sup>

Nach der erfolgreichen foto-induzierten Stabilisierung von rPrP-Aggregaten wurde die Vernetzungstechnik auf infektiöse Prionen ausgedehnt. Dazu wurde PrP<sup>Sc</sup> aus Mäusen infiziert mit ME7 aufgereinigt und einer Vernetzung nach Verdau mit Proteinase K unterzogen.



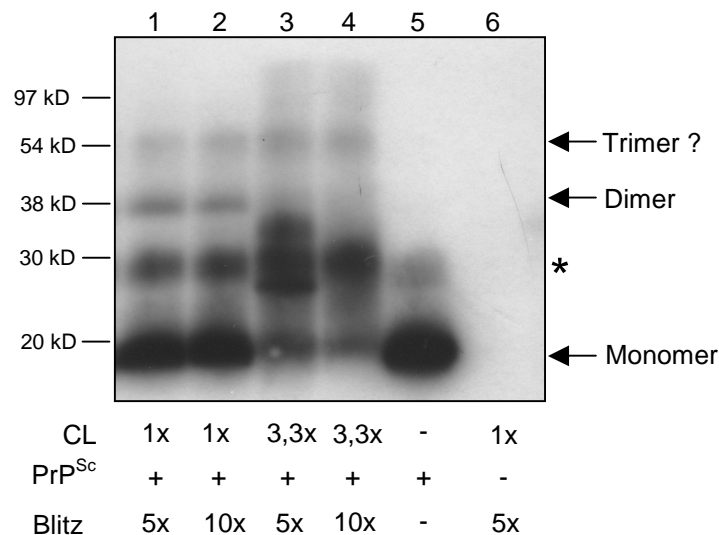
**Abbildung 23:** Intramolekulare Vernetzung von aufgereinigten Prionen

Aufgereinigtes PrP<sup>Sc</sup> aus Mäusen infiziert mit ME7 (200 ng/μl) wurde vor der foto-induzierten Vernetzung bei 37 °C für 1 h mit Proteinase K (0,1 mg/ml) verdaut. Der PK-Verdau wurde mit 10 mM PefaBloc abgestoppt. Die Ansätze wurden anschließend mit 2 mM APS und 0,1 mM Ru(bpy) versetzt und mit 100 % Intensität 2 bzw. 5 Mal belichtet. Die Proben wurden anschließend deglykosyliert und einer Western Blot-Analyse mit dem polyklonalen Antikörper RA3153 unterzogen. Die durch intermolekulare Verknüpfung entstandenen Multimere sind seitlich markiert.

Wie aus der Western Blot-Analyse der deglykosylierten Proben (Abbildung 23) ersichtlich, waren durch die kovalente Verknüpfung von Monomeren Banden mit einem Molekulargewicht von Dimeren und Trimeren detektierbar. Bei den unbehandelten



Proben sowie bei den Kontroll-Proben, die nur belichtet oder nur mit APS bzw. Ru(bpy) versetzt wurden, waren zwar auch sehr schwache Dimer-Banden auszumachen (Abbildung 23, Spur 1-5), da jedoch für unbehandelte PrP<sup>Sc</sup>-Präparationen mehrfach dimeres Prionprotein beschrieben wurde (Priola *et al.*, 1995), sind die in den Kontroll-Proben auftretenden Dimer-Banden auf eine intrinsische Eigenschaft von PrP<sup>Sc</sup> zurückzuführen. Wie schon bei der Vernetzung von rekombinantem Prionprotein beobachtet werden konnte (Abbildung 21A), erhöhte sich einhergehend mit einer Abnahme der monomeren Bandenintensität auch beim vernetzten PrP<sup>Sc</sup> mit steigender Belichtungsintensität die Stärke der Banden hochmolekularer Multimerkomplexe (Abbildung 23, Spur 7). Dies deutet darauf hin, dass bei höheren Belichtungsintensitäten mehr Monomere in Komplexe höherer Ordnung fixiert werden.



**Abbildung 24:** Intramolekulare Vernetzung von Prionen im Hirnhomogenat

10 %iges Hirnhomogenat wurde mit 100 % Intensität 5 bzw. 10 Mal belichtet, wobei verschiedene Konzentrationen der Vernetzungskomponenten (CL) eingestellt wurden (1x: 1 mM APS, 0,05 mM Ru(bpy); 3,3x: 3,3 mM APS, 0,16 mM Ru(bpy)). Vernetzte Proben wurden mit Proteinase K (0,1 mg/ml) bei 37 °C für 1 h verdaut und anschließend mit PNGase F deglykosyliert. Die Western Blot-Analyse wurde mit dem monoklonalen Antikörper 3F4 durchgeführt. Die durch intermolekulare Vernetzung entstandenen Multimere sind mit Pfeilen markiert. Der Stern markiert eine PrP-spezifische Bande, welche wahrscheinlich durch unvollständigen PK-Verdau und Deglykosylierung hervorgerufen wurde.

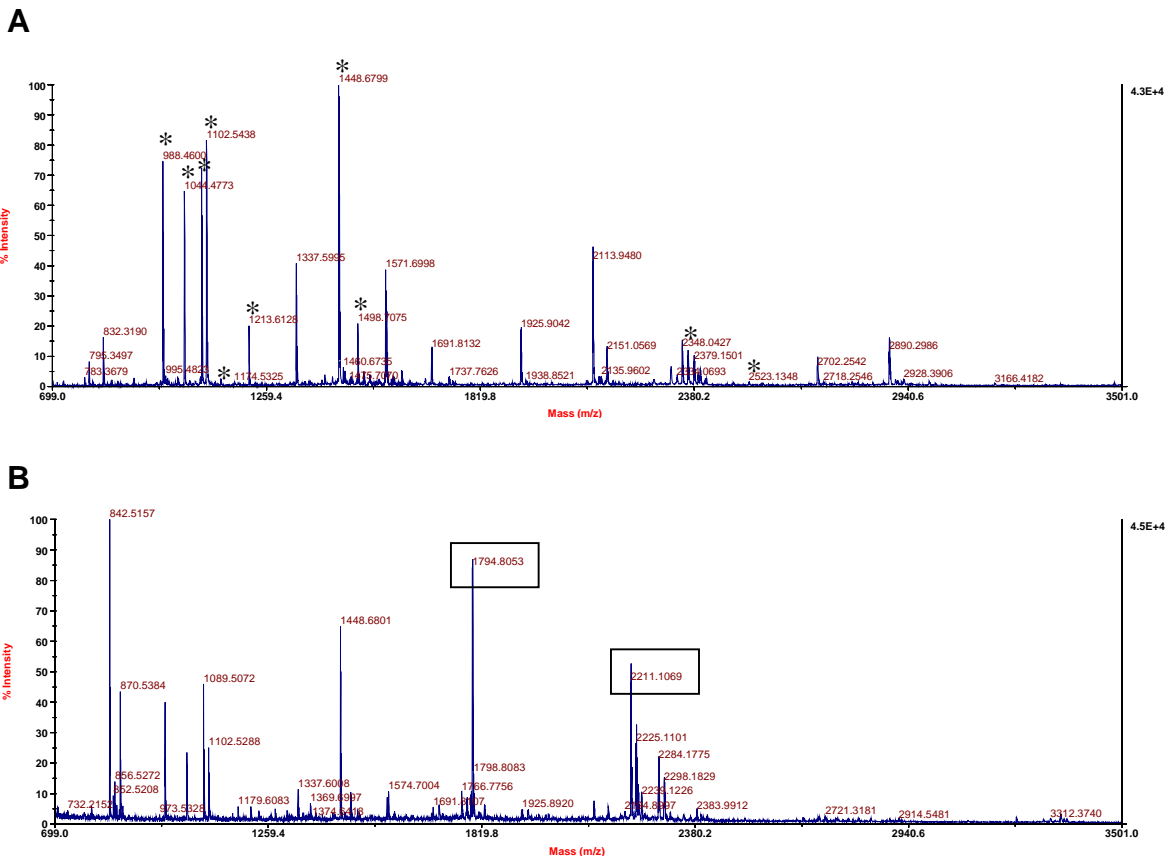
Obwohl die Konzentration der Vernetzungskomponenten erhöht werden musste, konnte eine spezifische Vernetzung von PrP<sup>Sc</sup> auch in 10 %igem Hirnhomogenat erreicht werden. Die Western Blot-Analyse von vernetztem Hamster-PrP<sup>Sc</sup> (263K) verdünnt mit 10 %igem Hirnhomogenat uninfizierter Tiere nach PK-Verdau und Deglykosylierung ist in Abbildung 24 dargestellt. Im Vergleich zu unbehandelten Proben (Spur 5) konnte nach der foto-induzierten Vernetzung eine Bande mit dem Molekulargewicht von dimerem Prionprotein detektiert werden (Spur 1-2). Des Weiteren war eine Bande mit dem Molekulargewicht von trimeren PrP<sup>Sc</sup> nach PK-Verdau und Deglykosylierung zu beobachten (Spur 1-4). Allerdings lässt sich diese Bande auch durch die Dimerisierung von unvollständig verdautem bzw. unvollständig deglykosyliertem PrP<sup>Sc</sup> erklären, welches als Monomer-Bande in der Western Blot-Analyse erkennbar war (Abbildung 24, Spur 1-4, mit Stern markiert). Wie erwartet, konnten nach der Vernetzung von Hirnhomogenat aus uninfizierten Tieren nach PK-Verdau keine PrP-spezifischen Banden detektiert werden (Abbildung 24, Spur 5).

Um zu beurteilen, ob die kovalente Vernetzung von Prionen die Infektiosität beeinträchtigt, wurden in Hirnhomogenat verdünntes Hamster-PrP<sup>Sc</sup> (263K) vernetzt und die Vernetzungsprodukte intrazerebral in Syrische Goldhamster inokuliert. Im Vergleich zu Kontrolltieren, welche mit unbehandeltem Hirnhomogenat inokuliert wurden und eine Inkubationszeit von  $90 \pm 3,7$  Tagen (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler) aufwiesen, zeigte sich durch die Vernetzung des PrP<sup>Sc</sup> im Inokulat keine signifikante Veränderung der Inkubationszeit ( $96 \pm 5,2$  Tage). Wie die Stabilisierung von rPrP-Aggregaten auf deren „Seeding“-Kapazität (Abbildung 22) hat auch die kovalente Vernetzung der PrP<sup>Sc</sup>-Aggregate keine Beeinträchtigung der für die Vermehrung von Prionen notwendigen Protein-Oberflächen zur Folge (Piening *et al.*, *Amyloid*, in revision).

### **3.2.3. MS-Analyse von stabilisierten PrP-Aggregaten**

Um die Interaktionsflächen in PrP-Aggregaten genauer zu bestimmen, wurden Aggregate von rekombinantem humanen Prionprotein durch das Detergenz-Verdünnungsverfahren (Post *et al.*, 1998) erzeugt und durch foto-induzierte Vernetzung (Fancy & Kodadek, 1999) stabilisiert. Die resultierenden Vernetzungsprodukte wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und Monomer sowie Multimer-Banden aus dem Gel ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Banden wurden durch die Protease Trypsin,

welche Aminosäureketten hinter Lysinen und Argininen schneidet, verdaut. Die erhaltenen Peptide wurden einer Analyse durch Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation-Massenspektrometrie (MALDI-MS) unterzogen. Die erhaltenen Spektren sind für monomeres und pentameres rPrP exemplarisch in Abbildung 25 dargestellt.



**Abbildung 25:** Massenspektrometrische Analyse von vernetzten rPrP-Aggregaten

Unmarkiertes rPrP wurde durch Verdünnung der SDS-Konzentration von 0,2 % auf 0,02 % in Aggregate überführt. Die Aggregate wurden durch foto-induzierte Vernetzung stabilisiert und die Vernetzungsprodukte durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Aus der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE wurden die Banden von monomerem rPrP sowie von durch die Vernetzung entstandenem oligomeren rPrP ausgeschnitten und einem Verdau mit Trypsin unterzogen. Die durch den tryptischen Verdau entstandenen Peptide wurden aufgereinigt und mittels MALDI-TOF im Reflektor-Modus analysiert. Die resultierenden Spektren sind für monomeres rPrP (A) und pentameres rPrP (B) dargestellt. rPrP-spezifische Massen sind mit (\*) gekennzeichnet. Die differentiell auftretenden Massen 1794 und 2211 sind durch Umrahmung markiert.

Der Großteil der Massensignale mit hoher Intensität ließ sich Peptiden von unvernetztem rPrP zuordnen (Abbildung 25A). In den Spektren der Vernetzungsprodukte traten weiterhin Signale auf, die in den Spektren von monomerem rPrP nicht zu finden waren (Abbildung 25B) und daher aus der kovalenten Verbindung der Interaktionsflächen zweier benachbarter rPrP-Moleküle resultieren könnten. Die genaue Bestimmung dieser Peptide würde Aufschluss über die molekularen Interaktionsflächen in rPrP-Aggregaten liefern. Die Massen 1794 und 2211 traten beispielsweise differentiell in den Spektren der Vernetzungsprodukte auf und nahmen bei Oligomeren höherer Ordnung an Intensität zu. Obwohl sich diese neu auftretenden Massen außerdem durch in PrP<sup>Sc</sup>-Modellen aneinanderliegende Peptide erklären ließen, deuteten Daten aus der Sequenzanalyse dieser Massen darauf hin, dass es sich hierbei um Trypsin-spezifische Artefakte handelte. Diese Vermutung wurde einerseits durch die Kontroll-Analyse von „Protein-freien“ Gelstücken und andererseits durch die Analyse von vernetzten rPrP-Aggregaten der Maus, welche an den entsprechenden Peptiden eine andere Aminosäuresequenz als humanes rPrP aufweist, gestützt. Es konnten daher bisher noch keine differentiellen Massen eindeutig vernetzten rPrP-Peptiden zugeordnet werden.

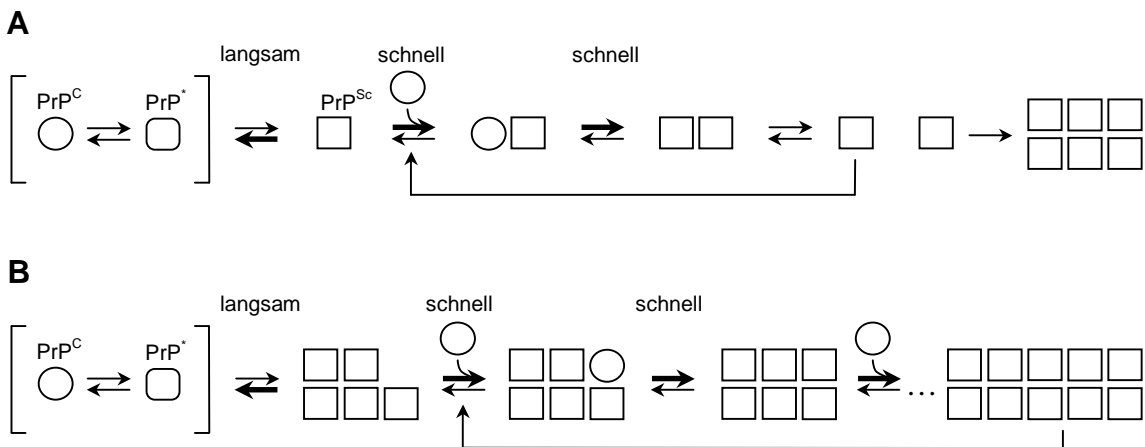
## 4. Diskussion

Obwohl die Prion-Hypothese, welche ein zur autokatalytischen Vermehrung fähiges missgefaltetes Protein als infektiöses Agens postuliert (Prusiner, 1998), aufgrund zahlreicher experimenteller Belege allgemein akzeptiert ist, sind einige grundlegende Aspekte der Prionkrankheiten noch ungeklärt. So konnte die für den molekularen Beweis der Prion-Hypothese essentielle Vermehrung von infektiösen Prionen *in vitro* bisher nicht zweifelsfrei dargestellt werden. Weiterhin sind die molekularen Grundlagen für das Vorkommen verschiedener Erregerstämme innerhalb einer Spezies und der damit eng verknüpften Speziesbarrieren nur in Ansätzen aufgeklärt. Da angenommen wird, dass die Eigenschaften der Erregerstämme durch eine unterschiedliche Konformation des missgefalteten Prionproteins bestimmt werden, wird deutlich, dass eine Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von PrP<sup>Sc</sup> für die Klärung der mit der Speziesbarriere und den Erregerstämmen verbundenen Phänomene essentiell ist. Mit Hilfe von *in vitro* Konversionsexperimenten wurden diese Fragestellungen auf molekularer Ebene untersucht. Die erzielten Ergebnisse und ihre Bedeutung sollen in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

### 4.1. Autokatalytische Vermehrung von Infektiösität *in vitro*

Zur Darstellung der autokatalytischen Vermehrung von PrPres und zur Erzeugung von Infektiösität *in vitro* wurden serielle PMCA-Experimente durchgeführt (Abbildung 2). Mit Hilfe der PMCA-Reaktion kann durch eine zyklische Abfolge von Ultraschallbehandlungen und Inkubationphasen die Protease-resistente Isoform des Prionproteins (PrPres) in Hirnhomogenat *in vitro* amplifiziert werden (Saborio *et al.*, 2001). Wie in der Abbildung 2B dargestellt ist, konnte nach einer seriellen PMCA (sPMCA), bei welcher fünfzehn PMCA-Zyklen durchgeführt wurden und zwischen jedem Zyklus der Reaktionsansatz mit uninifiziertem Hirnhomogenat verdünnt wurde, noch PrPres detektiert werden. Die Quantifizierung ergab eine 200.000-fache Amplifikation von PrPres bei gleichzeitiger Verdünnung des am Anfang der Reaktion eingesetzten, aus Hirnen infizierter Tiere isolierten PrP<sup>Sc</sup> um den Faktor 372.529. Dass in allen PMCA-Zyklen eine Amplifikation von PrPres erfolgte und daher nach einer so hohen Verdünnung des infektiösen Ausgangsmaterials noch PrPres und

Konversionsaktivität detektiert werden konnten, zeigt, dass *in vitro* erzeugtes missgefaltetes Prionprotein die Fähigkeit zur autokatalytischen Vermehrung besitzt. Dass das durch sPMCA-Reaktionen neu gebildete PrPres auch infektiös ist, konnte durch Inokulation der sPMCA-Produkte in Syrische Goldhamster gezeigt werden. Durch Koppelung des PrPres an ein inertes Trägermaterial wurde sogar ein infektiöser Titer erzielt, der sich nicht von dem einer entsprechende Menge aus Hirnen infizierter Tiere gewonnenen PrP<sup>Sc</sup> unterscheiden ließ. Daraus wird deutlich, dass sich, der Prion-Hypothese entsprechend, Prionen *in vitro* autokatalytisch vermehren lassen und die Infektiösität der *in vitro* erzeugten Prionen der von aus Hirnen isolierten Prionen entspricht, wenn die Struktur der PrP-Aggregate bestimmte Kriterien erfüllt (Weber *et al.*, *Nature*, submitted).



**Abbildung 26:** Mechanistische Modelle zur PrP<sup>Sc</sup>-Bildung

A) Nach dem „Heterodimer“-Modell stellt die initiale Umfaltung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der PrP<sup>Sc</sup>-Bildung dar. Die Umfaltungsreaktion benötigt möglicherweise ein Faltungsintermeditat (PrP<sup>\*</sup>). Schon gebildetes PrP<sup>Sc</sup> ist in der Lage die Umfaltung von PrP<sup>C</sup> durch die Bildung eines „Heterodimers“ zu katalysieren. Das dadurch entstandene PrP<sup>Sc</sup>-Dimer dissoziiert und die PrP<sup>Sc</sup>-Monomere sind in der Lage weiteres PrP<sup>C</sup> zu konvertieren. Die Oligomerisierung von PrP<sup>Sc</sup> zu größeren Aggregaten ist dabei ein sekundärer Prozess. B) Bei dem „seeded polymerisation“-Modell ist die Bildung eines Aggregationskeims („seed“) der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Auch hier benötigt die Umfaltungsreaktion möglicherweise ein Faltungsintermeditat (PrP<sup>\*</sup>). Bei Überschreitung einer kritischen Größe ist der Aggregationskeim in der Lage, PrP<sup>C</sup> mit hoher Affinität zu binden und in PrP<sup>Sc</sup> zu überführen. Die PrP<sup>C</sup>-Bindung und Konversion stabilisiert den Aggregationskeim, so dass die Aggregatgröße durch weitere PrP<sup>C</sup>-Assoziation und Umwandlung in PrP<sup>Sc</sup> zunimmt. Große Aggregate können in kleinere Oligomere zerfallen, welche wiederum Aggregationskeime darstellen.

Die Prion-Hypothese legt der Aggregation der missgefalteten Form des Prionproteins einerseits eine direkte Wechselwirkung der PrP-Moleküle und andererseits die Umfaltung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> zugrunde (Kocisko *et al.*, 1995; Prusiner, 1996; Weissmann, 1996), wobei für den Mechanismus der PrP<sup>Sc</sup>-Bildung im Wesentlichen zwei theoretische Modelle entwickelt wurden (Abbildung 26). Das „Heterodimer“-Modell (Prusiner, 1991) geht von der Annahme aus, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der PrP<sup>Sc</sup>-Bildung, die initiale Umfaltung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> darstellt. Das gebildete PrP<sup>Sc</sup> ist dabei in der Lage die weitere Umwandlung von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> zu katalysieren. Das dadurch entstehende PrP<sup>Sc</sup>-Dimer dissoziiert anschließend in monomeres PrP<sup>Sc</sup>. Die Polymerisation des PrP<sup>Sc</sup> in größere Aggregate wird in diesem Modell als ein sekundärer Prozess betrachtet. Ein anderer Mechanismus der PrP<sup>Sc</sup>-Bildung wird im „seeded polymerisation“-Modell zugrunde gelegt (Jarrett & Lansbury, Jr., 1993). Dieses Modell postuliert im Gegensatz zum „Heterodimer“-Modell als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der PrP<sup>Sc</sup>-Bildung die Formation von Aggregationskeimen („seeds“), welche aus mehreren PrP<sup>Sc</sup>-Monomeren bestehen. Diese initialen PrP<sup>Sc</sup>-Oligomere sind bei Überschreitung einer kritischen Größe in der Lage, PrP<sup>C</sup> mit einer hohen Affinität zu binden und in PrP<sup>Sc</sup> zu überführen. Die Vergrößerung der Aggregationskeime durch die Bindung und Konversion weiterer PrP<sup>C</sup>-Moleküle führt zu einer erhöhten Stabilität der Oligomere. Die durch diesen Prozess entstehenden größeren Aggregate können in kleinere konversionsaktive „seeds“ zerfallen, wodurch die PrP<sup>Sc</sup>-Bildung beschleunigt wird.

In den seriellen PMCA-Experimenten hat sich das Zerschneiden der Aggregate durch die Ultraschallbehandlung und die dadurch hervorgerufene Vermehrung der Aggregationskeime als essentiell für eine effiziente autokatalytische Propagation von PrPres *in vitro* erwiesen (Abbildung 2D) (Piening *et al.*, 2005), was für die Richtigkeit des „seeded polymerisation“-Modells spricht. Aufgrund weiterer experimenteller Belege für einen „seeded polymerisation“-Mechanismus (Come *et al.*, 1993; Bessen *et al.*, 1997) sowie den Ergebnissen von kinetischen Analysen auf der Grundlage biophysikalischer Kriterien, die gezeigt haben, dass ein lineares „Heterodimer“-Modell ohne einen kooperativen Bindungsmechanismus die PrP<sup>Sc</sup>-Aggregationskinetik nur ungenügend erklären kann (Eigen, 1996), ist somit das „seeded polymerisation“-Modell dem „Heterodimer“-Modell vorzuziehen.

## 4.2. Primärsequenz, Proteinkonformation und Speziesbarriere

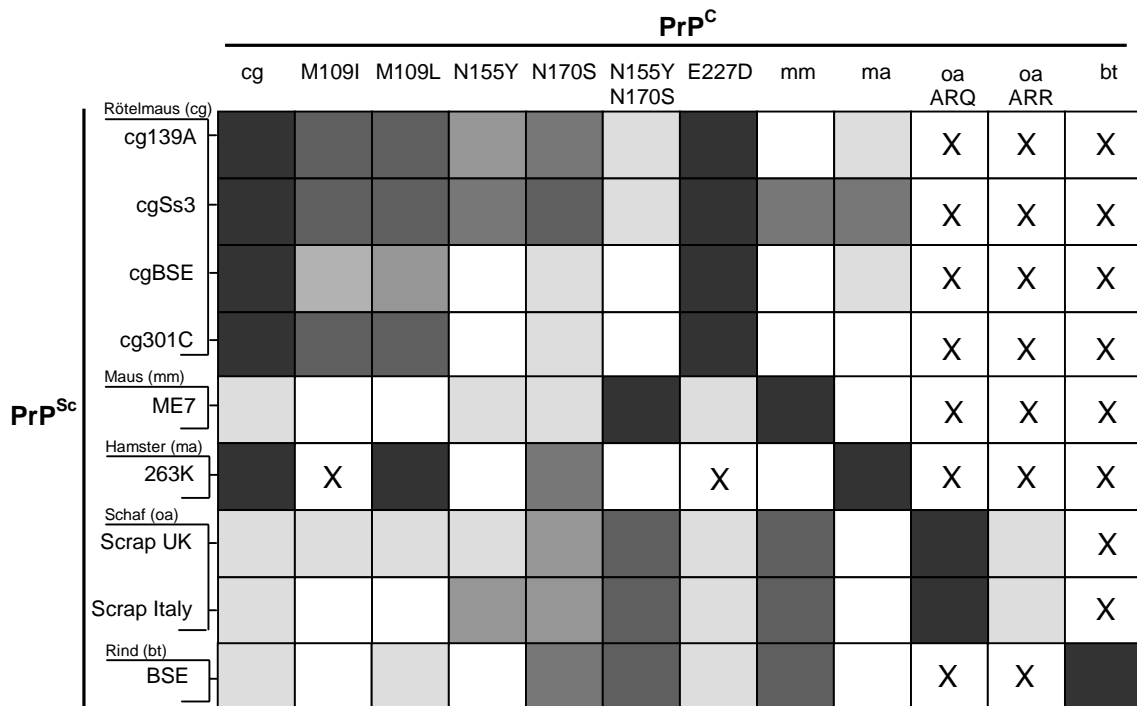
Wie aus den Modellen zur PrP<sup>Sc</sup>-Bildungskinetik (Abbildung 26) ersichtlich ist, spielt die Interaktion der PrP-Moleküle und die Konversion des zellulären Prionproteins in seine pathogene Isoform bei der PrP<sup>Sc</sup>-Bildung eine wesentliche Rolle. Die Primärsequenz des Prionproteins hat dabei einen wichtigen Einfluss auf die Konversionseffizienz und damit auch auf die Übertragbarkeit einer TSE-Erkrankung auf verschiedene Spezies (Kocisko *et al.*, 1995). Die Rolle der Primärsequenz für die Speziesbarrieren der Rötelmaus, welche aufgrund der hohen Empfindlichkeit für Schaf-Scrapie und der Resistenz gegenüber einer BSE-Infektion von besonderem Interesse für die Prionforschung ist, wurde mit Hilfe von *in vitro* Konversionsexperimenten untersucht. Fünf verschiedene *in vitro* Konversionsverfahren wurden dazu auf ihre Eignung geprüft, den Einfluss der Primärsequenz auf die Konversion des Prionproteins zu analysieren (Abbildung 4-6). Ein auf der Inkubation von gereinigtem PrP<sup>Sc</sup> und gereinigtem, <sup>35</sup>S-markiertem PrP<sup>C</sup> basierendes Verfahren (Kocisko *et al.*, 1994) wurde im Zuge dieser Evaluation für die weiteren Analysen ausgewählt, da durch die Verwendung von aufgereinigten Komponenten in diesem Konversionsverfahren der Einfluss von zusätzlichen Faktoren minimiert wurde und sich durch die Verwendung von radioaktiv markiertem PrP<sup>C</sup> das neu gebildete PrPres zweifelsfrei detektieren ließ (Abbildung 6B). Die mit Hilfe dieser Methode ermittelten Konversionsdaten, sind detailliert in Abbildung 13-19 dargestellt und in einem Gesamtüberblick in Abbildung 27 zusammengefasst.

### 4.2.1. Interaktion als Voraussetzung für die Konversion

Da sich die Rötelmaus in Transmissionsstudien im Vergleich zur Hausmaus als empfindlicher gegenüber einer Infektion mit Schaf-Scrapie gezeigt, sich jedoch als resistent gegenüber einer BSE-Infektion erwiesen hat (Cartoni *et al.*, 2005) (Agrimi unveröffentlicht), wurde zur Bewertung der Rolle der Primärsequenz für die differentielle Empfindlichkeit, die Sequenz des Prionproteins der Rötelmaus an den Codons 109, 155, 170 und 227 in Maus-spezifische Aminosäuren umgewandelt. Keine der eingeführten Mutationen M109I, M109L, N155Y, N170S, N155Y-N170S und E227D bewirkte unter den angewandten Reaktionsbedingungen die spontane Ausbildung einer Resistenz gegenüber einem Verdau mit Proteinase K ohne die



Anwesenheit von PrP<sup>Sc</sup>. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass der Einfluss der Punktmutationen auf die Konversionseffizienz entscheidend von dem verwendeten Erregerstamm abhing. So verringerte sich beispielsweise die Konversionseffizienz durch die Einführung der Mutationen N155Y und N170S bei der Inkubation mit aufgereinigtem PrP<sup>Sc</sup> aus der Rötelmaus oder aus Hamster (Abbildung 13, 17, 27).



**Abbildung 27:** Zusammenfassung der Ergebnisse der *in vitro* Konversionsreaktionen

Graphische Darstellung der Konversionseffizienzen aus der *in vitro* Konversion verschiedener Prionproteinvarianten mit PrP<sup>Sc</sup> verschiedener Erregerstämme. Es wurden pro PrP<sup>C</sup>-PrP<sup>Sc</sup>-Kombination in der Regel 6-12 unabhängige Konversionsexperimente durchgeführt und die Konversionseffizienz bestimmt (von den Experimenten mit Hamster-263K wurden pro PrP<sup>C</sup>-PrP<sup>Sc</sup>-Kombination 3-4 unabhängige Reaktionen durchgeführt). Die Höhe der Konversionseffizienz ist innerhalb einer Reihe auf die homologe Reaktion (PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> haben die gleiche Aminosäuresequenz) mit der höchsten Konversionseffizienz (schwarz) bezogen. Intermediäre Konversionseffizienzen sind durch verschiedene Graustufen dargestellt (dunkelgrau: höhere Konversionseffizienz, hellgrau: niedrige Konversionseffizienz) und die niedrigste Konversionseffizienz innerhalb einer Reihe ist in weiß gehalten. cg: Rötelmaus (*Clethrionomys glareolus*); M109I, M109L, N155Y, N170S, N155Y-N170S, E227D: cg mit der angegebenen Punktmutation; mm: Maus (*Mus musculus*); ma: Hamster (*Mesocricetus auratus*); oa: Schaf (*Ovis aries*) mit Genotyp ARQ oder ARR; bt: Rind (*Bos taurus*); cg139A, cgSs3:

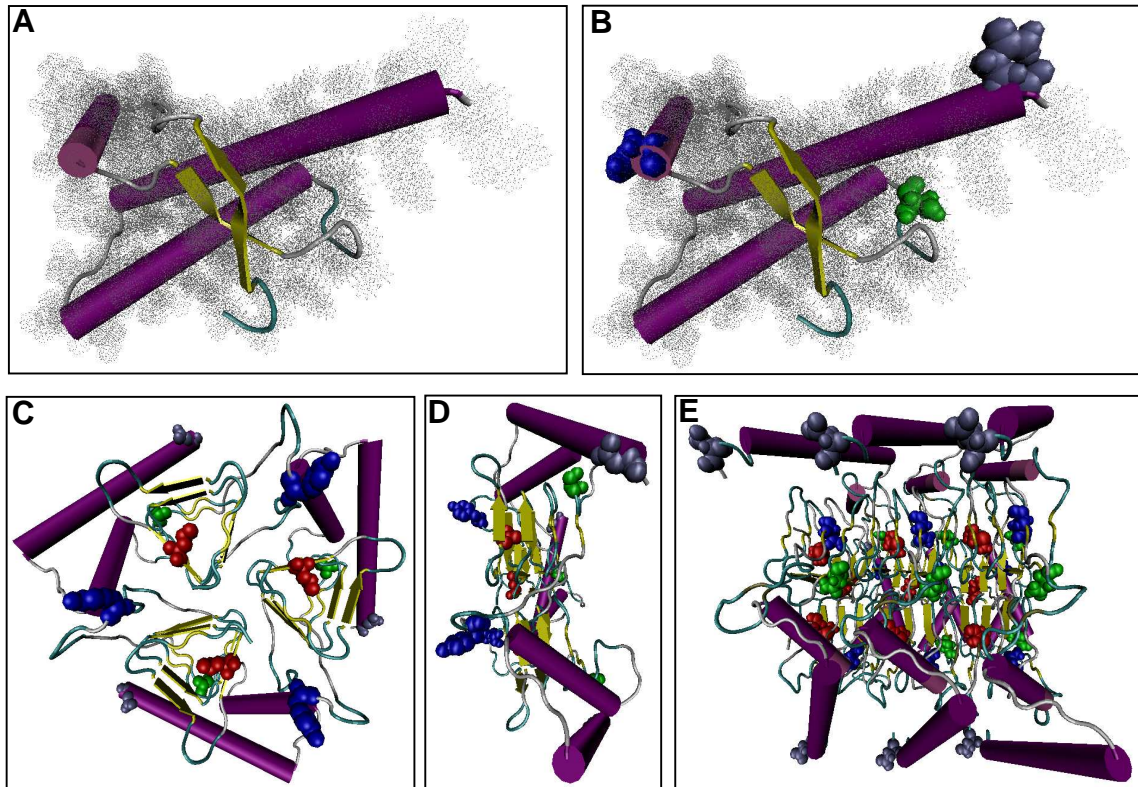
Erregerstämme der Rötelmaus mit Verwandtschaft zu Schaf-Scrapie; cgBSE, cg301C: Erregerstämme der Rötelmaus mit Verwandtschaft zu BSE; ME7: Erregerstamm aus Maus; 263K: Erregerstamm aus Hamster; Scrap UK, Scrap Italy: Erregerstämme aus Schaf; BSE: Erregerstamm aus Rind; X: nicht durchgeführt.

Wurden dieselben veränderten Prionproteine hingegen mit PrP<sup>Sc</sup> aus der Maus (Abbildung 15, 27), dem Rind oder dem Schaf inkubiert (Abbildung 18, 19, 27), konnte eine Erhöhung der Konversionseffizienz beobachtet werden. Die im Vergleich zum Wildtyp-PrP<sup>C</sup> beobachteten Veränderungen der Konversionseffizienzen lassen sich entsprechend nicht auf eine generelle stabilisierende bzw. destabilisierende Wirkung dieser Punktmutationen auf die PrP<sup>C</sup>-Struktur und einer damit einhergehenden generellen Hemmung bzw. Begünstigung der Konversion von PrP<sup>C</sup> durch die Veränderung der Aminosäuresequenz zurückführen, sondern sind im Zusammenhang mit dem eingesetzten PrP<sup>Sc</sup> zu betrachten. Im Einklang mit der Prion-Hypothese spielt somit die Interaktion von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> für die beobachteten Auswirkungen der Mutationen eine fundamentale Rolle, wobei bestimmte Regionen des Prionproteins dabei eine größere Rolle spielen (Abbildung 27).

#### **4.2.2. Punktmutationen und Interaktionsflächen**

Da der Austausch einer Aminosäure im zellulären Prionprotein die Konversionseffizienz in Abhängigkeit von der Interaktion mit PrP<sup>Sc</sup> beeinflusst, ist anzunehmen, dass Veränderungen in der Aminosäuresequenz eine Veränderung der Interaktionsflächen hervorrufen. Abhängig vom eingesetzten Erregerstamm kann diese Veränderung der Interaktionsflächen die Konversion behindern oder begünstigen. Um den Einfluss der vorgenommenen Veränderungen in der Primärsequenz des Prionproteins auf die Interaktionsflächen beurteilen zu können, ist daher die Betrachtung der Lage der entsprechenden Aminosäuren sowohl in der räumlichen Struktur von PrP<sup>C</sup> als auch in den verfügbaren Strukturmodellen von PrP<sup>Sc</sup> nötig.

Abbildung 28A zeigt aufgrund der fehlenden Strukturdaten zum PrP<sup>C</sup> der Rötelmaus beispielhaft die aus NMR-Analysen gewonnene Struktur der globulären Domäne (Aminosäuren 125-228) des humanen zellulären Prionproteins, wobei die Sekundärstrukturelemente überlagert von der Van-der-Waals-Struktur, welche die tatsächliche Molekülausdehnung im Raum darstellt, abgebildet sind.



**Abbildung 28:** Lage der veränderten Aminosäurereste in Modellen von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>

A,B) Globuläre Domäne des humanen PrP<sup>C</sup> (Aminosäure 125-228). Dargestellt sind die von der Van-der-Waals-Struktur überlagerten Sekundärstrukturelemente (lila:  $\alpha$ -Helix; gelb:  $\beta$ -Faltblatt); N-Terminus: vorne mitte; C-Terminus: oben rechts. B) Lage der Aminosäuren H155 (blau), S170 (grün) und Q227 (eisblau). C-E) Strukturmodelle von PrP<sup>Sc</sup>. Eingezeichnet ist die Lage der Aminosäuren 108/109 (rot), 154/155 (blau), 169/170 (grün) und 226/227 (eisblau) in den Sekundärstrukturelementen (lila:  $\alpha$ -Helix; gelb:  $\beta$ -Faltblatt). C,D) Modell von Maus-PrP<sup>Sc</sup> nach Govaerts *et al.* (Govaerts *et al.*, 2004). Drei PrP<sup>Sc</sup>-Moleküle sind zu einem Trimer assoziiert. Die Aminosäuren L108 (rot), Y154 (blau), N169 (grün) und D226 (eisblau) sind farblich markiert. C) von „oben“ (Blick auf den N-Terminus). D) von der „Seite“ (links ist der N-Terminus mit der ersten N-terminalen Windung der  $\beta$ -Helix und rechts der C-Terminus mit der letzten C-terminalen Windung der  $\beta$ -Helix). E) Seitenansicht des Modells Nr. 2 von Hamster-PrP<sup>Sc</sup> nach Stork *et al.* (Stork *et al.*, 2005). Drei PrP<sup>Sc</sup>-Moleküle sind zu einem Trimer assoziiert. Drei übereinander geschichtete Trimer-Moleküle deuten den Aufbau einer PrP<sup>Sc</sup>-Fibrille an. Die Aminosäuren M109 (rot), N155 (blau), N170 (grün) und D227 (eisblau) sind farblich markiert. Der N-Terminus mit der ersten N-terminalen Windung der  $\beta$ -Helix ist auf der linken Seite, die letzte C-terminale Windung der  $\beta$ -Helix auf der rechten Seite. Der C-Terminus liegt aufgrund der Orientierung der Helix 3 auf der linken Seite des Moleküls. Die Abbildung wurde mit der Visual Molecular Dynamics (VMD) Software erstellt (Humphrey *et al.*, 1996). ("VMD was developed by the Theoretical and Computational Biophysics Group in the Beckman Institute for Advanced Science and Technology at the University of Illinois at Urbana-Champaign" <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>).

Die Aminosäure 109 liegt außerhalb der globulären Domäne im unstrukturierten N-Terminus und ist daher in dieser PrP<sup>C</sup>-Struktur nicht abgebildet. Die Aminosäure 155 liegt am C-terminalen Ende der Helix 1, Aminosäure 170 in der Schleife zwischen Helix 1 und Helix 2 und Aminosäure 227 liegt am C-terminalen Ende der Helix 3. Wie durch den Vergleich der NMR-Strukturdaten des zellulären Prionproteins von Maus, Hamster und Elch gezeigt wurde, beeinflusst der Aminosäurerest an Position 170 entscheidend die Strukturstabilität der Schleifenregion 166-175 zwischen dem zweitem  $\beta$ -Faltblatt und Helix 2 (Gossert *et al.*, 2005). Wie aus Abbildung 28A,B hervorgeht, sind die Reste der drei Aminosäuren 155, 170 und 227 nicht in der Proteinstruktur verborgen, sondern sind exponiert an der Molekül-Oberfläche. Obwohl sie an unterschiedlichen Regionen der Proteinoberfläche liegen, sind sie für eine mögliche Interaktion mit PrP<sup>Sc</sup> zugänglich, bilden jedoch kein gemeinsames Epitop. Da sich die Sekundärstrukturelemente der globulären Struktur der zellulären Prionproteine verschiedener Säugerarten sehr ähnlich sind (Billeter *et al.*, 1997) liegen auch bei anderen Spezies, wie z.B. bei der Maus (Riek *et al.*, 1996; Riek *et al.*, 1997) und beim Hamster (Donne *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999) die korrespondierenden Aminosäurereste auf der Moleküloberfläche. Das Prionprotein der Rötelmaus weist eine hohe Sequenzidentität zum Prionprotein des Hamsters auf, weshalb davon auszugehen ist, dass auch beim PrP<sup>C</sup> der Rötelmaus die Reste der Aminosäuren 155, 170 und 227 auf der Oberfläche des Proteins liegen und somit potentielle Interaktionsflächen darstellen. Auch in den verfügbaren PrP<sup>Sc</sup>-Modellen befinden sich die korrespondierenden Aminosäurereste zum großen Teil auf der Moleküloberfläche (Abbildung 28C-E). Das Modell von Govaerts *et al.* für den PK-resistenten Teil von Maus-PrP<sup>Sc</sup> (Govaerts *et al.*, 2004) postuliert im Zuge der Umfaltung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> die Ausbildung einer  $\beta$ -Helix und die Anlagerung von drei Monomeren über die  $\beta$ -helicalen Bereiche zu einem PrP<sup>Sc</sup>-Trimer (Abbildung 28C,D). Eine Aufschichtung von solchen trimeren Einheiten bildet eine PrP<sup>Sc</sup>-Fibrille, wobei die  $\beta$ -Helices den Kern der Fibrille darstellen und Helix 2 und 3, welche nicht von der Umfaltung betroffen sind, sowie die Zuckerreste des Prionproteins außerhalb des Kerns liegen. Bei der Maus korrespondieren die Aminosäuren 108, 154, 169 und 226 mit den Aminosäuren 109, 155, 170 und 227 der Rötelmaus. Die Aminosäure 108 ist bei dem Modell von Govaerts *et al.* Bestandteil der ersten  $\beta$ -helicalen Windung und liegt daher auf der N-terminalen Oberfläche der  $\beta$ -Helix, welche innerhalb der Fibrille mit dem darüber liegendem PrP<sup>Sc</sup>

in intermolekulare Wechselwirkung tritt (Abbildung 28D, links). Aminosäure 154 liegt in einer Schleife, welche sich nach der letzten, C-terminalen  $\beta$ -helicalen Windung anschließt und zum N-terminalen Ende der  $\beta$ -Helix hinaufragt und daher wie die Aminosäure 108 in einer möglichen Interaktionsfläche liegt (Abbildung 28D, links). Diese Schleife führt wieder zu dem C-terminalen Ende der  $\beta$ -Helix, wo im Übergang zur Helix 2 die Aminosäure 169 lokalisiert ist und so mit einem darunter liegendem PrP<sup>Sc</sup> in Wechselwirkung tritt (Abbildung 28D, rechts). Aminosäure 226 liegt am C-terminalen Ende der Helix 3, welches nach dem Modell von Govaerts *et al.* in der PrP<sup>Sc</sup>-Fibrille keine relevante Kontaktfläche darstellt.

Auch in einem anderen Modell basierend auf der Prionprotein-Sequenz des Hamsters von Stork *et al.* (Stork *et al.*, 2005) bilden übereinandergeschichtete Trimere von  $\beta$ -helicalen PrP-Molekülen die Fibrillen-Struktur von PrP<sup>Sc</sup> (Abbildung 28E). Aminosäure 227 liegt auch in diesem Modell in der von der Konversion unbeeinträchtigten Helix 3, welche für die Fibrillenbildung keine relevante Kontaktfläche darstellt. Aminosäure 170 liegt in der letzten Windung der  $\beta$ -Helix vor dem Übergang in Helix 2 und ist daher auf einer für die Fibrillenbildung wichtigen Interaktionsfläche lokalisiert (Abbildung 28E, rechts). Aminosäure 155 liegt im Vergleich zum Modell von Govaerts *et al.* (Abbildung 28C, D) aufgrund der unterschiedlichen Windungsstruktur der  $\beta$ -Helix nicht auf der N-terminalen Oberfläche sondern zusammen mit Aminosäure 170 auf der C-terminalen Seite der  $\beta$ -Helix (Abbildung 28E, rechts) und könnte somit ein gemeinsames Epitop bilden. Durch die unterschiedliche Anordnung der Windungen und Schleifen bei dem Model von Stork *et al.* ist die Aminosäure 109 im Gegensatz zum Modell von Govarts *et al.* von der ersten Windung der  $\beta$ -Helix überlagert und so nicht mehr direkt auf der Oberfläche lokalisiert.

Aminosäure 109 liegt im unstrukturierten N-terminalen Teil des zellulären Prionproteins und ist nur bei dem PrP<sup>Sc</sup>-Modell von Govarts *et al.* (Govaerts *et al.*, 2004) direkt auf einer für die Fibrillenbildung wichtigen intermolekularen Kontaktfläche lokalisiert. Durch Veränderung der Rötelmaus-Sequenz an dieser Position in eine Maus-spezifische Aminosäure (M109L) sowie durch den Austausch von Methionin gegen Isoleucin (M109I), welcher den natürlichen Polymorphismus der Rötelmäuse simuliert, reduzierte sich die Konversionseffizienz bei allen untersuchten Erregerstämmen (Abbildung 27). Selbst in der Reaktion mit aus Mäusen isoliertem

PrP<sup>Sc</sup> (ME7) bewirkte die Änderung der Rötelmaus-Sequenz an der Position 109 in eine Maus-spezifische Aminosäure (M109L) keine Verbesserung der Konversionseffizienz (Abbildung 15, 27). Es ist daher möglich, dass dem beobachteten Effekt der Veränderung an der Position 109 (M109I und M109L) ein anderer Mechanismus zugrunde liegt als die Veränderungen an den Positionen 155 und 170.

Wie oben dargestellt hängt der Effekt der Mutationen N155Y und N170S von dem verwendeten Erregerstamm ab. Ein Austausch der Rötelmaus-spezifischen Aminosäuren an diesen Positionen in Aminosäuren der Maus bewirkt eine Abnahme der Konversionseffizienz bei der Reaktion mit PrP<sup>Sc</sup> aus Rötelmäusen und eine Zunahme der Konversionseffizienz bei der Reaktion mit Maus-PrP<sup>Sc</sup> (Abbildung 27). Bezogen auf die Lage in der dreidimensionalen Struktur von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> erscheinen die Aminosäuren 155 und 170 von besonderer Bedeutung, da ihre Reste einerseits bei PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> einen Teil der Moleküloberfläche bilden und bei den in Abbildung 28 dargestellten Modellen von PrP<sup>Sc</sup> auf für die Fibrillenbildung wichtigen Interaktionsflächen lokalisiert sind. Eine Veränderung an den Aminosäuren 155 und 170 ist ausreichend, um den Unterschied zwischen Maus und Rötelmaus bei der Inkubation mit allen untersuchten Erregerstämmen auszugleichen (Abbildung 27).

Die Seitenkette der Aminosäure 227 liegt zwar sowohl bei PrP<sup>C</sup> als auch bei PrP<sup>Sc</sup> auf der Oberfläche des Moleküls, ist aber bei den in Abbildung 28C-D dargestellten PrP<sup>Sc</sup>-Modellen nicht in einer Region lokalisiert, welche von einer intermolekularen Interaktion der Monomere in der PrP<sup>Sc</sup>-Fibrille betroffen ist. Dies korreliert mit den Ergebnissen aus der *in vitro* Konversion, bei denen die Veränderung des Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> an Codon 227 in eine Maus-spezifische Aminosäure (E227D) bei allen untersuchten Erregerstämmen keine Veränderungen der Konversionseffizienz im Vergleich zum Wildtyp-PrP<sup>C</sup> hervorgerufen hat (Abbildung 27).

Alternativ zur Ausbildung einer  $\beta$ -Helix bei der Umfaltung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> wurde von DeMarco und Daggett basierend auf molekulardynamischen Computersimulationen ein PrP<sup>Sc</sup>-Modell mit einem im Vergleich zu PrP<sup>C</sup> erhöhten  $\beta$ -Faltblattanteil ohne helicale Anordnung vorgeschlagen (DeMarco & Daggett, 2004). Auch dieses Modell basiert auf einer trimeren Anordnung der PrP<sup>Sc</sup>-Monomere und passt zu den elektronenmikroskopischen Aufnahmen zweidimensionaler PrP<sup>Sc</sup>-Kristalle. Wie bei den Modellen von Govaerts *et al.* (Govaerts *et al.*, 2004) und Stork *et al.* (Stork *et al.*, 2005) ist Aminosäure 170 auch in diesem Modell in einer für die intermolekulare

Wechselwirkung in der PrP<sup>Sc</sup>-Fibrille wichtigen Interaktionsfläche lokalisiert. Allerdings wird in diesem Modell für den C-Terminus des Prionproteins und damit auch für die Aminosäure 227 eine entscheidende Bedeutung für den Kontakt der PrP<sup>Sc</sup>-Monomere bei der Fibrillenbildung postuliert. Da in den *in vitro* Konversionsreaktionen die Mutation E227D keine Veränderung der Konversionseffizienz hervorgerufen hat (Abbildung 27), ist die Bedeutung des C-Terminus für die PrP<sup>Sc</sup>-Bildung und damit auch das  $\beta$ -Faltblatt-Modell jedoch zweifelhaft. Dass der C-Terminus und damit auch das Codon 227 keine Bedeutung für die PrP<sup>Sc</sup>-Bildung hat wurde auch durch Studien belegt, bei denen die Hemmung der *in vitro* Konversion durch PrP-spezifische Antikörper bzw. PrP-Peptide untersucht wurde (Chabry *et al.*, 1998; Horiuchi & Caughey, 1999; Chabry *et al.*, 1999; Horiuchi *et al.*, 2001).

Aus der Betrachtung der Lage der veränderten Aminosäuren in der räumlichen Struktur von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> wird deutlich, dass die untersuchten Aminosäurepositionen 109, 155, 170 und 227 auf der Oberfläche der Konformationsisomere und damit auf potentiellen Interaktionsflächen liegen. Aus den erzielten *in vitro* Konversionsdaten ist jedoch ersichtlich und dies wird durch die Lage der Aminosäuren in den PrP<sup>Sc</sup>-Modellen unterstützt, dass dabei die Reste der Aminosäuren 109, 155 und 170 im Vergleich zur Aminosäure 227 auf für die PrP<sup>Sc</sup>-Bildung wichtigeren Interaktionsflächen lokalisiert sind (Abbildung 27, 28) (Piening *et al.*, *J. Biol. Chem.*, submitted).

#### **4.2.3. Sequenzidentität und Strukturkompatibilität**

Die Ergebnisse der *in vitro* Konversionsreaktionen (Abbildung 27) haben gezeigt, dass die Sequenzidentität zwischen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> eine wichtige Rolle für die Konversionseffizienz spielt und es darüberhinaus Aminosäurepositionen gibt, in denen eine Sequenzidentität wichtiger ist als an anderen Positionen. Aus Abbildung 27 wird jedoch weiterhin deutlich, dass die Sequenzidentität nicht das ausschließliche Kriterium für die Vorhersage der Konversionseffizienz und damit auch für die Vorhersage der Höhe einer Speziesbarriere darstellt.

So konnten bei den Konversionsreaktionen mit den Erregerstämmen der Rötelmaus bezüglich der Mutation N155Y und 170S bzw. der Doppelmutation N155Y-N170S stammspezifische Effekte auf die Konversionseffizienz beobachtet werden. Bei den

Erregerstämmen cg139A und cgSs3, deren Ursprünge auf Schaf-Scrapie-Erregerstämme zurückzuführen sind, fiel die Reduktion der Konversionseffizienz durch die Doppelmutation stärker aus als die Reduktion durch die Einzelmutationen N155Y bzw. N170S. Bei den BSE-verwandten Erregerstämmen cgBSE und cg301C war die Mutation N155Y ausreichend, um den Unterschied in der Konversionseffizienz von Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> und Maus-PrP<sup>C</sup> auszugleichen (Abbildung 14, 27). Obwohl den Erregerstämmen cg139A, cgSs3, cgBSE und cg301C die gleiche PrP-Primärsequenz, nämlich die der Rötelmaus, zugrunde liegt, da das PrP<sup>Sc</sup> für diese Versuche aus den Gehirnen von Rötelmäusen präpariert wurde, welche mit einem mehrfach in Rötelmäusen passagierten Erregerstamm infiziert wurden, ließen sich anhand der unterschiedlichen Veränderung der Konversionseffizienz durch die Aminosäureaustausche N155Y und N170S die verschiedenen Erregerstämme nach ihrer Herkunft gruppieren. Da die Konversionsreaktionen mit verschiedenen Erregerstämmen durchgeführt wurden und Erregerstämme als Konformationsisomere erachtet werden (Safar *et al.*, 1998), könnte einerseits die Veränderung der Aminosäuresequenz die Umfaltung von PrP<sup>C</sup> in die Protease-resistente Isoform abhängig von der Erregerstamm-spezifischen PrP<sup>Sc</sup>-Konformation unterschiedlich stark beeinträchtigen und so zu unterschiedlichen Konversionseffizienzen führen. Andererseits könnten die verschiedenen Erregerstämme aufgrund ihrer unterschiedlichen Konformationen mit dem eingesetzten PrP<sup>C</sup> unterschiedlich interagieren und so unterschiedliche Konversionseffizienzen hervorrufen.

Beiden denkbaren Mechanismen ist die Schlussfolgerung gemeinsam, dass die Konversionseffizienz bei der Reaktion von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> nicht primär von der Sequenzidentität abhängt, sondern durch die Strukturkompatibilität von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> vermittelt wird. Zwar bedingt die Sequenz auch die Struktur, weshalb eine hohe Konversionseffizienz in Reaktionen beobachtet wird, in denen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> die gleiche Primärsequenz haben. Dass dies aber nicht das einzige Kriterium darstellt, zeigen die unterschiedlichen Konversionseffizienzen bei bezüglich der Primärsequenz gleichen PrP<sup>C</sup>-PrP<sup>Sc</sup>-Kombinationen.

Die Schlussfolgerung, dass die Konversionseffizienz nicht primär von der Sequenzidentität zwischen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> abhängt, sondern durch die Strukturkompatibilität der beiden Isoformen bedingt wird, wird auch dadurch gestützt, dass bei heterologen Konversionsreaktionen in den reziproken Reaktionen sehr unterschiedliche Konversionseffizienzen auftreten können. Aus Abbildung 13 wird



deutlich, dass obwohl die Aminosäuresequenz zwischen Rötelmaus und Hamster sehr ähnlich ist, Hamster-PrP<sup>C</sup> sehr ineffizient durch PrP<sup>Sc</sup> aus Rötelmäusen konvertiert wird. Im Gegensatz dazu wird PrP<sup>C</sup> der Rötelmaus sehr effizient von PrP<sup>Sc</sup> aus Hamster konvertiert (Abbildung 17). Dass bei heterologen Konversionsreaktionen bezogen auf die Aminosäuresequenz die gleiche Kombination der PrP-Moleküle, abhängig davon welche der Sequenzen missgefaltet ist, unterschiedliche Ergebnisse hervorrufen kann, ist auch bei *in vitro* Konversionsexperimenten zur Speziesbarriere zwischen Maus und Hamster beschrieben worden (Kocisko *et al.*, 1994; Kocisko *et al.*, 1995). Hamster-PrP<sup>C</sup> lässt sich zu einem gewissen Grad durch Maus-PrP<sup>Sc</sup> (RML) konvertieren, wohingegen Maus-PrP<sup>C</sup> sich weitgehend resistent gegenüber einer Konversion durch Hamster-PrP<sup>Sc</sup> (263K) erweist. Wie aus Abbildung 15 und 17 deutlich wird, lässt sich jedoch Hamster-PrP<sup>C</sup> durch ME7 ähnlich ineffizient konvertieren wie Maus-PrP<sup>C</sup> mit 263K aus Hamstern. Hinzu kommt, dass die Einführung einer Hamster-spezifischen Aminosäure an Position 138 (I138/139M) die Konversion von Maus-PrP<sup>C</sup> in mit Maus-PrP<sup>Sc</sup> infizierten Neuroblastomazellen unterbinden kann (Priola & Chesebro, 1995). Bei der *in vitro* Konversion von Maus-PrP<sup>C</sup> durch Hamster-PrP<sup>Sc</sup> zeigte sich jedoch die Identität an Position 154/155 und nicht an Position 138/139 als entscheidend für die Konversionseffizienz (Priola *et al.*, 2001). Da die *in vitro* Konversionsdaten mit gereinigtem PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> erzielt wurden, ist ein möglicher Einfluss von zusätzlichen zellulären Faktoren, wie dem „Protein X“ (Telling *et al.*, 1995), als Ursache für die unterschiedlichen Konversionseffizienzen bei reziproken Reaktionen als unwahrscheinlich anzusehen.

Die Auswertung der Konversionsdaten im Hinblick auf unterschiedliche Erregerstämme macht deutlich, dass die Konversionseffizienz und damit auch die Höhe der Speziesbarriere nicht primär durch die Sequenzidentität determiniert ist, sondern durch die Strukturkompatibilität von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> bestimmt wird (Piening *et al.*, *J. Biol. Chem.*, submitted). Die Existenz von Erregerstämmen liegt in den unterschiedlichen Strukturen begründet, die von der pathogenen Isoform des Prionproteins angenommen werden können. Dadurch kommt es zu unterschiedlichen Wechselwirkungen mit PrP<sup>C</sup> bei der PrP<sup>Sc</sup>-Bildung, woraus die charakteristischen Eigenschaften und Speziesbarrieren der Erregerstämme resultieren.

#### 4.2.4. Primärsequenz-unabhängige Faktoren

Obwohl durch *in vitro* Konversionsexperimente mit gereinigtem PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> *in vivo* beobachtete Speziesbarrieren nachvollzogen wurden und so die Rolle der Primärsequenz für die Speziesbarriere dargestellt werden konnte (Kocisko *et al.*, 1995; Priola *et al.*, 2001), ist aus Infektionsstudien mit unterschiedlichen Maus-Linien, welche über dasselbe Prionprotein verfügen, bekannt, dass neben PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> zusätzliche Faktoren des Wirts die Speziesbarriere modulieren (Lloyd *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2003).

Transmissionsstudien an Rötelmäusen haben gezeigt, dass sich Rötelmäuse im Vergleich zu Hausmäusen sehr leicht durch Scrapie infizieren lassen, sich aber resistent gegenüber einer Infektion mit BSE erweisen (Cartoni *et al.*, 2005) (Agrimi, unveröffentlicht). Dies sollte sich durch *in vitro* Konversionsexperimente mit gereinigtem PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> nachvollziehen lassen, wenn der beobachtete Unterschied zwischen Rötelmaus und Maus auf die verschiedenen Primärsequenzen des Prionproteins zurückzuführen ist. Wie aus Abbildung 27 erkennbar, ist die Konversionseffizienz von Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> bei der Inkubation mit BSE niedriger als die Konversionseffizienz von Maus-PrP<sup>C</sup>. Dieses Ergebnis korreliert mit den Daten der Transmissionsstudien. Eine Veränderung der Sequenz des Prionproteins der Rötelmaus an den für die PrPres-Bildung wichtigen Positionen 155 und 170 in Maus-spezifische Aminosäuren (N155Y-N170S) nivelliert den Unterschied in der Konversionseffizienz von Rötelmaus- und Maus-PrP<sup>C</sup>.

Auch bei den Konversionsreaktionen mit Scrapie konnte beim PrP<sup>C</sup> der Rötelmaus im Vergleich zum PrP<sup>C</sup> der Maus eine geringere Konversionseffizienz festgestellt werden. Dies widerspricht den Ergebnissen der Transmissionstudien, da sich die Rötelmaus im Vergleich zur Maus gegenüber einer Infektion mit Schaf-Scrapie als sehr empfindlich erwiesen hat. Die Einführung von Aminosäuren der Maus an den Positionen 155 und 170 des Rötelmaus-PrP<sup>C</sup> bewirkte eine Erhöhung der Konversionseffizienz auf das Niveau von Maus-PrP<sup>C</sup>. Diese Tendenz konnte sowohl für den aus einem italienischen Scrapie-Fall isolierten Erregerstamm (Scrap Italy) als auch für einen aus Großbritannien stammenden Scrapie-Erreger (Scrap UK) beobachtet werden. Daher ist bezüglich Schaf-Scrapie eine Diskrepanz zwischen den Daten *in vivo* und *in vitro* zu verzeichnen.

Auch das PrP<sup>C</sup> des Hamsters, welches im Hinblick auf die Aminosäuresequenz dem PrP<sup>C</sup> der Rötelmaus sehr ähnlich ist (Abbildung 1), lässt sich *in vitro* durch Schaf-

Scrapie und BSE schlechter konvertieren als Maus-PrP<sup>C</sup> (Abbildung 18, 19) (Raymond *et al.*, 1997). *In vivo* lassen sich Hamster zwar auch nicht mit BSE infizieren, zeigen allerdings bei der primären Infektion mit Schaf-Scrapie im Vergleich zur Rötelmaus eine sehr lange Inkubationszeit (Kimberlin & Walker, 1978; Kimberlin *et al.*, 1987; Kimberlin *et al.*, 1989; Priola, 1999). Entsprechend müsste unter der Annahme, dass Unterschiede in der Primärsequenz für die Empfindlichkeit der Rötelmaus gegenüber Schaf-Scrapie verantwortlich sind, mindestens eine Aminosäureposition im Prionprotein der Rötelmaus vorliegen, welche sich sowohl von der Maus als auch vom Hamster unterscheidet. Dies ist innerhalb des reifen Prionproteins nur für die Position 227 der Fall (Abbildung 1), welche jedoch für die PrPres-Bildung unbedeutend ist (Abbildung 27).

Die Unterschiede zwischen Maus und Rötelmaus in der Empfindlichkeit gegenüber TSE-Erregern können daher nicht ausschließlich in den verschiedenen Primärsequenzen des Prionproteins begründet sein. Es ist anzunehmen, dass zusätzliche Wirtsfaktoren, die in dem verwendeten Konversionsverfahren keinen Einfluss haben, da aufgereinigtes PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> verwendet wird, *in vivo* für die Speziesbarriere eine wichtige Rolle spielen. Als möglicher Kofaktor ist das bisher nicht identifizierte „Protein X“ postuliert worden (Telling *et al.*, 1995). Es wird spekuliert, dass „Protein X“ durch eine Interaktion mit dem Prionprotein an den auf die Sequenz der Rötelmaus bezogenen Aminosäuren 168, 172, 215 und 219 die PrP<sup>Sc</sup>-Bildung moduliert (Kaneko *et al.*, 1997). Aus Abbildung 1 ist ersichtlich dass sich die Primärsequenz des Prionproteins der untersuchten Spezies bezüglich des postulierten Bindungsepitops nur am Codon 215 unterscheiden. Die Sequenzen von Maus und Rötelmaus stimmen jedoch auch an dieser Aminosäureposition miteinander überein. Die beiden Spezies besitzen dasselbe „Protein X“-Bindungsepitop. Es ist daher zu vermuten, dass sich die Interaktion und die Bindungsaffinität von „Protein X“ der Maus und Rötelmaus mit dem jeweiligen PrP<sup>C</sup> nicht unterscheiden und die Unterschiede in den *in vivo* und *in vitro* Daten nicht auf den Einfluss des „Protein X“ zurückzuführen sind. Aus Ergebnissen von Infektionsstudien mit transgenen Mäusen, welche Prionproteine mit einer chimären Sequenz von Maus und Rind exprimieren (Scott *et al.*, 2005), geht außerdem hervor, dass transgene Mäuse, welche Rind-PrP<sup>C</sup> mit dem „Protein X“-Bindungsepitop der Maus exprimieren, schlechter mit BSE, vCJD und Scrapie infizierbar sind als transgene Mäuse, welche die gleiche Sequenz mit dem „Protein X“-Bindungsepitop des Rindes exprimieren. Die

Bedeutung des „Protein X“ für die Speziesbarriere ist aufgrund dieser Daten generell in Frage zu stellen.

Zur Identifizierung und Charakterisierung der Faktoren, welche neben der Primärsequenz die Speziesbarriere beeinflussen, bedarf es entsprechend weiterführender Studien. Eine Reihe von Faktoren sind beschrieben worden, die mit dem Prionprotein interagieren und so einen Einfluss auf die Konversion haben können (Gauczynski *et al.*, 2001a). Die Effizienz der Ausbreitung des TSE-Erregers im Organismus und damit auch die Speziesbarriere hängen jedoch nicht ausschließlich von der Konversion des zellulären Prionproteins in seine pathogene Isoform ab, sondern werden auch durch andere Faktoren bestimmt, die zur Ausbreitung der Prionen im Organismus beitragen. So nehmen neben der Ausbreitung des Erregers im Nervensystem auch Zellen des Immunsystems eine bedeutende Stellung in der komplexen Pathogenese der Prionkrankheiten ein (Aguzzi & Heikenwalder, 2005).

In Anbetracht der im vorherigen Kapitel diskutierten unterschiedlichen Konversionseffizienzen bei bezüglich der Primärsequenz gleicher PrP<sup>C</sup> / PrP<sup>Sc</sup>-Kombination erweist sich der Begriff der „Speziesbarriere“ als unzutreffend. Vielmehr handelt sich um eine „Strukturkompatibilitäts-abhängige Transmissions-Barriere“ oder eine „Erregerstamm-Barriere“. Da die Transmissions-Barriere von Primärsequenz-unabhängigen Faktoren beeinflusst ist, wird deutlich, dass die Effizienz der Übertragung von Prionkrankheiten durch das Zusammenwirken der Primärsequenz, der Kompatibilität der Strukturen von PrP<sup>Sc</sup> und PrP<sup>C</sup> sowie zusätzlicher Kofaktoren bestimmt wird (Piening *et al.*, *J. Biol. Chem.*, submitted).

#### **4.3. Stabilisierung von PrP-Aggregaten zur Strukturanalyse**

Wie oben dargestellt lässt sich die Konversionseffizienz einer spezifischen PrP<sup>Sc</sup> / PrP<sup>C</sup>-Kombination und damit auch die Speziesbarriere zwischen zwei Organismen nur bedingt anhand der Primärsequenz vorhersagen. Nicht die Identität der Aminosäureabfolge zwischen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>, sondern die strukturelle Kompatibilität der beiden Konformationsisomere und die darauf basierende initiale Interaktion scheint für die PrP<sup>Sc</sup>-Bildung von primärer Bedeutung. Daher sind Informationen zur dreidimensionalen Struktur von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> von besonderem Interesse.

Da sich das zelluläre Prionprotein in rekombinanter Form löslich in hohen Konzentrationen erzeugen lässt, konnte die Struktur der globulären Domäne des PrP<sup>C</sup>

von unterschiedlichen Säugerspezies durch NMR-Analysen aufgeklärt werden (Billeter *et al.*, 1997). Die missgefaltete Form des Prionproteins hingegen bildet in seiner infektiösen Form unlösliche Aggregate, die sich durch klassische Strukturanalyseverfahren nicht untersuchen lassen. Die zur Struktur von PrP<sup>Sc</sup> verfügbaren Modelle unterscheiden sich im Hinblick auf die Detailstruktur der Monomere sowie ihrer Anordnung in den PrP-Aggregaten zum Teil erheblich (Govaerts *et al.*, 2004; DeMarco & Daggett, 2004; Stork *et al.*, 2005). Daher wurde der Versuch unternommen, einerseits instabile Aggregationskeime und andererseits PrP<sup>Sc</sup> in seiner infektiösen Form zu stabilisieren, um sowohl Aggregationkeime als auch PrP<sup>Sc</sup> weiteren biophysikalischen Analysen zugänglich zu machen und Informationen zur Struktur zu erhalten. Zur Stabilisierung der PrP-Aggregate wurde eine Vernetzungsmethode verwendet, deren Prinzip auf der licht-induzierten Radikalisierung von Tyrosin-Seitenketten und die dadurch hervorgerufene Reaktion der Tyrosin-Radikale mit benachbarten Tyrosinen oder nukleophilen Seitenketten unter Ausbildung einer neuen kovalenten Verbindung beruht (Fancy & Kodadek, 1999). Durch die direkte Vernetzung benachbarter Aminosäureseitenketten ohne die Verwendung eines zusätzlichen chemischen Verbindungsmoleküls bedarf es bei dieser Methode keiner chemischen Modifikation der Proteine, wodurch die natürliche Proteinstruktur erhalten bleibt.

Nach dem "seeded polymerisation"-Modell (Abbildung 26) ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der PrPres-Bildung die Formation eines Aggregationskeimes, welcher bei der Überschreitung einer gewissen Größe stabilisiert und so die weitere Anlagerung und Umformung von PrP<sup>C</sup> beschleunigt wird (Jarrett & Lansbury, Jr., 1993). Dieser Prozess kann mit rekombinantem Prionprotein durch Verdünnung der Detergenz-Konzentration modelliert (Post *et al.*, 1998) und auf molekularer Ebene durch den Einsatz verschiedenfarbig-markierter rPrP-Moleküle mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (FCS) verfolgt werden (Giese *et al.*, 2004; Levin *et al.*, 2005). Der initiale, geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Proteinoligomerisierung in diesem Aggregationsverfahren konnte überwunden werden, wenn vorgeformte Oligomere als "seeds" hinzugefügt wurden (Abbildung 20). Mit Hilfe der foto-induzierten Vernetzungsmethode wurden diese vorgeformten Oligomere durch intermolekulare Vernetzung stabilisiert. Der Grad der Vernetzung war durch die Variation der Belichtungsintensität einstellbar und konnte durch den Einsatz der FCS-Technologie überprüft werden (Abbildung 21). Dass die natürliche Aggregatstruktur von der direkten Vernetzung der Aggregate über Aminosäurereste an interagierenden

Proteinoberflächen nicht beeinträchtigt wurde, zeigte sich durch die unveränderte Fähigkeit von stabilisierten Oligomeren, die Aggregation von monomerem rPrP zu induzieren (Abbildung 22) (Piening *et al.*, *Amyloid*, in revision).

Auch PrP<sup>Sc</sup>-Aggregate ließen sich foto-chemisch vernetzen. Dies gelang sowohl in Präparationen von aufgereinigtem PrP<sup>Sc</sup> als auch im Hirnhomogenat (Abbildung 23, 24), welches neben dem Prionprotein noch zahlreiche andere Proteinen und Makromoleküle enthält. Dabei hatte die Vernetzung wie bei der „Seeding“-Kapazität der stabilisierten rPrP-Oligomere keinen Einfluss auf die Infektiösität der stabilisierten Prionen, was verdeutlicht, dass die Vernetzung der Aggregate die für die Prion-Vermehrung wichtigen Interaktionsflächen nicht beeinträchtigt (Piening *et al.*, *Amyloid*, in revision).

Die Tatsache, dass PrP-Aggregate stabilisiert werden können, ohne ihre natürliche Struktur und ihre biophysikalischen Eigenschaften zu verändern, eröffnet die Möglichkeit für indirekte strukturelle Analysen. Beispielsweise ist bei einem proteolytischen Verdau von kovalent verknüpften PrP-Aggregaten mit einer Protease, welche die Proteine an definierten Stellen schneidet, aufgrund der intermolekularen Vernetzung im Vergleich zu unvernetzten Aggregaten ein verändertes Peptidmuster zu erwarten. Durch eine geeignete Analyse der Peptidmuster, z.B. durch eine massenspektrometrische Analyse, können so indirekt die Interaktionsflächen kartiert werden. Daher wurden rPrP-Aggregate kovalent vernetzt und einem Verdau mit Trypsin unterzogen. Die durch den tryptischen Verdau gewonnenen Peptide wurden anschließend einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. Obwohl für das Prionprotein spezifische Massensignale detektiert werden konnten, war die Identifizierung von durch die Vernetzung neu entstandenen Peptid-Massen nicht eindeutig möglich (Abbildung 25). Dies kann einerseits technische Ursachen haben, da die Möglichkeit besteht, dass durch die Ionisation der Massenspektrometrie Elektronen frei werden, die zu einer Reduktion und damit zu einem Zerfall der neuen kovalenten Verbindungen beitragen. Andererseits ist es aber auch möglich, dass die als Modell für PrP<sup>Sc</sup> analysierten rPrP-Aggregate eine zu geringe Ordnung aufweisen und daher über keine eindeutigen Interaktionsflächen verfügen. Die Vernetzung erfolgt in diesem Fall über variierende Interaktionsflächen, wodurch es zu keinen einheitlichen Massensignalen in der Analyse der tryptischen Verdaue von vernetzten Aggregaten kommen kann.

Durch eine massenspektrometrische Analyse tryptischer Peptide von kovalent vernetztem PrP<sup>Sc</sup> in seiner infektiösen Form, welches wahrscheinlich eine höhere strukturelle Ordnung aufweist als die modellhaft untersuchten rPrP-Aggregate, lassen sich unter Umständen differentielle Peptidmuster analysieren und so über die intermolekularen Kontaktflächen die molekulare Architektur von Prionen charakterisieren.

Insgesamt konnte somit im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch *in vitro* Konversionsreaktionen die autokatalytische Vermehrung von infektiösen Prionen demonstriert und so ein Beleg für die Prion-Hypothese erbracht werden. Weiterhin wurde dargestellt, dass für die Speziesbarriere die Strukturkompatibilität von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> und nicht die Sequenzidentität entscheidend ist. Der Begriff der „Speziesbarriere“ ist daher unzutreffend. Vielmehr handelt es sich um eine „Strukturkompatibilitäts-abhängige Transmissions-Barriere“ bzw. „Erregerstamm-Barriere“, welche durch zusätzliche Kofaktoren modelliert wird. Verschiedene Erregerstämme bilden durch Unterschiede in der PrP<sup>Sc</sup>-Struktur ihre charakteristischen Eigenschaften aus. Um zu einem fundierten Verständnis der Erregerstämme und der Transmissions-Barriere zu gelangen, ist daher die Aufklärung der PrP<sup>Sc</sup>-Struktur erforderlich. Da dies mit klassischen Methoden bisher nicht gelungen ist, wurde eine Methode zur kovalenten Vernetzung von PrP-Aggregaten etabliert, die es ermöglicht, Interaktionsflächen in PrP<sup>Sc</sup> zu analysieren und so relevante Strukturinformationen zu gewinnen.

## 5. Zusammenfassung

Ein zentrales Ereignis in der Pathogenese der Prionkrankheiten ist die strukturelle Konversion des zellulären Prionproteins ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) in eine infektiöse Isoform ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die von der Prion-Hypothese angenommene Eigenschaft von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  zur autokatalytischen Vermehrung durch serielle PMCA-Reaktionen experimentell belegt und die Vermehrung von Infektiösität *in vitro* dargestellt. Die Fragmentierung der PrP-Aggregate in kleinere Aggregationskeime hat sich dabei für eine effiziente autokatalytische Prion-Replikation als essentiell erwiesen. Diese Ergebnisse sprechen für die Richtigkeit des „seeded polymerisation“-Modells der  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Bildung und liefern einen experimentellen Beleg für die Prion-Hypothese.

Die Übertragbarkeit von Prionkrankheiten auf andere Spezies wird durch den Grad der Primärsequenz-Identität von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  entscheidend beeinflusst, wobei die Existenz von Erregerstämmen mit gleicher Primärsequenz und unterschiedlichen Übertragbarkeiten eine Herausforderung für die Prion-Hypothese darstellt. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Konversionsstudien mit chimären Prionproteinen konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in den Aminosäuren 155 und 170 die Speziesbarriere zwischen Maus und Rötelmaus wesentlich beeinflussen, wobei die durch Punktmutationen hervorgerufene Veränderung der Konversionseffizienz vom Erregerstamm abhängig ist. Die *in vivo* beobachtete hohe Empfindlichkeit der Rötelmaus gegenüber Scrapie konnte nicht auf die Primärsequenz zurückgeführt und muss daher von zusätzlichen Wirtsfaktoren bestimmt werden. Die Relevanz des bisher nicht identifizierten „Protein X“ als entscheidender Kofaktor ist aufgrund der Sequenzidentität des postulierten „Protein X“-Bindungssepitop bei Maus und Rötelmaus in Frage zu stellen. Die Speziesbarriere ist daher als Transmissionsbarriere zu verstehen, welche von der Primärsequenz der beiden Isoformen des Prionproteins, der Strukturkompatibilität von  $\text{PrP}^{\text{C}}$  und  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  und von zusätzlichen Wirtsfaktoren beeinflusst wird. Um die Höhe einer Transmissionsbarriere vorausszusagen, ist daher neben der Identifizierung der zusätzlichen Wirtsfaktoren die Aufklärung der  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Struktur erforderlich. Da dies aufgrund der biophysikalischen Eigenschaften von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  mit klassischen Verfahren nicht möglich ist, wurde eine Methode zur kovalenten Vernetzung von PrP-Aggregaten etabliert, die es ermöglicht Interaktionsflächen in  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  zu analysieren und so relevante Strukturinformationen zu gewinnen.



## 6. Literaturverzeichnis

Aguzzi, A. und Heikenwalder, M. (2005). Prions, cytokines, and chemokines: a meeting in lymphoid organs. *Immunity* 22, 145-154.

Alper, T. (1985). Scrapie agent unlike viruses in size and susceptibility to inactivation by ionizing or ultraviolet radiation. *Nature* 317, 750.

Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A. und Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214, 764-766.

Alper, T., Haig, D. A. und Clarke, M. C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22, 278-284.

Anderson, R. M., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E., Watt, C. J., Udy, H. J., MaWhinney, S., Dunstan, S. P., Southwood, T. R., Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., Hoinville, L. J., Hillerton, J. E., Austin, A. R. und Wells, G. A. (1996). Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382, 779-788.

Arnold, J. E., Tipler, C., Laszlo, L., Hope, J., Landon, M. und Mayer, R. J. (1995). The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J. Pathol.* 176, 403-411.

Aronoff-Spencer, E., Burns, C. S., Avdievich, N. I., Gerfen, G. J., Peisach, J., Antholine, W. E., Ball, H. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. und Millhauser, G. L. (2000). Identification of the Cu<sup>2+</sup> binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. *Biochemistry* 39, 13760-13771.

Baker, H. F., Ridley, R. M. und Wells, G. A. (1993). Experimental transmission of BSE and scrapie to the common marmoset. *Vet. Rec.* 132, 403-406.

Barry, R. A., Kent, S. B., McKinley, M. P., Meyer, R. K., DeArmond, S. J., Hood, L. E. und Prusiner, S. B. (1986). Scrapie and cellular prion proteins share polypeptide epitopes. *J. Infect. Dis.* 153, 848-854.

Bartz, J. C., McKenzie, D. I., Bessen, R. A., Marsh, R. F. und Aiken, J. M. (1994). Transmissible mink encephalopathy species barrier effect between ferret and mink: PrP gene and protein analysis. *J. Gen. Virol.* 75, 2947-2953.

Baskakov, I. V., Legname, G., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B. und Cohen, F. E. (2002). Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J. Biol. Chem.* 277, 21140-21148.

Baskakov, I. V., Legname, G., Gryczynski, Z. und Prusiner, S. B. (2004). The peculiar nature of unfolding of the human prion protein. *Protein Sci.* 13, 586-595.

Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B. und Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417-28.

- Bendheim, P. E., Barry, R. A., DeArmond, S. J., Stites, D. P. und Prusiner, S. B. (1984). Antibodies to a scrapie prion protein. *Nature* 310, 418-421.
- Bendheim, P. E., Brown, H. R., Rudelli, R. D., Scala, L. J., Goller, N. L., Wen, G. Y., Kascsak, R. J., Cashman, N. R. und Bolton, D. C. (1992). Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. *Neurology* 42, 149-156.
- Bertsch, U., Winklhofer, K. F., Hirschberger, T., Bieschke, J., Weber, P., Hartl, F. U., Tavan, P., Tatzelt, J., Kretzschmar, H. A. und Giese, A. (2005). Systematic identification of antiprion drugs by high-throughput screening based on scanning for intensely fluorescent targets. *J. Virol.* 79, 7785-7791.
- Bessen, R. A., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., Nandan, S., Lansbury, P. T. und Caughey, B. (1995). Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 375, 698-700.
- Bessen, R. A. und Marsh, R. F. (1992a). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J. Virol.* 66, 2096-2101.
- Bessen, R. A. und Marsh, R. F. (1992b). Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters. *J. Gen. Virol.* 73, 329-334.
- Bessen, R. A. und Marsh, R. F. (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.* 68, 7859-7868.
- Bessen, R. A., Raymond, G. J. und Caughey, B. (1997). In situ formation of protease-resistant prion protein in transmissible spongiform encephalopathy-infected brain slices. *J. Biol. Chem.* 272, 15227-15231.
- Bieschke, J., Weber, P., Sarafoff, N., Beekes, M., Giese, A. und Kretzschmar, H. (2004). Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 12207-12211.
- Billeter, M., Riek, R., Wider, G., Hornemann, S., Glockshuber, R. und Wuthrich, K. (1997). Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 7281-7285.
- Bocharova, O. V., Breydo, L., Parfenov, A. S., Salnikov, V. V. und Baskakov, I. V. (2005). In vitro Conversion of Full-length Mammalian Prion Protein Produces Amyloid Form with Physical Properties of PrP<sup>Sc</sup>. *J. Mol. Biol.* 346, 645-659.
- Bolton, D. C., McKinley, M. P. und Prusiner, S. B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218, 1309-1311.
- Bolton, D. C., Meyer, R. K. und Prusiner, S. B. (1985). Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J. Virol.* 53, 596-606.
- Borchelt, D. R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N. und Prusiner, S. B. (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell Biol.* 110, 743-752.

- Borchelt, D. R., Taraboulos, A. und Prusiner, S. B. (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 267, 16188-16199.
- Bosque, P. J., Ryou, C., Telling, G., Peretz, D., Legname, G., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (2002). Prions in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3812-3817.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Bradley, R. und Wilesmith, J. W. (1993). Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Br. Med. Bull.* 49, 932-959.
- Brotherston, J. G., Renwick, C. C., Stamp, J. T., Zlotnik, I. und Pattison, I. H. (1968). Spread and scrapie by contact to goats and sheep. *J. Comp. Pathol.* 78, 9-17.
- Brown, D. R. und Besinger, A. (1998). Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem. J.* 334, 423-429.
- Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D. und Kretschmar, H. (1997a). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390, 684-687.
- Brown, D. R., Schulz-Schaeffer, W. J., Schmidt, B. und Kretschmar, H. A. (1997b). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.* 146, 104-112.
- Brown, R. E., Jarvis, K. L. und Hyland, K. J. (1989). Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal. Biochem.* 180, 136-139.
- Bruce, M. E., Chree, A., McConnell, I., Foster, J., Pearson, G. und Fraser, H. (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 343, 405-411.
- Bruce, M. E. und Dickinson, A. G. (1987). Biological evidence that scrapie agent has an independent genome. *J. Gen. Virol.* 68, 79-89.
- Bruce, M. E. und Fraser, H. (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 172, 125-138.
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. und Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389, 498-501.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. und Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582.

- Burger, D. und Hartsough, G. R. (1965). Encephalopathy of mink. II. Experimental and natural transmission. *J. Infect. Dis.* 115, 393-399.
- Burns, C. S., Aronoff-Spencer, E., Dunham, C. M., Lario, P., Avdievich, N. I., Antholine, W. E., Olmstead, M. M., Vrielink, A., Gerfen, G. J., Peisach, J., Scott, W. G. und Millhauser, G. L. (2002). Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein. *Biochemistry* 41, 3991-4001.
- Burns, C. S., Aronoff-Spencer, E., Legname, G., Prusiner, S. B., Antholine, W. E., Gerfen, G. J., Peisach, J. und Millhauser, G. L. (2003). Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein. *Biochemistry* 42, 6794-6803.
- Calzolari, L., Lysek, D. A., Guntert, P., von Schroetter, C., Riek, R., Zahn, R. und Wuthrich, K. (2000). NMR structures of three single-residue variants of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8340-5.
- Calzolari, L., Lysek, D. A., Perez, D. R., Guntert, P. und Wuthrich, K. (2005). Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 651-655.
- Calzolari, L. und Zahn, R. (2003). Influence of pH on NMR structure and stability of the human prion protein globular domain. *J. Biol. Chem.* 278, 35592-35596.
- Capellari, S., Vital, C., Parchi, P., Petersen, R. B., Ferrer, X., Jarnier, D., Pegoraro, E., Gambetti, P. und Julien, J. (1997). Familial prion disease with a novel 144-bp insertion in the prion protein gene in a Basque family. *Neurology* 49, 133-141.
- Carp, R. I., Callahan, S. M., Sersen, E. A. und Moretz, R. C. (1984). Preclinical changes in weight of scrapie-infected mice as a function of scrapie agent-mouse strain combination. *Intervirology* 21, 61-69.
- Cartoni, C., Schinina, M. E., Maras, B., Nonno, R., Vaccari, G., Di Baria, M. A., Conte, M., Liu, Q. G., Lu, M., Cardone, F., Windl, O., Pocchiari, M. und Agrimi, U. (2005). Identification of the pathological prion protein allotypes in scrapie-infected heterozygous bank voles (*Clethrionomys glareolus*) by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1081, 122-126.
- Cashman, N. R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R. J., Bolton, D. C. und Bendheim, P. E. (1990). Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell* 61, 185-192.
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C. und Soto, C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121, 195-206.
- Caughey, B., Brown, K., Raymond, G. J., Katzenstein, G. E. und Thresher, W. (1994). Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red. *J. Virol.* 68, 2135-2141.
- Caughey, B., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F. und Caughey, W. S. (1991). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30, 7672-7680.

- Caughey, B., Horiuchi, M., Demaimay, R. und Raymond, G. J. (1999a). Assays of protease-resistant prion protein and its formation. *Methods Enzymol.* 309, 122-133.
- Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J. und Chesebro, B. (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J. Virol.* 63, 175-181.
- Caughey, B., Race, R. E., Vogel, M., Buchmeier, M. J. und Chesebro, B. (1988). In vitro expression in eukaryotic cells of a prion protein gene cloned from scrapie-infected mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4657-4661.
- Caughey, B. und Raymond, G. J. (1991). The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* 266, 18217-18223.
- Caughey, B., Raymond, G. J., Priola, S. A., Kocisko, D. A., Race, R. E., Bessen, R. A., Lansbury, P. T., Jr. und Chesebro, B. (1999b). Methods for studying prion protein (PrP) metabolism and the formation of protease-resistant PrP in cell culture and cell-free systems. An update. *Mol. Biotechnol.* 13, 45-55.
- Chabry, J., Caughey, B. und Chesebro, B. (1998). Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* 273, 13203-13207.
- Chabry, J., Priola, S. A., Wehrly, K., Nishio, J., Hope, J. und Chesebro, B. (1999). Species-independent inhibition of abnormal prion protein (PrP) formation by a peptide containing a conserved PrP sequence. *J. Virol.* 73, 6245-6250.
- Chandler, R. L. (1971). Experimental transmission of scrapie to voles and Chinese hamsters. *Lancet* 1, 232-233.
- Chandler, R. L. und Turfrey, B. A. (1972). Inoculation of voles, Chinese hamsters, gerbils and guinea-pigs with scrapie brain material. *Res. Vet. Sci.* 13, 219-224.
- Chen, S. G., Teplow, D. B., Parchi, P., Teller, J. K., Gambetti, P. und Autilio-Gambetti, L. (1995). Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J. Biol. Chem.* 270, 19173-19180.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J. M., Garon, C. und Haase, A. (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315, 331-333.
- Colling, S. B., Collinge, J. und Jefferys, J. G. (1996). Hippocampal slices from prion protein null mice: disrupted Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> currents. *Neurosci. Lett.* 209, 49-52.
- Collinge, J., Palmer, M. S., Sidle, K. C., Hill, A. F., Gowland, I., Meads, J., Asante, E., Bradley, R., Doey, L. J. und Lantos, P. L. (1995). Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature* 378, 779-783.

Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J. und Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383, 685-690.

Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R. und Jefferys, J. G. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370, 295-297.

Come, J. H., Fraser, P. E. und Lansbury, P. T., Jr. (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 5959-5963.

Creutzfeldt, H. G. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* 57, 1-18.

Cuillé, J. und Chelle, P. L. (1936). La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *C. R. Acad. Sci. Paris* 203, 1552-1554.

Dawson, M., Wells, G. A., Parker, B. N. und Scott, A. C. (1991). Transmission studies of BSE in cattle, hamsters, pigs and domestic fowl. In: Bradley R., Savey M. und Marchant B. (Edit.). *Sub-acute Spongiforme Encephalopathies*. Amsterdam: Kluwer Academic, S. 25-32.

DeArmond, S. J., Yang, S. L., Lee, A., Bowler, R., Taraboulos, A., Groth, D. und Prusiner, S. B. (1993). Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6449-6453.

DeMarco, M. L. und Daggett, V. (2004). From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 2293-2298.

Dickinson, A. G. und Meikle, V. M. (1971). Host-genotype and agent effects in scrapie incubation: change in allelic interaction with different strains of agent. *Mol. Gen. Genet.* 112, 73-79.

Dickinson, A. G., Stamp, J. T. und Renwick, C. C. (1974). Maternal and lateral transmission of scrapie in sheep. *J. Comp. Pathol.* 84, 19-25.

Diringer, H., Beekes, M. und Oberdieck, U. (1994). The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 724, 246-258.

Diringer, H., Braig, H. R. und Czub, M. (1988). Scrapie: a virus-induced amyloidosis of the brain. *Ciba Found. Symp.* 135, 135-145.

Diringer, H., Gelderblom, H., Hilmert, H., Ozel, M., Edelbluth, C. und Kimberlin, R. H. (1983). Scrapie infectivity, fibrils and low molecular weight protein. *Nature* 306, 476-478.

Dodelet, V. C. und Cashman, N. R. (1998). Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* 91, 1556-1561.

Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E. und Dyson, H. J. (1997). Structure of the recombinant full-length

hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13452-13457.

Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16, 6127-6145.

Eigen, M. (1996). Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys. Chem.* 63, 1-18.

Eigen, M. und Rigler, R. (1994). Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 5740-5747.

Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B. und Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* 28, 8380-8388.

Fancy, D. A. und Kodadek, T. (1999). Chemistry for the analysis of protein-protein interactions: rapid and efficient cross-linking triggered by long wavelength light. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6020-6024.

Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A. und Weissmann, C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* 15, 1255-1264.

Foster, J. D., Hope, J. und Fraser, H. (1993). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet. Rec.* 133, 339-341.

Gabizon, R., McKinley, M. P., Groth, D. und Prusiner, S. B. (1988). Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6617-6621.

Gabizon, R., Meiner, Z., Halimi, M. und Ben Sasson, S. A. (1993). Heparin-like molecules bind differentially to prion-proteins and change their intracellular metabolic fate. *J. Cell Physiol.* 157, 319-325.

Gabriel, J. M., Oesch, B., Kretzschmar, H., Scott, M. und Prusiner, S. B. (1992). Molecular cloning of a candidate chicken prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9097-9101.

Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J., Jr. und Alpers, M. (1967). Transmission and passage of experimental "kuru" to chimpanzees. *Science* 155, 212-214.

Gasset, M., Baldwin, M. A., Fletterick, R. J. und Prusiner, S. B. (1993). Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1-5.

Gauczynski, S., Hundt, C., Leucht, C. und Weiss, S. (2001a). Interaction of prion proteins with cell surface receptors, molecular chaperones, and other molecules. *Adv. Protein Chem.* 57, 229-272.

- Gauczynski, S., Peyrin, J. M., Haik, S., Leucht, C., Hundt, C., Rieger, R., Krasemann, S., Deslys, J. P., Dormont, D., Lasmezas, C. I. und Weiss, S. (2001b). The 37-kDa/67-kDa laminin receptor acts as the cell-surface receptor for the cellular prion protein. *EMBO J.* 20, 5863-5875.
- Gerstmann, J. (1928). Über ein noch nicht beschriebenes Reflexphänomen bei einer Erkrankung des zerebellären Systems. *Wien Medizin Wochenschr.* 78, 906-908.
- Gerstmann, J., Sträussler, E. und Scheinker, I. (1936). Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems; zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* 154, 736-762.
- Gibbons, R. A. und Hunter, G. D. (1967). Nature of the scrapie agent. *Nature* 215, 1041-1043.
- Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C., Asher, D. M., Alpers, M. P., Beck, E., Daniel, P. M. und Matthews, W. B. (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 161, 388-389.
- Giese, A., Bieschke, J., Eigen, M. und Kretzschmar, H. A. (2000). Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases. *Arch. Virol. Suppl.* 161-171.
- Giese, A., Levin, J., Bertsch, U. und Kretzschmar, H. (2004). Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 1240-1246.
- Goldfarb, L. G., Brown, P., McCombie, W. R., Goldgaber, D., Swergold, G. D., Wills, P. R., Cervenakova, L., Baron, H., Gibbs, C. J., Jr. und Gajdusek, D. C. (1991). Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10926-10930.
- Goldmann, W., Hunter, N., Foster, J. D., Salbaum, J. M., Beyreuther, K. und Hope, J. (1990). Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2476-80.
- Gossert, A. D., Bonjour, S., Lysek, D. A., Fiorito, F. und Wuthrich, K. (2005). Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 646-650.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B. und Cohen, F. E. (2004). Evidence for assembly of prions with left-handed  $\beta$ -helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 8342-8347.
- Graner, E., Mercadante, A. F., Zanata, S. M., Forlenza, O. V., Cabral, A. L., Veiga, S. S., Juliano, M. A., Roesler, R., Walz, R., Minetti, A., Izquierdo, I., Martins, V. R. und Brentani, R. R. (2000a). Cellular prion protein binds laminin and mediates neuriteogenesis. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 76, 85-92.



Graner, E., Mercadante, A. F., Zanata, S. M., Martins, V. R., Jay, D. G. und Brentani, R. R. (2000b). Laminin-induced PC-12 cell differentiation is inhibited following laser inactivation of cellular prion protein. *FEBS Lett.* 482, 257-260.

Griffith, J. S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043-1044.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.

Haraguchi, T., Fisher, S., Olofsson, S., Endo, T., Groth, D., Tarentino, A., Borchelt, D. R., Teplov, D., Hood, L., Burlingame, A., Lycke, E., Kobata, A. und Prusiner, S. B. (1989). Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 274, 1-13.

Harris, D. A., Huber, M. T., van Dijken, P., Shyng, S. L., Chait, B. T. und Wang, R. (1993a). Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry* 32, 1009-1016.

Harris, D. A., Lele, P. und Snider, W. D. (1993b). Localization of the mRNA for a chicken prion protein by in situ hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4309-4313.

Hartsough, G. R. und Burger, D. (1965). Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J. Infect. Dis.* 115, 387-392.

Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schurmann, P., Windl, O., Brose, N. und Kretschmar, H. (1999). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.* 19, 8866-75.

Herms, J. W., Tings, T., Dunker, S. und Kretschmar, H. A. (2001). Prion protein affects  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  currents in cerebellar purkinje cells. *Neurobiol. Dis.* 8, 324-330.

Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1988). Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32.

Hill, A. F., Antoniou, M. und Collinge, J. (1999). Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J. Gen. Virol.* 80, 11-14.

Hill, A. F. und Collinge, J. (2003). Subclinical prion infection in humans and animals. *Br. Med. Bull.* 66, 161-170.

Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J. und Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389, 448-50, 526.

Hill, A. F., Joiner, S., Linehan, J., Desbruslais, M., Lantos, P. L. und Collinge, J. (2000). Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10248-10253.

- Hope, J., Morton, L. J., Farquhar, C. F., Multhaup, G., Beyreuther, K. und Kimberlin, R. H. (1986). The major polypeptide of scrapie-associated fibrils (SAF) has the same size, charge distribution and N-terminal protein sequence as predicted for the normal brain protein (PrP). *EMBO J.* 5, 2591-2597.
- Horiuchi, M., Baron, G. S., Xiong, L. W. und Caughey, B. (2001). Inhibition of interactions and interconversions of prion protein isoforms by peptide fragments from the C-terminal folded domain. *J. Biol. Chem.* 276, 15489-15497.
- Horiuchi, M. und Caughey, B. (1999). Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *EMBO J.* 18, 3193-3203.
- Horiuchi, M., Ishiguro, N., Nagasawa, H., Toyoda, Y. und Shinagawa, M. (1998). Genomic structure of the bovine PrP gene and complete nucleotide sequence of bovine PrP cDNA. *Anim. Genet.* 29, 37-40.
- Hornemann, S. und Glockshuber, R. (1996). Autonomous and reversible folding of a soluble amino-terminally truncated segment of the mouse prion protein. *J. Mol. Biol.* 261, 614-619.
- Hornemann, S., Korth, C., Oesch, B., Riek, R., Wider, G., Wuthrich, K. und Glockshuber, R. (1997). Recombinant full-length murine prion protein, mPrP(23-231): purification and spectroscopic characterization. *FEBS Lett.* 413, 277-281.
- Hornemann, S., Schorn, C. und Wuthrich, K. (2004). NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO Rep.* 5, 1159-1164.
- Hornshaw, M. P., McDermott, J. R. und Candy, J. M. (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 207, 621-629.
- Houston, F., Foster, J. D., Chong, A., Hunter, N. und Bostock, C. J. (2000). Transmission of BSE by blood transfusion in sheep. *Lancet* 356, 999-1000.
- Huang, Z., Gabriel, J. M., Baldwin, M. A., Fletterick, R. J., Prusiner, S. B. und Cohen, F. E. (1994). Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7139-7143.
- Huang, Z., Prusiner, S. B. und Cohen, F. E. (1995). Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold. Des* 1, 13-19.
- Humphrey, W., Dalke, A. und Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33-38.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.
- Ironside, J. W., Sutherland, K., Bell, J. E., McCardle, L., Barrie, C., Estebeiro, K., Zeidler, M. und Will, R. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease: neuropathological and clinical features. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 61, 523-530.

Jakob, A. M. (1921a). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (Spastische Pseudosklerose - Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 70, 132-146.

Jakob, A. M. (1921b). Über eine der Multiplen Sklerose klinisch nahestehenden Erkrankung des Zentralnervensystems (Spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswertem anatomischen Befunde. *Medizinische Klinik* 13, 372.

James, T. L., Liu, H., Ulyanov, N. B., Farr-Jones, S., Zhang, H., Donne, D. G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S. B. und Cohen, F. E. (1997). Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10086-10091.

Jansen, K., Schafer, O., Birkmann, E., Post, K., Serban, H., Prusiner, S. B. und Riesner, D. (2001). Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. *Biol. Chem.* 382, 683-691.

Jarrett, J. T. und Lansbury, P. T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73, 1055-1058.

Jeffrey, M., Scott, J. R., Williams, A. und Fraser, H. (1992). Ultrastructural features of spongiform encephalopathy transmitted to mice from three species of bovidae. *Acta Neuropathol.* 84, 559-569.

Jeffrey, M. und Wells, G. A. (1988). Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). *Vet. Pathol.* 25, 398-399.

Jimenez-Huete, A., Lievens, P. M., Vidal, R., Piccardo, P., Ghetti, B., Tagliavini, F., Frangione, B. und Prelli, F. (1998). Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues. *Am. J. Pathol.* 153, 1561-1572.

Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C. M., Wallace, A. C., James, T. L., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (1997). Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 10069-10074.

Kascsak, R. J., Fersko, R., Pulgiano, D., Rubenstein, R. und Carp, R. I. (1997). Immunodiagnosis of prion disease. *Immunol. Invest.* 26, 259-68.

Kascsak, R. J., Rubenstein, R., Merz, P. A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R. I., Wisniewski, H. M. und Diringer, H. (1987). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.* 61, 3688-3693.

Kellings, K., Meyer, N., Mirinda, C., Prusiner, S. B. und Riesner, D. (1992). Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J. Gen. Virol.* 73 ( Pt 4), 1025-1029.

Kellings, K., Meyer, N., Mirinda, C., Prusiner, S. B. und Riesner, D. (1993). Analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations. *Arch. Virol. Suppl.* 7, 215-225.

Kimberlin, R. H., Cole, S. und Walker, C. A. (1986). Transmissible mink encephalopathy (TME) in Chinese hamsters: identification of two strains of TME and comparisons with scrapie. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 12, 197-206.

Kimberlin, R. H., Cole, S. und Walker, C. A. (1987). Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J. Gen. Virol.* 68, 1875-1881.

Kimberlin, R. H. und Walker, C. A. (1978). Evidence that the transmission of one source of scrapie agent to hamsters involves separation of agent strains from a mixture. *J. Gen. Virol.* 39, 487-496.

Kimberlin, R. H., Walker, C. A. und Fraser, H. (1989). The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J. Gen. Virol.* 70 ( Pt 8), 2017-2025.

Kimberlin, R. H., Walker, C. A., Millson, G. C., Taylor, D. M., Robertson, P. A., Tomlinson, A. H. und Dickinson, A. G. (1983). Disinfection studies with two strains of mouse-passaged scrapie agent. Guidelines for Creutzfeldt-Jakob and related agents. *J. Neurol. Sci.* 59, 355-369.

Kirby, L., Birkett, C. R., Rudyk, H., Gilbert, I. H. und Hope, J. (2003). In vitro cell-free conversion of bacterial recombinant PrP to PrPres as a model for conversion. *J. Gen. Virol.* 84, 1013-1020.

Kitamoto, T., Tateishi, J., Tashima, T., Takeshita, I., Barry, R. A., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (1986). Amyloid plaques in Creutzfeldt-Jakob disease stain with prion protein antibodies. *Ann. Neurol.* 20, 204-208.

Kitamoto, T., Yi, R., Mohri, S. und Tateishi, J. (1990). Cerebral amyloid in mice with Creutzfeldt-Jakob disease is influenced by the strain of the infectious agent. *Brain Res.* 508, 165-167.

Klamt, F., Dal Pizzol, F., Conte da Frota ML JR, Walz, R., Andrades, M. E., da Silva, E. G., Brentani, R. R., Izquierdo, I. und Fonseca Moreira, J. C. (2001). Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1137-1144.

Kleber-Janke, T. und Becker, W. M. (2000). Use of modified BL21(DE3) Escherichia coli cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expr. Purif.* 19, 419-424.

Klitzman, R. (1999). Sorcery and science: responses to kuru and other epidemics. *West. J. Med.* 171, 204-206.

Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T. und Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370, 471-4.

Kocisko, D. A., Priola, S. A., Raymond, G. J., Chesebro, B., Lansbury, P. T. und Caughey, B. (1995). Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to

protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3923-7.

Krasemann, S., Groschup, M. H., Harmeyer, S., Hunsmann, G. und Bodemer, W. (1996). Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP<sup>0/0</sup> mice. *Mol. Med.* 2, 725-734.

Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E. und DeArmond, S. J. (1986a). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am. J. Pathol.* 122, 1-5.

Kretzschmar, H. A., Stowring, L. E., Westaway, D., Stubblebine, W. H., Prusiner, S. B. und DeArmond, S. J. (1986b). Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* 5, 315-324.

Kretzschmar, H. A., Tings, T., Madlung, A., Giese, A. und Herms, J. (2000). Function of PrP<sup>C</sup> as a copper-binding protein at the synapse. *Arch. Virol. Suppl.* 239-249.

Kunkel, T. A., Roberts, J. D. und Zakour, R. A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* 154, 367-382.

Kyhse-Andersen, J. (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* 10, 203-209.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lasmezas, C. I. (2003). Putative functions of PrP<sup>C</sup>. *Br. Med. Bull.* 66, 61-70.

Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J. und Hauw, J. J. (1996). BSE transmission to macaques. *Nature* 381, 743-744.

Lee, I. Y., Westaway, D., Smit, A. F., Wang, K., Seto, J., Chen, L., Acharya, C., Ankener, M., Baskin, D., Cooper, C., Yao, H., Prusiner, S. B. und Hood, L. E. (1998). Complete genomic sequence and analysis of the prion protein gene region from three mammalian species. *Genome Res.* 8, 1022-1037.

Leggett, M. M., Dukes, J. und Pirie, H. M. (1990). A spongiform encephalopathy in a cat. *Vet. Rec.* 127, 586-588.

Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H. O., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (2004). Synthetic mammalian prions. *Science* 305, 673-676.

Levin, J., Bertsch, U., Kretzschmar, H. und Giese, A. (2005). Single particle analysis of manganese-induced prion protein aggregates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 1200-1207.

Liemann, S. und Glockshuber, R. (1999). Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein. *Biochemistry* 38, 3258-3267.

- Liu, H., Farr-Jones, S., Ulyanov, N. B., Llinas, M., Marqusee, S., Groth, D., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. und James, T. L. (1999). Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90-231). *Biochemistry* 38, 5362-5377.
- Llewelyn, C. A., Hewitt, P. E., Knight, R. S., Amar, K., Cousens, S., Mackenzie, J. und Will, R. G. (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363, 417-421.
- Lloyd, S. E., Onwuazor, O. N., Beck, J. A., Mallinson, G., Farrall, M., Targonski, P., Collinge, J. und Fisher, E. M. (2001). Identification of multiple quantitative trait loci linked to prion disease incubation period in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 6279-6283.
- Locht, C., Chesebro, B., Race, R. und Keith, J. M. (1986). Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 6372-6.
- Lopez Garcia, F., Zahn, R., Riek, R. und Wuthrich, K. (2000). NMR structure of the bovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8334-9.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Lu, K., Wang, W., Xie, Z., Wong, B. S., Li, R., Petersen, R. B., Sy, M. S. und Chen, S. G. (2000). Expression and structural characterization of the recombinant human doppel protein. *Biochemistry* 39, 13575-13583.
- Lucassen, R., Nishina, K. und Supattapone, S. (2003). In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl groups. *Biochemistry* 42, 4127-4135.
- Lucero, H. A. und Robbins, P. W. (2004). Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 426, 208-224.
- Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Lugaresi, A., Tinuper, P., Zucconi, M. und Gambetti, P. (1986). Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N. Engl. J. Med.* 315, 997-1003.
- Lysek, D. A., Schorn, C., Nivon, L. G., Esteve-Moya, V., Christen, B., Calzolari, L., von Schroetter, C., Fiorito, F., Herrmann, T., Guntert, P. und Wuthrich, K. (2005). Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H. und Hope, J. (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 115, 117-122.
- Manson, J. C., Clarke, A. R., Hooper, M. L., Aitchison, L., McConnell, I. und Hope, J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol. Neurobiol.* 8, 121-127.
- Masel, J. und Jansen, V. A. (2000). Designing drugs to stop the formation of prion aggregates and other amyloids. *Biophys. Chem.* 88, 47-59.

- Masters, C. L., Gajdusek, D. C. und Gibbs, C. J., Jr. (1981). Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain* 104, 559-588.
- McCarthy, K., Taylor-Robinson, C. H. und Illinger, S. E. (1963). Isolation of Rubella virus from cases in Britain. *Lancet* 15, 593-598.
- McGowan, J. P. (1922). Scrapie in Sheep. *Scottish J. Agric.* 5, 365-375.
- McKinley, M. P., Bolton, D. C. und Prusiner, S. B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35, 57-62.
- McKinley, M. P., Taraboulos, A., Kenaga, L., Serban, D., Stieber, A., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. und Gonatas, N. (1991). Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab. Invest.* 65, 622-630.
- McMahon, H. E., Mange, A., Nishida, N., Creminon, C., Casanova, D. und Lehmann, S. (2001). Cleavage of the amino terminus of the prion protein by reactive oxygen species. *J. Biol. Chem.* 276, 2286-2291.
- Mehlhorn, I., Groth, D., Stockel, J., Moffat, B., Reilly, D., Yansura, D., Willett, W. S., Baldwin, M., Fletterick, R., Cohen, F. E., Vandlen, R., Henner, D. und Prusiner, S. B. (1996). High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry* 35, 5528-5537.
- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M. und Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol.* 54, 63-74.
- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M., Manuelidis, L. und Manuelidis, E. E. (1983). Scrapie-associated fibrils in Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 306, 474-476.
- Meyer, N., Rosenbaum, V., Schmidt, B., Gilles, K., Mirenda, C., Groth, D., Prusiner, S. B. und Riesner, D. (1991). Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *J. Gen. Virol.* 72, 37-49.
- Miller, M. W. und Williams, E. S. (2003). Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature* 425, 35-36.
- Mo, H., Moore, R. C., Cohen, F. E., Westaway, D., Prusiner, S. B., Wright, P. E. und Dyson, H. J. (2001). Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 2352-2357.
- Moore, R. C., Lee, I. Y., Silverman, G. L., Harrison, P. M., Strome, R., Heinrich, C., Karunaratne, A., Pasternak, S. H., Chishti, M. A., Liang, Y., Mastrangelo, P., Wang, K., Smit, A. F., Katamine, S., Carlson, G. A., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Melton, D. W., Tremblay, P., Hood, L. E. und Westaway, D. (1999). Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J. Mol. Biol.* 292, 797-817.
- Morante, S., Gonzalez-Iglesias, R., Potrich, C., Meneghini, C., Meyer-Klaucke, W., Menestrina, G. und Gasset, M. (2004). Inter- and intra-octarepeat Cu(II) site geometries

in the prion protein: implications in Cu(II) binding cooperativity and Cu(II)-mediated assemblies. *J. Biol. Chem.* 279, 11753-11759.

Moreno, C. R., Lantier, F., Lantier, I., Sarradin, P. und Elsen, J. M. (2003). Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics* 165, 2085-2091.

Moser, M., Colello, R. J., Pott, U. und Oesch, B. (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 14, 509-517.

Mulcahy, E. R. und Bessen, R. A. (2004). Strain-specific kinetics of prion protein formation in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 279, 1643-1649.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263-273.

Nathanson, N. (1980). Slow viruses and chronic disease: the contribution of epidemiology. *Public Health Rep.* 95, 436-443.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.

Nishida, N., Tremblay, P., Sugimoto, T., Shigematsu, K., Shirabe, S., Petromilli, C., Erpel, S. P., Nakaoka, R., Atarashi, R., Houtani, T., Torchia, M., Sakaguchi, S., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. und Katamine, S. (1999). A mouse prion protein transgene rescues mice deficient for the prion protein gene from purkinje cell degeneration and demyelination. *Lab. Invest.* 79, 689-697.

Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E. und al., e. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735-46.

Owen, F., Poulter, M., Shah, T., Collinge, J., Lofthouse, R., Baker, H., Ridley, R., McVey, J. und Crow, T. J. (1990). An in-frame insertion in the prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 7, 273-276.

Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (1993). Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10962-10966.

Pan, K. M., Stahl, N. und Prusiner, S. B. (1992). Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Sci.* 1, 1343-1352.

Pan, T., Wong, B. S., Liu, T., Li, R., Petersen, R. B. und Sy, M. S. (2002). Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. *Biochem. J.* 368, 81-90.



Parchi, P., Capellari, S., Chen, S. G., Petersen, R. B., Gambetti, P., Kopp, N., Brown, P., Kitamoto, T., Tateishi, J., Giese, A. und Kretzschmar, H. (1997). Typing prion isoforms. *Nature* 386, 232-234.

Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S. G., Farlow, M., Dickson, D. W., Sima, A. A., Trojanowski, J. Q., Petersen, R. B. und Gambetti, P. (1996). Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann. Neurol.* 39, 767-778.

Parchi, P., Giese, A., Capellari, S., Brown, P., Schulz-Schaeffer, W., Windl, O., Zerr, I., Budka, H., Kopp, N., Piccardo, P., Poser, S., Rojiani, A., Streichemberger, N., Julien, J., Vital, C., Ghetti, B., Gambetti, P. und Kretzschmar, H. (1999). Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann. Neurol.* 46, 224-233.

Pattison, I. H. (1966). The relative susceptibility of sheep, goats and mice to two types of the goat scrapie agent. *Res. Vet. Sci.* 7, 207-212.

Pattison, I. H., Hoare, M. N., Jebbett, J. N. und Watson, W. A. (1972). Spread of scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Vet. Rec.* 90, 465-468.

Pattison, I. H., Hoare, M. N., Jebbett, J. N. und Watson, W. A. (1974). Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Br. Vet. J* 130, 15-17.

Pattison, I. H. und Millson, G. C. (1960). Further observations on the experimental production of scrapie in goats and sheep. *J. Comp. Pathol.* 70, 182-193.

Pattison, I. H. und Millson, G. C. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J. Comp. Pathol.* 71, 101-109.

Pauly, P. C. und Harris, D. A. (1998). Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J. Biol. Chem.* 273, 33107-33110.

Peden, A. H., Head, M. W., Ritchie, D. L., Bell, J. E. und Ironside, J. W. (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet* 364, 527-529.

Peretz, D., Williamson, R. A., Legname, G., Matsunaga, Y., Vergara, J., Burton, D. R., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. und Scott, M. R. (2002). A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron* 34, 921-932.

Perutz, M. F., Pope, B. J., Owen, D., Wanker, E. E. und Scherzinger, E. (2002). Aggregation of proteins with expanded glutamine and alanine repeats of the glutamine-rich and asparagine-rich domains of Sup35 and of the amyloid  $\beta$ -peptide of amyloid plaques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5596-5600.

Piening, N., Weber, P., Giese, A. und Kretzschmar, H. (2005). Breakage of PrP aggregates is essential for efficient autocatalytic propagation of misfolded prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 339-343.

- Post, K., Pitschke, M., Schafer, O., Wille, H., Appel, T. R., Kirsch, D., Mehlhorn, I., Serban, H., Prusiner, S. B. und Riesner, D. (1998). Rapid acquisition of  $\beta$ -sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. *Biol. Chem.* 379, 1307-1317.
- Praus, M., Kettelgerdes, G., Baier, M., Holzhutter, H. G., Jungblut, P. R., Maissen, M., Epple, G., Schleuning, W. D., Kottgen, E., Aguzzi, A. und Gessner, R. (2003). Stimulation of plasminogen activation by recombinant cellular prion protein is conserved in the NH<sub>2</sub>-terminal fragment PrP23-110. *Thromb. Haemost.* 89, 812-819.
- Priola, S. A. (1996). Similar protein signatures for BSE and vCJD. *Nat. Med.* 2, 1303-1304.
- Priola, S. A. (1999). Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomed. Pharmacother.* 53, 27-33.
- Priola, S. A., Caughey, B., Wehrly, K. und Chesebro, B. (1995). A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP. *J. Biol. Chem.* 270, 3299-3305.
- Priola, S. A., Chabry, J. und Chan, K. (2001). Efficient conversion of normal prion protein (PrP) by abnormal hamster PrP is determined by homology at amino acid residue 155. *J. Virol.* 75, 4673-4680.
- Priola, S. A. und Chesebro, B. (1995). A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *J. Virol.* 69, 7754-7758.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144.
- Prusiner, S. B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science* 252, 1515-1522.
- Prusiner, S. B. (1996). Molecular biology and pathogenesis of prion diseases. *Trends Biochem. Sci.* 21, 482-487.
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 13363-13383.
- Prusiner, S. B., Bolton, D. C., Groth, D. F., Bowman, K. A., Cochran, S. P. und McKinley, M. P. (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 21, 6942-6950.
- Prusiner, S. B., Groth, D., Serban, A., Stahl, N. und Gabizon, R. (1993). Attempts to restore scrapie prion infectivity after exposure to protein denaturants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2793-2797.
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Bolton, D. C., Kent, S. B. und Hood, L. E. (1984). Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 38, 127-134.
- Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F. und Glenner, G. G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35, 349-358.

- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D. und Carlson, G. A. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* 63, 673-686.
- Prusiner, S. B. und Scott, M. R. (1997). Genetics of prions. *Annu. Rev. Genet.* 31, 139-175.
- Puckett, C., Concannon, P., Casey, C. und Hood, L. (1991). Genomic structure of the human prion protein gene. *Am. J. Hum. Genet.* 49, 320-9.
- Raymond, G. J., Hope, J., Kocisko, D. A., Priola, S. A., Raymond, L. D., Bossers, A., Ironside, J., Will, R. G., Chen, S. G., Petersen, R. B., Gambetti, P., Rubenstein, R., Smits, M. A., Lansbury, P. T. und Caughey, B. (1997). Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* 388, 285-8.
- Ridley, R. M. und Baker, H. F. (1996). Variation on a theme of Creutzfeldt-Jakob disease: implications of new cases with a young age at onset. *J. Gen. Virol.* 77, 2895-2904.
- Rieger, R., Edenhofer, F., Lasmezas, C. I. und Weiss, S. (1997). The human 37-kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat. Med.* 3, 1383-1388.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. und Wuthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature* 382, 180-182.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. und Wuthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* 413, 282-288.
- Riek, R., Wider, G., Billeter, M., Hornemann, S., Glockshuber, R. und Wuthrich, K. (1998). Prion protein NMR structure and familial human spongiform encephalopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11667-11672.
- Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, H., Groth, D., Baldwin, M. A. und Prusiner, S. B. (1996). Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high  $\alpha$ -helical content and lacking scrapie infectivity. *J. Virol.* 70, 1714-1722.
- Riesner, D., Kellings, K., Wiese, U., Wulfert, M., Mirenda, C. und Prusiner, S. B. (1993). Prions and nucleic acids: search for "residual" nucleic acids and screening for mutations in the PrP-gene. *Dev. Biol. Stand.* 80, 173-181.
- Rudd, P. M., Endo, T., Colominas, C., Groth, D., Wheeler, S. F., Harvey, D. J., Wormald, M. R., Serban, H., Prusiner, S. B., Kobata, A. und Dwek, R. A. (1999). Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13044-13049.
- Rudd, P. M., Wormald, M. R., Wing, D. R., Prusiner, S. B. und Dwek, R. A. (2001). Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry* 40, 3759-66.

- Saborio, G. P., Permanne, B. und Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810-813.
- Saborio, G. P., Soto, C., Kascsak, R. J., Levy, E., Kascsak, R., Harris, D. A. und Frangione, B. (1999). Cell-lysate conversion of prion protein into its protease-resistant isoform suggests the participation of a cellular chaperone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 470-475.
- Sabuncu, E., Petit, S., Le Dur, A., Lan, L. T., Vilotte, J. L., Laude, H. und Vilette, D. (2003). PrP polymorphisms tightly control sheep prion replication in cultured cells. *J. Virol.* 77, 2696-2700.
- Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C. und Gibbs, C. J., Jr. (1993a). Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J. Biol. Chem.* 268, 20276-20284.
- Safar, J., Roller, P. P., Gajdusek, D. C. und Gibbs, C. J., Jr. (1993b). Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci.* 2, 2206-2216.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (1998). Eight prion strains have PrP<sup>Sc</sup> molecules with different conformations. *Nat. Med.* 4, 1157-1165.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakaguchi, S., Katamine, S., Nishida, N., Moriuchi, R., Shigematsu, K., Sugimoto, T., Nakatani, A., Kataoka, Y., Houtani, T., Shirabe, S., Okada, H., Hasegawa, S., Miyamoto, T. und Noda, T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380, 528-531.
- Sanger, F. und Coulson, A. R. (1978). The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett.* 87, 107-110.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Schätzl, H. M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (1995). Prion protein gene variation among primates. *J. Mol. Biol.* 245, 362-374.
- Schwille, P., Meyer-Almes, F. J. und Rigler, R. (1997). Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys. J.* 72, 1878-1886.
- Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G. und DeArmond, S. J. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* 59, 847-857.

Scott, M., Groth, D., Foster, D., Torchia, M., Yang, S. L., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (1993). Propagation of prions with artificial properties in transgenic mice expressing chimeric PrP genes. *Cell* 73, 979-988.

Scott, M. R., Peretz, D., Nguyen, H. O., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (2005). Transmission barriers for bovine, ovine, and human prions in transgenic mice. *J. Virol.* 79, 5259-5271.

Scott, M. R., Safar, J., Telling, G., Nguyen, O., Groth, D., Torchia, M., Koehler, R., Tremblay, P., Walther, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (1997). Identification of a prion protein epitope modulating transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14279-14284.

Scott, M. R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H. O., Tremblay, P., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (1999). Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 15137-15142.

Shyng, S. L., Huber, M. T. und Harris, D. A. (1993). A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 268, 15922-15928.

Sigurdson, C. J. und Miller, M. W. (2003). Other animal prion diseases. *Br. Med. Bull.* 66, 199-212.

Silverman, G. L., Qin, K., Moore, R. C., Yang, Y., Mastrangelo, P., Tremblay, P., Prusiner, S. B., Cohen, F. E. und Westaway, D. (2000). Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp<sup>0/0</sup> mice predisposed to Purkinje cell loss. *J. Biol. Chem.* 275, 26834-26841.

Simoncic, T., Duga, S., Strumbo, B., Asselta, R., Cecilian, F. und Ronchi, S. (2000). cDNA cloning of turtle prion protein. *FEBS Lett.* 469, 33-38.

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76-85.

Soto, C., Anderes, L., Suardi, S., Cardone, F., Castilla, J., Frossard, M. J., Peano, S., Saa, P., Limido, L., Carbonatto, M., Ironside, J., Torres, J. M., Pocchiari, M. und Tagliavini, F. (2005). Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett.* 579, 638-642.

Stahl, N., Baldwin, M. A., Teplow, D. B., Hood, L., Gibson, B. W., Burlingame, A. L. und Prusiner, S. B. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32, 1991-2002.

Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. und Prusiner, S. B. (1987). Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229-240.

- Steen, H., Myrnes, A. und Austrheim, G. (2005). Sheep grazing and rodent populations: evidence of negative interactions from a landscape scale experiment. *Oecologia* 143, 357-364.
- Stimson, E., Hope, J., Chong, A. und Burlingame, A. L. (1999). Site-specific characterization of the N-linked glycans of murine prion protein by high-performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry and exoglycosidase digestions. *Biochemistry* 38, 4885-95.
- Stockmann, S. (1913). Scrapie: an obscure disease of sheep. *J. Comp. Path. Ther.* 317.
- Stork, M., Giese, A., Kretzschmar, H. A. und Tavan, P. (2005). MD simulations indicate a possible role of parallel  $\beta$ -helices in seeded aggregation of poly-Gln. *Biophys. J.* 88, 2442-2451.
- Strumbo, B., Ronchi, S., Bolis, L. C. und Simonic, T. (2001). Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein. *FEBS Lett.* 508, 170-174.
- Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B. und Blake, C. C. (1997). Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J. Mol. Biol.* 273, 729-739.
- Suzuki, T., Kurokawa, T., Hashimoto, H. und Sugiyama, M. (2002). cDNA sequence and tissue expression of Fugu rubripes prion protein-like: a candidate for the teleost orthologue of tetrapod PrPs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 912-917.
- Taraboulos, A., Raeber, A. J., Borchelt, D. R., Serban, D. und Prusiner, S. B. (1992). Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol. Biol. Cell* 3, 851-863.
- Taraboulos, A., Rogers, M., Borchelt, D. R., McKinley, M. P., Scott, M., Serban, D. und Prusiner, S. B. (1990a). Acquisition of protease resistance by prion proteins in scrapie-infected cells does not require asparagine-linked glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 8262-8266.
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L. und Prusiner, S. B. (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell Biol.* 129, 121-132.
- Taraboulos, A., Serban, D. und Prusiner, S. B. (1990b). Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J. Cell Biol.* 110, 2117-2132.
- Tateishi, J., Brown, P., Kitamoto, T., Hoque, Z. M., Roos, R., Wollman, R., Cervenakova, L. und Gajdusek, D. C. (1995). First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* 376, 434-435.
- Telling, G. C., Parchi, P., DeArmond, S. J., Cortelli, P., Montagna, P., Gabizon, R., Mastrianni, J., Lugaresi, E., Gambetti, P. und Prusiner, S. B. (1996). Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274, 2079-2082.

- Telling, G. C., Scott, M., Hsiao, K. K., Foster, D., Yang, S. L., Torchia, M., Sidle, K. C., Collinge, J., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (1994). Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9936-9940.
- Telling, G. C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79-90.
- Thomzig, A., Kratzel, C., Lenz, G., Kruger, D. und Beekes, M. (2003). Widespread PrPSc accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. *EMBO Rep.* 4, 530-533.
- Thomzig, A., Schulz-Schaeffer, W., Kratzel, C., Mai, J. und Beekes, M. (2004a). Preclinical deposition of pathological prion protein PrPSc in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. *J. Clin. Invest.* 113, 1465-1472.
- Thomzig, A., Spassov, S., Friedrich, M., Naumann, D. und Beekes, M. (2004b). Discriminating scrapie and bovine spongiform encephalopathy isolates by infrared spectroscopy of pathological prion protein. *J. Biol. Chem.* 279, 33847-33854.
- Thormar, H. (1971). Slow infections of the central nervous system. II. *Z. Neurol.* 199, 151-166.
- Tobler, I., Deboer, T. und Fischer, M. (1997). Sleep and sleep regulation in normal and prion protein-deficient mice. *J. Neurosci.* 17, 1869-1879.
- Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A. und Manson, J. C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380, 639-642.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Turk, E., Teplow, D. B., Hood, L. E. und Prusiner, S. B. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur. J. Biochem.* 176, 21-30.
- van Rheede, T., Smolenaars, M. M., Madsen, O. und de Jong, W. W. (2003). Molecular evolution of the mammalian prion protein. *Mol. Biol. Evol.* 20, 111-121.
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G., Taraboulos, A. und Prusiner, S. B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14945-14949.
- Viles, J. H., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Goodin, D. B., Wright, P. E. und Dyson, H. J. (1999). Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 2042-2047.

Vilette, D., Andreoletti, O., Archer, F., Madelaine, M. F., Vilotte, J. L., Lehmann, S. und Laude, H. (2001). Ex vivo propagation of infectious sheep scrapie agent in heterologous epithelial cells expressing ovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 4055-4059.

Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., De Strooper, B., Grassi, J., Lopez-Perez, E. und Checler, F. (2001). The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J. Biol. Chem.* 276, 37743-37746.

Vorberg, I., Buschmann, A., Harmeyer, S., Saalmuller, A., Pfaff, E. und Groschup, M. H. (1999). A novel epitope for the specific detection of exogenous prion proteins in transgenic mice and transfected murine cell lines. *Virology* 255, 26-31.

Weissmann, C. (1996). The Ninth Datta Lecture. Molecular biology of transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS Lett.* 389, 3-11.

Weissmann, C., Bueler, H., Fischer, M., Sauer, A. und Aguet, M. (1994). Susceptibility to scrapie in mice is dependent on PrPC. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 343, 431-433.

Wells, G. A., Hawkins, S. A., Green, R. B., Austin, A. R., Dexter, I., Spencer, Y. I., Chaplin, M. J., Stack, M. J. und Dawson, M. (1998). Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet. Rec.* 142, 103-106.

Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M. und Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121, 419-420.

Westaway, D., Cooper, C., Turner, S., Da Costa, M., Carlson, G. A. und Prusiner, S. B. (1994a). Structure and polymorphism of the mouse prion protein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 6418-22.

Westaway, D., Goodman, P. A., Mirenda, C. A., McKinley, M. P., Carlson, G. A. und Prusiner, S. B. (1987). Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell* 51, 651-62.

Westaway, D., Zuliani, V., Cooper, C. M., Da Costa, M., Neuman, S., Jenny, A. L., Detwiler, L. und Prusiner, S. B. (1994b). Homozygosity for prion protein alleles encoding glutamine-171 renders sheep susceptible to natural scrapie. *Genes Dev.* 8, 959-969.

Whittington, M. A., Sidle, K. C., Gowland, I., Meads, J., Hill, A. F., Palmer, M. S., Jefferys, J. G. und Collinge, J. (1995). Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nat. Genet.* 9, 197-201.

Wilesmith, J. W., Ryan, J. B. und Atkinson, M. J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet. Rec.* 128, 199-203.

Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P. und Ryan, J. B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* 123, 638-644.



- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A. und Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347, 921-925.
- Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A. und Prusiner, S. B. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 3563-3568.
- Williams, E. S. und Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* 16, 89-98.
- Windl, O., Lorenz, H., Behrens, C., Romer, A. und Kretzschmar, H. A. (1999). Construction and characterization of murine neuroblastoma cell clones allowing inducible and high expression of the prion protein. *J. Gen. Virol.* 80, 15-21.
- Woolhouse, M. E., Matthews, L., Coen, P., Stringer, S. M., Foster, J. D. und Hunter, N. (1999). Population dynamics of scrapie in a sheep flock. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354, 751-756.
- Wopfner, F., Weidenhofer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T. F., Werner, T. und Schätzl, H. M. (1999). Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J. Mol. Biol.* 289, 1163-1178.
- Wyatt, J. M., Pearson, G. R., Smerdon, T. N., Gruffydd-Jones, T. J., Wells, G. A. und Wilesmith, J. W. (1991). Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet. Rec.* 129, 233-236.
- Xiang, W., Windl, O., Wunsch, G., Dugas, M., Kohlmann, A., Dierkes, N., Westner, I. M. und Kretzschmar, H. A. (2004). Identification of differentially expressed genes in scrapie-infected mouse brains by using global gene expression technology. *J. Virol.* 78, 11051-11060.
- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. und Wuthrich, K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 145-50.
- Zigas, V. und Gajdusek, D. C. (1957). Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. *Med. J. Aust.* 44, 745-754.
- Zulianello, L., Kaneko, K., Scott, M., Erpel, S., Han, D., Cohen, F. E. und Prusiner, S. B. (2000). Dominant-negative inhibition of prion formation diminished by deletion mutagenesis of the prion protein. *J. Virol.* 74, 4351-4360.

## 7. Liste der Veröffentlichungen

### Veröffentlichungen

Niklas Piening, Petra Weber, Armin Giese, Hans Kretzschmar; Breakage of PrP aggregates is essential for efficient autocatalytic propagation of misfolded prion protein; *Biophysical Biochemical Research Communications*, 326 (2005) 339–343.

### Eingereichte Manuskripte

Niklas Piening, Petra Weber, Tobias Högen, Michael Beekes, Hans Kretzschmar, Armin Giese; Photo-induced crosslinking of prion protein oligomers and prions; *Amyloid: The journal of protein folding disorders*, (in revision).

Niklas Piening, Romolo Nonno, Michele Di Bari, Stephanie Walter, Otto Windl, Umberto Agrimi, Hans A. Kretzschmar, Uwe Bertsch; Different determinants govern conversion efficiency and incubation time during transmission of prion diseases between species; *Journal of Biological Chemistry*, (submitted).

Petra Weber, Armin Giese, Niklas Piening, Gerda Wünsch, Achim Thomzig, Michael Beekes, Hans A. Kretzschmar; Cell-free generation of prion infectivity; *Nature*, (submitted).

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. A. Kretzschmar für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Unterstützung bei der Durchführung, die mir in jeder Hinsicht gewährt wurde.

Herrn Prof. Dr. T. Cremer danke ich für die sehr interessierte und entgegenkommende Art bei der Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Dr. U. Bertsch und Herrn Dr. A. Giese möchte ich meinen herzlichsten Dank aussprechen, da ohne ihre ständige Bereitschaft zum wissenschaftlichen Gespräch und ihren kritischen Anregungen, die Durchführung der Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. U. Agrimi, Dr. R. Nonno und Dr. H. Laude für die fruchtbare Zusammenarbeit im Rahmen des EU-Projektes „EuroVolTE“.

Mein Dank gilt besonders Stephanie Walter sowie Brigitte Kraft für die Hilfe bei der experimentellen Durchführung und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Petra Weber und Tobias Högen, für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meiner Frau Steffi, die durch viel Unterstützung, Verständnis und Rücksicht sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

## Lebenslauf

Name	Niklas Piening
Geburtstag	03.02.1976
Geburtsort	Hamburg
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet
1982-1986	Grundschule Altrahlstedt, Hamburg
1987-1995	Charlotte-Paulsen-Gymnasium, Hamburg
1995	Allgemeine Hochschulreife, Abschluss: sehr gut
1995-1996	Zivildienst
1996-2002	Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Studiengang: Diplom-Biologie
1998	Vordiplom
1999	Studienjahr an der University of Queensland (Australien)
2001-2002	Diplomarbeit (Institut für angewandte Molekularbiologie der Pflanzen, Prof. Dr. H. Lörz, Universität Hamburg) Thema: <i>AtVP4</i> , ein Gen aktiv in osmotisch beanspruchten Geweben von <i>Arabidopsis thaliana</i>
2002	Diplomprüfung, Abschluss: sehr gut Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Zellbiologie, Biochemie, Virologie
seit Juli 2002	Promotion am Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung der Ludwig-Maximilians-Universität München