

Aus dem Institut für Neuropathologie
(Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung, ZNP)
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Hans Kretzschmar

Amplifikation von Prionen in vitro

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

vorgelegt von
Nikolaus Ivo Sarafoff
aus
München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. H. Kretzschmar Prof. Dr. rer. nat. C. Haass
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. U. Koszinowski Prof. Dr. med. R. Hohlfeld
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer .nat. Jan Bieschke
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	06.07.2006

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

1. **Sarafoff NI**, Bieschke J, Giese A, Weber P, Bertsch U, Kretzschmar HA, „Automated PrPres amplification using indirect sonication.“ *J Biochem Biophys Methods*. 2005 Jun 30;63(3):213-21.
2. Jan Bieschke, Petra Weber, **Nikolaus Sarafoff**, Michael Beekes, Armin Giese und Hans Kretzschmar, “Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein” *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004) Aug 17;101(33):12207-11

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Prionkrankheiten	7
1.1.1	Transmissible spongiforme Enzephalopathien bei Tieren und Menschen	7
1.1.2	BSE und die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	11
1.2	Erreger der Prionkrankheiten und Prionhypothese	12
1.2.1	Unterschiede zwischen der zellulären (PrP ^C) und der pathogenen (PrP ^{Sc}) Form des Prionproteins	13
1.2.2	Biosynthese von PrP ^{Sc}	14
1.2.3	Synthese von PrP ^{Sc} in vitro	15
1.2.4	Therapieansätze	16
1.3	Zelluläres Prionprotein (PrP^C)	17
1.3.1	Expression und Funktion von PrP ^C	17
1.3.2	PrP und der Einfluss von Metallen	18
1.4	Zielsetzung	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien	21
2.1.2	Antikörper	22
2.1.2.1	Primärantikörper	22
2.1.2.2	Sekundärantikörper	22
2.1.3	Hirngewebe	23
2.1.3.1	Syrian Hamster	23
2.1.3.2	263K Hamster	23
2.1.3.3	Pmp ^{0/0}	23
2.1.4	Geräte, Materialien	23
2.1.5	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	24
2.2	Methoden	26
2.2.1	10% PMCA-Homogenat	26
2.2.2	Stabsonicator PMCA	26
2.2.3	Proteinase K-Verdau	27
2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)	28
2.2.5	Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine - Western Blot	29
2.2.6	Auswertung der Western Blot Bilder	30
2.2.6.1	Normierung von PMCA Versuchen	31

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	5
2.2.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit der ELISA Methode	33
2.2.7.1 Denaturierung des Antigens für ELISA Detektion	33
2.2.7.2 Präparation der ELISA Platte	35
2.2.7.3 Detektion des Antigens	35
2.2.7.4 Kontrollexperimente zur Validierung des ELISA	36
3 Ergebnisse	38
3.1 Kontrollexperimente zur Validierung der PMCA Methode	39
3.1.1 PMCA und Kontrollen	39
3.1.2 PMCA und Leistung	40
3.1.3 PMCA und Inkubationszeit	41
3.1.4 Einfluss von PMCA auf PrPC	42
3.1.5 Quantitative Reproduktion der PMCA	43
3.1.6 PMCA mit serieller Transmission von PrPres	44
3.2 Hemmung der PrPres Erzeugung durch rekombinantes PrP	46
3.3 Metallionenkonzentration und Prionamplifikation	48
3.3.1 Metallionenkonzentration und PMCA	49
3.3.2 Metallionenkonzentration und PK-Verdau	51
3.3.3 Metallionenkonzentration und pH-Wert	52
3.4 Automatisierung der PMCA	53
3.4.1 Entwicklung des Wasserbadamplifikators	53
3.4.2 Automatische PMCA im Wasserbadamplifikator	54
3.4.3 Entwicklung des Munich Prion Cyclers (MPC)	55
3.4.4 Automatische PMCA im Munich Prion Cyler (MPC)	57
4 Diskussion	58
4.1 Etablierung und Analyse der Einzelschritte der PMCA Methode	58
4.2 Spezifität der PMCA Reaktion; rPrP hemmt PMCA Reaktion	58
4.3 Metallionen und PMCA	58
4.4 Automatisierung der PMCA	58
5 Zusammenfassung	58
6 Literaturverzeichnis	58
7 Anhang	58
7.1 Danksagung	58

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	6
7.2 Lebenslauf	58
7.3 Ehrenwörtliche Erklärung	58

1 Einleitung

1.1 Prionkrankheiten

1.1.1 Transmissible spongiforme Enzephalopathien bei Tieren und Menschen

Die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) bilden eine Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die Menschen wie Tiere betreffen. Diese Erkrankungen sind klinisch meist durch eine sehr lange Inkubationszeit und einen protrahierten Krankheitsverlauf charakterisiert, der mit zentralnervösen Störungen wie Ataxie und progressiver Demenz einhergeht und immer zum Tode führt. Gehirne von an TSE erkrankten Lebewesen weisen histopathologisch folgende Trias auf: Verlust von Nervenzellen, schwammartige (spongiöse) Auflockerungen des Neuropils und Astrogliose. Darüber hinaus fehlt eine Entzündungsreaktion. Ablagerungen von Amyloid-Plaques können auftreten.

Der Prototyp der TSE ist Scrapie, eine Erkrankung, die bei Schafen und Ziegen auftritt. Scrapie wurde erstmals 1775 dokumentiert (Field, 1969; Field, 1969) und kommt mit Ausnahme von Australien und Neuseeland weltweit vor. In natürlicher Umgebung erkranken die Tiere meist im Alter von 3 Jahren und weisen neben einem starken Juckreiz („to scrape“= kratzen) Koordinationsstörungen auf, die der Erkrankung den deutschen Namen „Traberkrankheit“ eingebracht haben. Die Übertragbarkeit von Scrapie zwischen Schafen ist seit den dreißiger Jahren des letzten Jahrhunderts bekannt (Cuille and Chelle, 1936; Gordon, 1946).

Auch bei anderen Tieren konnten seit einigen Jahren TSE beobachtet werden. Williams und Young beschrieben 1980 spongiforme Enzephalopathien bei Hirschen ("chronic wasting disease of mule deer and elk") (Williams and Young, 1980). Die transmissible Mink-Enzephalopathie konnte bei Nerzen beobachtet werden, in deren Futter sich Scrapie infiziertes Schaffleisch befunden hatte (Hanson et al., 1971). Seit 1986 der erste Fall von Boviner Spongiformer Enzephalopathie (BSE) von Wells et al. histopathologisch bestätigt wurde (Wells et al., 1987), wurden in Großbritannien bis September 2005 184.192 (World organisation for animal health (OIE), 2005) und in Deutschland bis März 2005 368 (Verbraucherministerium Deutschland, 2005) an BSE erkrankte Rinder diagnostiziert. Die BSE-Fälle werden auf die Verfütterung von infektiösem Tiermehl aus Rindern oder Schafen, die selbst mit BSE bzw. Scrapie infiziert waren, zurückgeführt. BSE könnte ursprünglich entweder durch die Erkrankung eines Rinds mit einer genetischen Mutation oder durch Scrapie aus infektiösen Schafskadavern, die in Form von Tierkörpermehl in

die Futterkette gelangten, ausgelöst worden sein. In den letzten Jahren sind die Rinderseuche BSE und die Frage nach ihrer Übertragbarkeit auf den Menschen zunehmend ins Interesse der Öffentlichkeit gerückt und werden daher detaillierter besprochen.

Experimentelle Untersuchungen zeigten, dass der Scrapie-Erreger zum Teil die Speziesbarriere überschreiten kann. Chandler beschrieb die Infektion von Mäusen nach experimenteller Übertragung von Scrapie-Material (Chandler, 1961). Inzwischen ist die Übertragung verschiedener transmissibler spongiformer Enzephalopathien (TSE) über Speziesgrenzen hinweg vielfach belegt. Insbesondere die Übertragung des Scrapie-Erregers als Prototyp der TSE auf Hamster und Maus hat sich als Tiermodell zur Erforschung dieser Erkrankungen bewährt, da bisher kein adäquates *in vitro* System zum Nachweis des Erregers und seiner Infektiosität zur Verfügung steht.

Auch beim Menschen wurden TSE beschrieben. Zu der Gruppe der humanen TSE zählen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS), die tödliche familiäre Schlaflosigkeit ("Fatal Familial Insomnia", FFI) und Kuru.

Die beim Menschen häufigste spongiforme Enzephalopathie ist die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, die in den zwanziger Jahren erstmalig von den beiden deutschen Neurologen Creutzfeldt und Jakob beschrieben wurde (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921). Sie tritt mit einer Inzidenz von ca. einem Fall pro 10^6 Einwohner jährlich auf. CJD kann sporadisch, hereditär oder infektiös bedingt sein. Dabei machen die sporadischen Erkrankungen mit mehr als 85% den Hauptanteil aus. Denkbare Ursachen könnten somatische Mutationen im Prionproteingen (PRNP) oder eine spontane Konversion der zellulären Form des Prionproteins (PrP^{C}) zur pathogenen Scrapie-Form (PrP^{Sc}) oder auch eine infektiöse Genese sein (Prusiner, 1991) (siehe Kap. 1.2). CJD-Fälle werden in 10-15% durch verschiedene Mutationen im Prionproteingen (PRNP) auf Chromosom 20 verursacht und autosomal dominant vererbt (Masters et al., 1981; Windl and Kretzschmar, 2000). Die verbleibenden Fälle sind infektiöser Genese.

Die klassische sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit tritt üblicherweise in der Altersgruppe von 45- bis 75-Jährigen auf, wobei der Altersgipfel zwischen 60 und 65 Jahren liegt. Die Erkrankung kann mit unspezifischen Prodromalerscheinungen beginnen wie Müdigkeit, Gewichtsverlust, Schlaflosigkeit, Depression, Kopfschmerzen sowie allgemeinem Krankheitsgefühl (Weber et al., 1994). Im weiteren Verlauf entwickeln CJD-Patienten eine progressive Demenz, Ataxie, Myoklonien, pyramidale und extrapyramidale Zeichen und Aphasien. Bei der sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit gibt es

allerdings verschiedene klinische Phänotypen, die anhand der Ausprägung und der Kombination klinischer Symptome, dem Krankheitsverlauf und anderen Eigenschaften voneinander unterschieden werden können (Parchi et al., 1999). Die Krankheit schreitet oft binnen zwei bis drei Monaten über akinetischen Mutismus fort bis zum Tod. Sie kann aber auch bis zwei Jahre und länger verlaufen. Ungefähr 70% der Erkrankten versterben innerhalb von sechs Monaten (Weber et al., 1994). Im EEG fallen bei etwa zwei Drittel der Fälle typische triphasische periodische Komplexe auf (Steinhoff et al., 1996; Weber et al., 1994). Die Diagnose ist anhand klinischer Zeichen nur bedingt möglich. Zur Unterstützung der klinischen Diagnose können abnormal hohe Spiegel neuronaler Proteine (14-3-3 Protein, Neuronen-spezifische Enolase) im Liquor herangezogen werden (Hsich et al., 1996; Zerr et al., 1996; Zerr et al., 2000). Neuroradiologische Befunde wie hyperintense Signale der Basalganglien in der Magnetresonanztomographie (MRT) finden sich bei etwa 70% der sporadischen CJD-Fälle und können auch nur die klinische Diagnose unterstützen (Finkenstaedt et al., 1996; Zerr et al., 2000). Eine sichere Diagnose wird heutzutage durch die postmortale neuropathologische Untersuchung gestellt werden (Kretzschmar et al., 1996). Seit kurzem wird auch von CDI Messungen von Hirnbiopsien berichtet (Safar et al., 2005), eine Etablierung in der klinischen Routine bleibt abzuwarten.

Verschiedene Mutationen im Prionproteingen können der familiären Creutzfeldt-Jakob-Krankheit zugrunde liegen. In Abhängigkeit der jeweils vorliegenden Mutation im Prionproteingen unterscheiden sich die familiären CJD-Fälle teilweise deutlich voneinander hinsichtlich des Erkrankungsalter, der klinischen Symptomatik und des Verlaufs (Windl and Kretzschmar, 2000).

Infektiöse Fälle von CJD traten nach neurochirurgischen Operationen mit schlecht sterilisierten Instrumenten (Davanipour et al., 1984; Will and Matthews, 1982) oder nach Verwendung invasiver kontaminierter EEG-Elektroden auf (Bernoulli et al., 1977). Neuere Studien haben gezeigt, dass das infektiöse Agens leicht an Metalloberflächen haftet und durch Metallkabel effizient übertragen werden kann (Zobeley et al., 1999). Des Weiteren wurden CJD-Infektionen über Hornhaut- und Duratransplantate von infizierten Spendern übertragen (Brown et al., 1992; Duffy et al., 1974; Masullo et al., 1989; Nisbet et al., 1989; Thadani et al., 1988). Auch traten CJD-Fälle nach Therapie mit Wachstumshormonen auf, die aus Leichenhypophysen extrahiert worden waren (Brown P., 1985; Brown et al., 1992; Buchanan et al., 1991; Fradkin et al., 1991);. Die Inkubationszeit war bei den direkt intrazerebralen Infektionen erheblich kürzer (18 - 54 Monaten) als bei Therapie mit kontaminierten Wachstumshormonen (4 - 30 Jahren); (Bernoulli et al., 1977; Brown et al., 1992; Duffy et al., 1974).

Eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) wurde erstmals 1996 in Großbritannien beschrieben (Will et al., 1996). Seitdem ist die Zahl der an vCJD Verstorbenen bis November 2005 auf 185 Fälle angestiegen (Centers for Disease Control, 2006).

Die neue Variante unterscheidet sich von der sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit in Erkrankungsalter und klinischem Verlauf (Zeidler et al., 1997b). Die Patienten sind bei Beginn der Erkrankung typischerweise jünger. Das Alter schwankt zwischen 16 und 75 Jahren (mittleres Alter von 29 Jahren zu Beginn der Erkrankung) (Lorains et al., 2001). Der klinische Verlauf ist prolongiert und erstreckt sich über 9 bis 35 Monate (Median 14 Monate) im Gegensatz zu einem ungefähr sechsmonatigen Verlauf der klassischen CJD-Form. Die sonst für CJD typischen EEG-Veränderungen fehlen bei vCJD üblicherweise. Klinisch beginnt vCJD oft mit Verhaltensauffälligkeiten und psychiatrischen Symptomen wie z.B. Depressionen, Angstsymptomatiken oder Halluzinationen (Zeidler et al., 1997a). Im Verlauf entwickeln die meisten Patienten ein progressives zerebelläres Syndrom mit Gang- und Extremitätenataxie (Zeidler et al., 1997b). Demenz tritt im klinischen Verlauf erst spät auf. Manche vCJD-Patienten weisen auch Myoklonien wie bei der klassischen Form auf. Zur Unterstützung der klinischen Diagnose können neuroradiologische Befunde wie hyperintense Signale im Pulvinar in der MRT herangezogen werden (Zeidler et al., 1997b; Zeidler et al., 2000). Bisher wiesen alle vCJD-Fälle in ihrem Prionproteingen (PRNP) am Codon 129 Homozygotie für Methionin auf (Collinge et al., 1996a; Hill et al., 1999). Am Codon 129 findet sich ein Polymorphismus des Prionproteingens. Dieses Codon kann entweder Methionin oder Valin kodieren.

Die neue Variante von CJD kann diagnostiziert werden anhand eines charakteristischen Bandenmusters von PrP^{Sc} im Western Blot, das sich nicht nur im ZNS, sondern auch in einer Tonsillenbiopsie nachweisen lässt (Hill et al., 1999). Die Pathogenese von vCJD und die kausalen Zusammenhänge zwischen BSE und dieser neuen Variante werden im Kap. 1.1.2 genauer beschrieben. In der postmortalen neuropathologischen Untersuchung weisen Hirne von vCJD-Patienten neben den typischen histologischen Veränderungen der TSE floride Plaques auf, die von spongiformen Vakuolen umgeben sind (Will et al., 1996). Diese Plaques und auch die zerebelläre Ataxie von vCJD erinnern an frühere Befunde von Kuru, einer anderen humanen TSE, die heute mehr von historischem Interesse ist. Kuru wurde nur auf Papua-Neuguinea bei dem Stamm der Fore gefunden (Gajdusek and Zigas, 1957). Dort wurde diese Erkrankung durch den Verzehr von Gehirngewebe Verstorbener verbreitet. Gajdusek belegte die Übertragbarkeit durch experimentelle Infektion von Schimpansen (Gajdusek et al., 1966). Nach Verbot des

rituellen Kannibalismus in den fünfziger Jahren nahm die Zahl der Neuerkrankungen stetig ab.

Sowohl das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) als auch die tödliche familiäre Schlaflosigkeit (FFI) sind humane TSE, die autosomal dominant vererbt werden. Ihnen liegen Mutationen im Prionproteingen zugrunde.

Das seltene GSS, das nach seinen Erstbeschreibern benannt wurde (Gerstmann et al., 1936), manifestiert sich klinisch als chronische zerebelläre Ataxie. Erkrankungen treten meist im Alter zwischen 20 und 40 Jahren auf und verlaufen durchschnittlich über fünf Jahre. Dementielle Symptome stellen sich erst sehr spät im Verlauf ein. An FFI erkrankte Patienten leiden unter nicht auf Medikamente ansprechenden Schlafstörungen, Gedächtnisstörungen und Störungen des autonomen Nervensystems. Die Krankheit verläuft durchschnittlich zwei bis drei Jahre und zeigt erst spät zerebelläre Ataxie und Myoklonien (Manetto et al., 1992).

1.1.2 BSE und die neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

Erste Verdachtsfälle von BSE wurden bereits 1985 berichtet und 1986 histopathologisch bestätigt (Wells et al., 1987). Seitdem ist die Zahl der in Europa dokumentierten BSE-Fälle bis März 2005 auf ca. 185.000 angestiegen, wobei fast 99% der Erkrankungen in Großbritannien auftraten. Epidemiologische Daten lassen annehmen, dass das Auftreten der Rinderseuche auf die Verfütterung von kontaminiertem Tiermehl aus infektiösen Rinderkadavern bzw. Schlachtabfällen von Schafen zurückzuführen ist. Seit 1988 ist es in England verboten, Tiermehle an Wiederkäuer zu verfüttern und seit 1996 besteht dieses Verbot für sämtliche Nutztiere. Seit 1993 nimmt die Zahl der Neuinfektionen in England stark ab. Da die Inkubationszeit bei 4 bis 5 Jahren liegt, kann auch zukünftig von sinkenden Fallzahlen ausgegangen werden.

Im Mai 1990 wurde in Großbritannien ein systematisches Überwachungsprogramm für CJD-Fälle eingerichtet, um mögliche Auswirkungen der BSE-Epidemie auf den Menschen zu erfassen. Im März 1996 - ungefähr 10 Jahre nach Ausbruch der Rinderseuche - wurde erstmals eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) bei 10 erkrankten Briten und einem Patienten in Frankreich beschrieben (Chazot et al., 1996; Will et al., 1996).

Der Verdacht, dass vCJD auf den Verzehr von BSE-infizierten Rinderschlachtprodukten zurückzuführen ist, wurde experimentell durch die Übertragung von BSE auf Makaken erhärtet (Lasmézas et al., 1996). Einen weiteren Hinweis bot das vergleichbare

Glykosylierungsmuster der pathogenen Form des Prionproteins bei den beiden Krankheiten (Collinge et al., 1996b) Seitdem verschiedene TSE-Stämme wie BSE, vCJD und die klassische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit auf Mausstämme bzw. transgene Mäuse übertragen wurden und die stammspezifischen Inkubationszeiten und histopathologischen Befunde verglichen wurden, gilt es als sehr wahrscheinlich, dass BSE und vCJD durch denselben Erreger verursacht werden (Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997; Scott et al., 1999).

Neben dem Menschen wurden auch bei zahlreichen Tieren wie Hauskatzen und diversen Zootieren spongiforme Enzephalopathien nach Infektion mit dem BSE-Erreger beobachtet (Jeffrey and Wells, 1988), (Kirkwood et al., 1990), (Wyatt et al., 1991).

1.2 Erreger der Prionkrankheiten und Prionhypothese

Zur Natur des Krankheitserregers wurden in der Vergangenheit verschiedene Hypothesen aufgestellt. Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich bei den spongiformen Enzephalopathien um "slow virus diseases" handeln würde. Doch trotz intensiver Suche konnte keine pathogene Nukleinsäure gefunden werden. Der Erreger erwies sich als ungewöhnlich resistent gegen UV- und ionisierende Strahlung, hohe Temperaturen und Chemikalien, so dass schon in den sechziger Jahren andere Erregerformen angenommen wurden (Alper et al., 1967; Alper et al., 1967; Griffith, 1967).

Prusiner führte 1982 die Bezeichnung "Prion" als Abkürzung für "proteinaceous infectious particle" ein, um das infektiöse Agens von herkömmlichen Krankheitserregern wie Bakterien und Viren zu unterscheiden (Prusiner, 1982). Die von ihm aufgestellte Prionhypothese postuliert, dass dieses Prion lediglich aus Proteinen besteht. Nach dieser Hypothese setzt das Prion seine Replikation selbst ohne Vorhandensein von Nukleinsäuren fort, indem es als pathologische infektiöse Isoform eines physiologischen Proteins mit letzterem interagiert. Diese Interaktion soll zur posttranslationalen Umfaltung des physiologischen Prion Proteins PrP^C in die pathologische Form PrP^{Sc} führen und damit letztlich zur Akkumulation der infektiösen Form.

In mit SDS versetzten Hirnhomogenaten von Scrapie-infizierten Tieren ließen sich elektronenmikroskopisch makromolekulare Strukturen nachweisen, die als Scrapie-assoziierte Fibrillen (SAF) oder "prion-rods" bezeichnet wurden (Merz et al., 1981; Prusiner et al., 1983). Untersuchungen dieser infektiösen Ablagerungen führten zur Entdeckung eines Protease-resistenten Proteins von 27 bis 30 kD, das als PrPres oder

PrP 27-30 bezeichnet wurde (Bolton et al., 1982; Bolton et al., 1984). Antikörper gegen PrP 27-30 erwiesen sich auch als immunreaktiv gegen Amyloid-Plaques in Hirnen von CJD-Patienten und Scrapie-infizierten Tieren (Bendheim et al., 1984); (Kitamoto et al., 1986).

Auf der Suche nach einer für PrP 27-30 kodierenden Nukleinsäure stieß man überraschenderweise auf PrP-spezifische mRNA in Scrapie-infizierten und nicht infizierten Tieren (Chesebro et al., 1985; Oesch et al., 1985), die aber nicht in aufgereinigten Scrapie-Erregerpräparationen nachweisbar war. Oesch et al. konnten 1985 zeigen, dass das Prionprotein von einem in einzelner Kopie vorliegenden zellulären Gen kodiert wird. Das Produkt dieses Gens ist ein als zelluläres Prionprotein (PrP^{C}) bezeichnetes Protein von 33-35 kD, das entweder nicht glykosyliert, mono- oder diglykosyliert vorliegt (Bolton et al., 1985; Haraguchi et al., 1989). Es stellte sich heraus, dass PrP 27-30 den Protease-resistenten Kern des pathogenen Prionproteins (PrP^{Sc}) darstellt, das die gleiche Primärstruktur wie PrP^{C} aufweist (Basler et al., 1986). Da der offene Leserahmen bisher bekannter Prionproteingene auf einem Exon liegt, kann die Entstehung von PrP^{C} und PrP^{Sc} durch alternatives Prozessieren der mRNA ("Splicing") ausgeschlossen werden (Basler et al., 1986).

1.2.1 Unterschiede zwischen der zellulären (PrP^{C}) und der pathogenen (PrP^{Sc}) Form des Prionproteins

PrP^{C} und PrP^{Sc} stimmen in der Primärstruktur überein und weisen keine unterschiedlichen kovalenten Bindungen auf (Pan et al., 1993; Stahl et al., 1993). Untersuchungen wie die Fourier-Transformationsspektroskopie ergaben, dass PrP^{C} und PrP^{Sc} lediglich in ihrer Konformation differieren. Dabei besteht die Struktur von PrP^{C} zu etwa 40% aus α -helikalen Anteilen und wenigen β -Faltblattstrukturen, während dagegen PrP^{Sc} mit etwa 43% einen hohen Anteil von β -Faltblattstrukturen aufweist (Caughey et al., 1991; Pan et al., 1993; Safar et al., 1993).

Mit Hilfe der Nuklearmagnetresonanz (NMR)-Spektroskopie konnten genauere Daten zur Struktur von rekombinantem PrP^{C} gewonnen werden (Donne et al., 1997; Lopez et al., 2000; Riek et al., 1997). Die NMR Struktur von PrP^{C} weist gegenüber früheren Modellberechnungen statt vier nur drei α -Helices auf. Daneben war eine kurze doppelsträngige antiparallele β -Faltblattstruktur nachweisbar.

PrP^{C} und PrP^{Sc} unterscheiden sich in ihren biochemischen Eigenschaften wie dem Löslichkeitsverhalten und der Empfindlichkeit gegenüber Proteinase K. Im Gegensatz zu PrP^{C} weist PrP^{Sc} eine verminderte Löslichkeit in Lösungen, die Detergenzien enthalten,

auf und neigt zur Aggregation in Form von Amyloidfibrillen (Merz et al., 1981; Prusiner et al., 1983). Die Behandlung mit Proteinase K (PK) führt zur vollständigen Proteolyse von PrP^C. Dagegen erweist sich PrP^{Sc} als teilweise resistent gegen diese unspezifische Endopeptidase. Ein Kernfragment von etwa 141 Aminosäuren kann nach dem PK-Verdau von PrP^{Sc} im Western Blot als 27-30 kD großes Protein mit PrP-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Bolton et al., 1982; Bolton et al., 1984).

1.2.2 Biosynthese von PrP^{Sc}

Das Zellkompartiment, in dem die Umfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc} stattfindet, wird kontrovers diskutiert. Es gibt Hinweise, dass sie entweder in einem späten endosomalen Kompartiment oder in den Lysosomen abläuft (Arnold et al., 1995; Laszlo et al., 1992; Taraboulos et al., 1992). Andere Arbeiten deuten auf eine Umfaltung an der Zelloberfläche oder entlang des Weges von der Zellmembran zu den Lysosomen hin (Borchelt et al., 1992; Caughey and Raymond, 1993; Caughey, 1993). Das neu gebildete PrP^{Sc} akkumuliert in den späten Endosomen oder sekundären Lysosomen und zeigt, sofern überhaupt nachweisbar, nur einen sehr langsamen Katabolismus (Caughey, 1993; Caughey and Chesebro, 1997; Weissmann, 1996).

Zwei Modelle zur Bildung von PrP^{Sc} werden diskutiert. Beide Modelle wurden in einer kinetischen Analyse anhand biophysikalischer Kriterien als gleich wahrscheinlich angesehen (Eigen, 1996)

1. Das "refolding"-Modell nach Prusiner beruht auf der Annahme, dass PrP^C unter dem Einfluß von PrP^{Sc} zunächst entfaltet und dann neu zu PrP^{Sc} gefaltet wird. Die für diesen Umfaltungsprozess benötigte Aktivierungsenergie wird dabei durch die Katalyse von PrP^{Sc} bereitgestellt (Prusiner, 1991).
2. Das "nucleation"- oder "seeding"-Modell nach Lansbury nimmt an, dass sich PrP^C in einem Gleichgewichtszustand mit PrP^{Sc} bzw. einem PrP^{Sc}-Vorläufer befindet, wobei das Gleichgewicht mehr auf der Seite des stabileren PrP^C liegt. Wenn ein PrP^{Sc}-Aggregat ("seed") vorliegt, verschiebt sich das Gleichgewicht zunehmend zugunsten von PrP^{Sc}, das dann stabilisiert wird und sich an das PrP^{Sc}-Aggregat anlagert. Das Aggregat erfährt dadurch eine fortlaufende Polymerisierung. Die initiale Aggregatbildung wird als kinetisch kontrollierter, extrem langsam ablaufender Prozess angesehen. Nach der Entstehung des Aggregats kommt es allerdings zur schnellen Addition von PrP^C und Vervielfältigung des pathogenen Agens (Come et al., 1993).

1.2.3 Synthese von PrP^{Sc} in vitro

Es gibt derzeit drei methodische Grundtypen PrP^C zu PrP^{Sc} bzw. PrPres umzuwandeln. Die *Cell-free Conversion technique* verwendet aufgereinigte radioaktiv markierte rPrP^C Moleküle aus Zellkultur welche mit aufgereinigtem PrP^{Sc} eine Vermehrung von PrPres erreichen (Kocisko et al., 1994; Bessen et al., 1995). Mit diesen Versuchen konnten erstmals wichtige Eigenschaften zur Entstehung von PrPres erforscht werden. Die Speciesbarriere zwischen unterschiedlichen Prionstämmen und Tieren konnte unter anderem auf die Interaktion von PrP^C und PrP^{Sc} und die Unterschiede an den Resten der Aminosäuren 139, 155 und 170 zurückgeführt werden (Kocisko et al., 1995). Erste Therapieversuche mit der *Cell-free conversion technique* zeigten, dass Congo Rot-Analoga oder Curcumin die Konversion zu PrPres inhibieren (Demaimay et al., 2000; Caughey et al., 2003). Infektionsversuche mit dem entstandenen PrPres konnte mit der Methode leider nicht durchgeführt, da die Konversion nur sehr ineffizient war und man PrP^{Sc} in einem Überschuss von 50:1 zu dem Reaktionsansatz hinzugeben musste.

2001 gelang die effektive in vitro Konversion von PrP^C zu Protease-resistentem PrP^{Sc} mit der *Protein Misfolding Cyclic Amplifikation* (PMCA) (Saborio et al., 2001) mit einer nur 1:100 Konzentration von PrP^{Sc} im Reaktionsansatz. Bei der PMCA werden Hirnhomogenate von terminalen 263K Hamstern mit Hirnhomogenaten gesunder Tiere vermischt und nach Inkubations- und Sonifikationsschritten eine Vermehrung des Proteinaseresistenten PrPres gemessen. Man erklärt sich den Amplifikationsprozess durch ein Wachstum der PrP^{Sc} Rods während des Inkubationsschrittes und einer Fragmentierung der konvertierenden Einheiten während der Ultraschallapplikation, mit dem Ergebnis mehr Seeds zu haben welche den Umfaltungprozess katalysieren. Mit dieser zyklischen Amplifikation des mißgefalteten Proteins konnten 97% des eingesetzten zellulären Prionproteins zu Protease-resistentem PrP (=PrPres) umgefaltet werden. Erst kürzlich wurde mit dieser Methode eine frühe Diagnose von Prionkrankheiten ermöglicht, da auch geringste Mengen von PrP^{Sc} im Blut von an TSE erkrankten Lebewesen nachweisbar sind (Castilla et al., 2005b). Für die Konversion scheinen Faktoren aus dem Hirnhomogenat wie RNA (Deleault et al., 2003), Membranen (Nishina et al., 2004) oder ein unbekanntes Protein X (Telling et al., 1995) vonnöten zu sein. Eine Modifikation der PMCA zeigte, dass eine Amplifikation auch ohne (Lucassen et al., 2003) Sonifikationsschritt erfolgen kann. Die Sonifizierung scheint jedoch wichtig zu sein, um autokatalytische PrPres Rods zu erzeugen (Piening et al., 2005).

In einer kürzlich erschienenen Arbeit gelang es den Autoren mit Hilfe von rekombinantem

Prionprotein infektiöses PrP^{Sc} zu erzeugen. In *Escherichia coli* erzeugtes rekombinantes Maus Prionprotein (recMoPrP) wurde polymerisiert so dass amyloidfibrillen entstanden (Baskakov et al., 2002). Die Fibrillen aus recMoPrP(89-230) wurden intracerebral in Tg(MoPrP,[?]23-88)9949/*Prnp*^{0/0} Mäuse (=Tg9949 Mäuse) inokuliert. Die inokulierten Mäuse zeigten nach 380-660 Tagen neurologische Funktionsstörungen. In den Gehirnextrakten der Mäuse konnte mittels Western Blot proteaseresistentes PrP nachgewiesen werden. Dieselben Extrakte wurden in Wildtyp FVB Mäuse und Tg Mäuse, die PrP überexprimieren, inokuliert. Diese zeigten daraufhin nach Inkubationszeiten von 150 und 90 Tagen eine Übertragung der Prionkrankheit. Neurohistologisch zeigten sich Vakuolen, reaktive astrozytäre Gliose sowie akkumuliertes PrP^{Sc} (Legname et al., 2004). Es konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass für die Pathogenese der Prionkrankheit PrP^C als Substrat ausreicht und kein exogenes Agens für die Entstehung von Prionen verantwortlich ist.

1.2.4 Therapieansätze

Bisher gibt es keine wirksame Therapie für Prionkrankheiten. Folgende Substanzen, die an PrP^{Sc} binden, zeigten in Tiermodellen limitierte Effekte: Kongorot (Ingrosso et al., 1995), Amphotericin B (Pocchiari et al., 1987), Anthrazyklin (Tagliavini et al., 1997), Tetracyclin (Tagliavini et al., 2000), Dextransulfat, Pentosanpolysulfat und andere Polyanionen (Ehlers and Diringler, 1984); (Farquhar CF and Dickinson AG., 1986; Kimberlin and Walker, 1986), β -Faltblatt brechende Peptide (Soto et al., 2000) und CpG-Oligonucleotide (Sethi S. et al., 2002). Leider sind viele diese Substanzen nur therapeutisch wirksam, wenn sie vor Erstmanifestation klinischer Symptome gegeben werden. Weiterhin ist eine Behandlung mit einigen dieser potentiell therapeutischen Mittel aufgrund ihrer toxischen Wirkung oder schlechten Bioverfügbarkeit nicht praktikabel.

Mit Hilfe des "Scanning for intensely fluorescent targets" (SIFT) assay konnte die Aggregation von PrP^C und PrP^{Sc} gemessen werden, was ein zentraler Schritt der Prionreplikation ist. Das Testverfahren beruht auf einem Meßaufbau zur konfokalen Zweifarben-Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie. Dieser Messaufbau ermöglicht nach Anregung mit einem in ein kleines Messvolumen gebündelten Laserstrahl den Nachweis einzelner mit Fluoreszenzfarbstoffen markierter Moleküle, die je nach Aggregationszustand spezifische Antikörpersonden tragen. Die einzelnen markierten Partikel können dann hochempfindlich mittels eines wie ein Suchscheinwerfer durch die Probe geführten Laserstrahls aufgespürt werden.

Beim Screening von 10.000 Substanzen konnten 6 Komponenten identifiziert werden, die

sowohl in der SIFT Messung die PrP-Interaktion als auch in Zellkultur eine Prionpropagation inhibierten. Alle diese Komponenten weisen eine N'-benzylidenebenzohydrazide Kernstruktur auf (Bertsch et al., 2005).

1.3 Zelluläres Prionprotein (PrP^C)

1.3.1 Expression und Funktion von PrP^C

PrP^C ist ein Glykoprotein, das auf der Oberfläche vieler Zellen zu finden ist. Vor allem wird es im ZNS in Neuronen (Kretzschmar et al., 1986), aber auch in Astrozyten und Oligodendrozyten exprimiert (Moser et al., 1995). PrP^C ist auch in peripheren Geweben und Leukozyten nachweisbar (Dodelet and Cashman, 1998; Manson et al., 1992b; Manson et al., 1992a). Während der Embryogenese von Mäusen und Hühnern kann die mRNA des Prionproteins zuerst in Gehirnen detektiert werden (Harris et al., 1993; Manson et al., 1992a).

Die Funktion von PrP^C ist noch nicht endgültig geklärt. Zum Teil widersprüchliche Arbeiten erschweren es, die Funktion von PrP^C zu beschreiben. PrP^C findet sich auf neuronalen Oberflächen (Madore et al., 1999) und in präsynaptischen Nervenenden (Fournier et al., 1995; Sales et al., 1998; Herms et al., 1999). Weiterhin findet man PrP^C auch in synaptischen Vesikeln, so dass postuliert wurde, dass sich PrP^C von Zelloberfläche zu Vesikeln bewegt und eine Signalfunktion ausübt (Spielhauer and Schatzl, 2001).

Transgene Mäuse, deren Prionproteingene (Prnp) inaktiviert wurde, zeigten eine normale Entwicklung ohne gravierende Verhaltensstörungen oder anatomische Auffälligkeiten (Büeler et al., 1992; Manson et al., 1994). Einige Autoren beschrieben allerdings phänotypische Auffälligkeiten bei diesen sogenannten "Knockout"-Mäusen (Prnp^{0/0}-Mäusen). Collinge et al. fanden elektrophysiologische Veränderungen (Collinge et al., 1994), die in anderen Arbeiten nicht bestätigt werden konnten (Herms et al., 1995; Lledo et al., 1996). Neuere Arbeiten deuten darauf hin, dass Prnp^{0/0}-Mäuse eine Verringerung der Calcium-aktivierten Kaliumströme zeigen und damit einen veränderten intrazellulären Calciumhaushalt aufweisen (Herms et al., 2001). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass PrP^C nicht für die meisten normalen synaptischen Funktionen essentiell ist (Lasmezas, 2003), sondern eine Rolle als Feineinstellung von neuronalen Zellen ausübt. Hinweisend darauf sind die Erkenntnisse, dass an Prnp^{0/0}-Mäusen ein veränderter Tag-Nacht-Rhythmus gefunden wurde (Tobler et al., 1996) und bestimmte Prnp -Mausstämme eine Veränderung im Langzeitgedächtnis (Nishida et al., 1997), motorische Auffälligkeiten und einen Verlust an Purkinjezellen (Moore et al., 1999; Sakaguchi et al., 1996) zeigten.

1.3.2 PrP und der Einfluss von Metallen

PrP^C bindet Kupferionen mittels seiner N-terminal gelegenen Repeat-Region (Aronoff-Spencer et al., 2000; Brown et al., 1997a; Hornshaw et al., 1995; Hornshaw et al., 1995; Kramer et al., 2001). Darüberhinaus konnten weitere Kupferbindende Histidine in der zentralen Region des Prionproteins (Aminosäurepositionen 96 und 111) nachgewiesen werden (Hasnain SS, 2001). Gehirne von Prnp^{0/0}-Mäusen zeigten einen verminderten Gehalt von membrangebundenen Kupfer und eine verminderte Aktivität des Enzyms Superoxiddismutase (SOD) (Brown et al., 1997a; Brown et al., 1997b) und eine erhöhte Aktivität von SOD1 und vermehrte Kupfermenge in Gehirnen von Mäusen die PrPC53 überexprimieren (Brown and Besinger, 1998). Andere Arbeiten hingegen konnten keine Unterschiede an Kupfergehalt in Zellulären Fraktion von Gehirnen von PrP^{0/0}, Wildtyp oder PrP^C überexprimierenden Mäusen messen und auch keinen Zusammenhang zwischen PrP^C expression und SOD Aktivität messen (Waggoner et al., 2000).

In Untersuchungen schützte PrP^C Zellen gegen oxidativen Streß in Abhängigkeit der Anzahl gebundener Kupferionen, so dass eine antioxidative Funktion des Prionproteins angenommen werden kann (Brown et al., 1997b). Es wurde beobachtet, dass der höchste Gehalt an PrP^C in den synaptosomalen Fraktionen in Hirnlysaten zu finden ist (Herms et al., 1999). Synaptosomale Fraktionen von Prnp^{0/0}-Mäusen weisen eine nur halb so hohe Kupfer-Konzentration wie normale Mäuse auf. Kupfer induziert in Zellkultur eine Endozytose von PrP^C (Pauly and Harris, 1998). Es lässt sich annehmen, dass PrP^C an der Regulation der Kupferkonzentration an der Synapse und an der synaptischen Übertragung beteiligt ist (Kretzschmar et al., 2000). Man könnte die Hypothese aufstellen, dass PrP^C als Carrier für den Transport von Kupferionen über die Zellmembran fungiert und freies Kupfer puffert, bis es an andere Kupferbindende Proteine abgegeben wird. Somit wäre es auch zu erklären warum der Gesamtkupfergehalt in Gehirnen von PrP^{0/0} Mäusen nicht verringert ist, da Prion Proteine die Verteilung beeinflussen und nicht die Speicherung (Vassallo and Herms, 2003). Zusammengefasst wird argumentiert, dass das Vorkommen von PrP^C im synaptischen Spalt dem Protein erlaubt, Kupfer im Präsynaptischen Cytosol zu halten und gleichzeitig toxische Kupferionen im Synaptischen Spalt puffert, z.B. während verstärkter synaptischer Aktivität (Vassallo and Herms, 2003).

Kupferionen haben bei Rückfaltungsversuchen von PrP^C zu PrP^{Sc} einen förderlichen Effekt auf die Regenerierung von Infektiösität und PK-Resistenz gezeigt (McKenzie et al., 1998). Dies konnte zum Teil auch in anderen Arbeiten bestätigt werden, wo die Umfaltung, PK-Resistenz und Aggregation von rekombinantem PrP durch Kupfer induziert

werden konnte (Qin et al., 2000; Stöckel et al., 1998). Weiterhin wurde gezeigt, dass der Austausch von Kupfer mit Mangan eine Erhöhung der Pk-Resistenz bewirkt (Brown et al., 2000). Eine weitere Studie zeigte, dass der Kupfergehalt in Gehirnen von CJD Patienten um bis zu 50% abgenommen hat, wohingegen der Gehalt an Manganionen um den 10fachen Wert zunahm (Wong et al., 2001). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass sehr hohe Konzentrationen von divalenten Metallionen (mM) die Umfaltung von PrP^C in Hirnhomogenaten in einer PMCA ähnlichen Reaktion zu teilweise protease resistentem PrP ermöglichen (Kim et al., 2005).

1.4 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, Prionen in vitro zu amplifizieren, quantitativ reproduzierbar zu erfassen und den Einfluss von Kationen auf die Amplifikationseffizienz zu untersuchen.

Der Ausgangspunkt der Arbeit beruhte auf der PMCA Methode welche 2001 publiziert wurde (Saborio et al., 2001). Zu dieser Methode gab es außer dieser Publikation keine weiteren Informationen. Die Methode musste am Labor etabliert werden und dann genauer charakterisiert werden, um die optimalen Bedingungen von Inkubation und Sonifikationsschritten herauszufinden. Weiterhin sollte der Einfluss des PK-Verdau auf das Amplifikationsprodukt PrPres untersucht werden.

Nachdem die Methode etabliert war, sollten erste Konversionsversuche mit unterschiedlichen Substraten erfolgen, um Faktoren herauszufinden, die die Umfaltung beeinflussen. Zuerst sollte untersucht werden ob eine Amplifikation von PrP^{Sc} in PrP^{0/0} Homogenat möglich sei, um somit den Beweis zu führen, dass PrPres aus PrP^C entsteht. Des Weiteren sollte versucht werden, PrPres aus rPrP herzustellen. Von besonderem Interesse wäre die Umwandlung von markiertem rPrP* zu PrPres*, da man mit markiertem PrPres* neue Möglichkeiten zur Charakterisierung von PrPres sowohl in vitro als auch in vivo hätte.

Eine Mögliche Funktion des Prion Proteins im Kupferhaushalt und die unterschiedliche PK-Resistenz in Abhängigkeit von jeweiliger Metallionenbindung ist in Kapitel 1.3.2 beschrieben worden. Es sollte nun mit der PMCA Methode untersucht werden, welchen Einfluss Metallionen wie Kupfer, Mangan, Zink oder Nickel auf die in vitro Konversion von PrP^C zu PrPres während der PMCA haben.

Für therapeutische und diagnostische Screening Studien war die publizierte PMCA Methode leider nicht geeignet, so dass eine weitere Aufgabenstellung war, die PMCA Reaktion zu automatisieren. Eine Automatisierung hätte den Vorteil, dass mit geringerer Fehleranfälligkeit im selben Zeitraum mehr Proben untersucht und ausgewertet werden können. Neben der Automatisierung der Amplifikation sollte auch die Quantifizierung von PrPres für High Through Put Screenings automatisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid 30%	Bio Rad	161-0158
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Merck	1.012.010.100
Biotinylation Kit	SIGMA	B-TAG
BSA pH 7	SIGMA	A 2153
Carbonate Bicarbonate Puffer	SIGMA	C 3041
CuCl ₂ *2H ₂ O	SIGMA	C-6641
ECL-Kit	Amersham	RPN 2209
EDTA	SIGMA	ED4SS
Glycin	SIGMA	G 7126
Guanidine hydrochloride	SIGMA	G3272
I-Block	Tropix	AI300
Methanol	Roth	8388.2
Mini-Complete	Roche	1 836 153
Mini-Complete EDTA-free	Roche	1 836 170
MnCl ₂ *4H ₂ O	Merck	5927
Na ₂ HPO ₄	SIGMA	S 0876
NaH ₂ PO ₄	SIGMA	S 0751
NiCl ₂ *6 H ₂ O	Merck	6717
NP40		
OPD peroxidase substrate FAST	SIGMA	P9187
PBS	SIGMA	P 3813
PBS-Tween	SIGMA	P 3563
PMSF	SIGMA	P 7626
Prestained SDS Standard	Bio Rad	161-0318
Proteinase-K (PK)	Merck	1.245.680.100
rPrP	Prionics	LOT 990202 1mg/ml
rPrP	U. Bertsch	MaPrP152 0,255mg/ml
SDS	SIGMA	L4509
TEMED	SIGMA	T 9281
Tris	SIGMA	T-6066

Triton-X-100		
Tween 20	Fluka	93773
ZiCl ₂	Merck	8816

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primärantikörper

3F4 ist ein monoklonaler Antikörper aus Aszitesflüssigkeit von Mäusen, die mit Hamster PrP^{Sc} immunisiert worden sind und erkennt AS 109-112 von PrP in den Spezies Mensch und Hamster, aber nicht von Mäusen (Kascsak et al., 1987b). 3F4 wurde uns freundlicherweise von M.Beekes, RKI, Berlin zur Verfügung gestellt. 3F4 wurde bei Western Blot Versuchen 1:2000 verdünnt in I-Block eingesetzt und bei Präparation der ELISA Platte 500ng/100µl Carbonat Bicarbonat Puffer.

Bei 12F10 handelt sich um einen monoklonalen Maus Antikörper, hergestellt in PrP^{0/0} Mäusen. Er ist gegen die AS 142-160 gerichtet und erkennt humanes PrP, jedoch kein Hamster PrP (Krasemann et al., 1996). 12F10 wurde 1:1000 verdünnt in I-Block eingesetzt.

SAF53 ist ein IgG2a Antikörper. Bei der Herstellung wurden Scrapie assoziierte Fibrillen (SAF) aus 263K Hamstern aufgereinigt, um die Mäuse zu immunisieren. Das Erkennungsepitop ist nicht bekannt, jedoch unterscheidet es sich nachweislich von dem 3F4 Epitop da im ELISA beide Antikörper gleichzeitig an das PrP binden können (siehe Kap 2.2.7). SAF53 wurde 1:500 in Waschpuffer eingesetzt. 12F10 sowie SAF 53 wurden uns freundlicherweise von J.Grassi von der CEA, Frankreich zur Verfügung gestellt.

2.1.2.2 Sekundärantikörper

Für Western Blot Detektion wurde als Sekundärantikörper ein mit Meerrettich Peroxidase (Horse Radish Peroxidase = HRP) gekoppelter Anti-Maus Antikörper der Firma Amersham (NA 931 V) verwendet. Für die ELISA Versuche wurde der mit Biotin gekoppelte Primantikörper SAF53 vom Extravidin Peroxidase Conjugate der Firma SIGMA (E2886) erkannt, der wiederum mit HRP gekoppelt war.

2.1.3 Hirngewebe

2.1.3.1 Syrian Hamster

Die Syrian Hamster wurden von Charles River Laboratories erworben. Es handelte sich dabei um weibliche Tiere im Alter von 112-140 Tagen, LAK:LVG(SYR).

2.1.3.2 263K Hamster

Syrian Hamster von Charles River (siehe oben) wurden in der Arbeitsgruppe von M.Beeke, RKI Berlin intracerebral mit dem Scrapie Strain 263K inokuliert und im terminalen Stadium der Krankheit terminiert.

2.1.3.3 Prnp^{0/0}

Die Prionprotein-Knockout Mäuse (Prnp^{0/0}) wurden von Büeler et al., durch Unterbrechung eines der Prnp-Allele der murinen embryonalen Stammzelle mittels homologer Rekombination, Injektion der Stammzellen in Blastocyten und Kreuzung der so erzeugten Chimären generiert. Die Prnp^{0/0}-Mäuse exprimieren keine detektierbare Menge Prionprotein. Sie lassen sich nicht mit Scrapie infizieren (Büeler et al., 1992).

2.1.4 Geräte, Materialien

Automatisches ELISA Mikroplattenwaschgerät	BIO-TEK	ELX50/12V
Dot-Blot Apparatur	Bio-Rad	BioDot 170-6545
Elektrophorese Kammer	Bio Rad	Mini Protean 3 cell
Gel Blotting Paper	Schleicher Schuell	GB 005
Hofer Semiphor Western Blot Apparatur	Amersham	80-6211-86
Microplate READER	BIO-TEK	EL800UV-PC
Microplate Sonicator	Misonix	SONICATOR [®] 3000
Mikrofilter Device	Millipore	CENTRICON [®] Model 10 YM- 10,000
Mini Dialysis Kit	Amersham	80-6484-32
Nitrocellulose Membran 0,45 µm	Bio-Rad	162-0115
PH Elektrode	InLab	423
PVDF-Membran	Millipore	IPVH 00010

Schüttler	Fröbel Labortechnik	Typ Rocky GR
Stabsonicator	Bandelin	Sonopuls 2070
Taktgeber	Siemens	Typ 3RP1555-1AP30
Umwälzthermostat	Julabo	HD-4
Wasserbadsonicator	Bandelin	SONOREX RK 52H

2.1.5 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

10 x Laufpuffer	0,25M Tris pH 8,3 1,92M Glycin 1% SDS
10 x Proteinase-K	10mg auf 1ml H ₂ O
10% APS	500mg auf 5 ml H ₂ O
5x LSB (Laemmli Puffer)	10% (w/v) SDS 40% (w/v) Saccharose 1mM EDTA 50mM Tris-HCl 20% (v/v) Mercaptoethanol 0,001% (w/v) Bromphenolblau
Blotpuffer	70% H ₂ O 10% 10x Laufpuffer 20% Methanol 100%
ECL-Lösung	4ml schwarz + 4 ml weiss
I-Block	500ml PBS 2,5ml 20% Tween 20 1g I-Block
NaPi 0,5M pH 7,4	Na ₂ HPO ₄ + NaH ₂ PO ₄
PBS	SIGMA P3813 1 Beutel auf 1l H ₂ O
PBS, BSA 5%	20ml PBS 1g BSA
PBS-Tween 0,05%	SIGMA P3563 1 Beutel auf 1l H ₂ O
PBS-Tween 0,05%, BSA 0,5%	SIGMA P3563 1 Beutel auf 1l H ₂ O 2,5g BSA
PBS-Tween 0,1%	500ml PBS + 2,5ml 20% Tween 20

PMSF 250mM	0,174g auf 2ml Ethanol
Sammelgelpuffer	1M Tris pH 6,8
Trenngelpuffer	2M Tris pH 8,8
Waschpuffer	PBS-Tween 0,05%, BSA 0,5%
Mini Complete	1 Tab auf 0,4ml ddH ₂ O
Mini Complete EDTA free	1 Tab auf 0,4ml ddH ₂ O
NaPi	NaPi 10mM, NP40 0,1%

Tris Puffer wurden mit HCl auf den gewünschten pH-Wert eingestellt.

NaPi-Puffer wurden durch Titrieren der Base und Säure eingestellt.

2.2 Methoden

2.2.1 10% PMCA-Homogenat

Gehirne von Syrian Hamstern, Scrapie infizierten Hamstern (263K) und PrP^{0/0}-Mäusen wurden sofort nach Entnahme bei -80°C eingefroren. Bei Bedarf wurde ein Hirn mit dem neunfachen Eigengewicht 1 x PBS versetzt und homogenisiert, so dass ein 10%iges Hirnhomogenat entstand. Das Homogenat wurde mit Triton-X 100 (EK 0,5%, v/v) und SDS (EK 0,05% w/v) versetzt, anschließend auf 1,5 ml Probengefäße verteilt und dann für 1min bei 1000g (3600UpM) in einer Eppendorf Zentrifuge 5415 zentrifugiert. Die Überstände wurden gepoolt und mit Mini Complete Protease Inhibitor (mit/ohne EDTA, je nach Bedarf) 1:25 versetzt. Proben, die zur Untersuchung des Einflusses von Metallionen dienten, wurden mit EDTA freiem Mini Complete Protease Inhibitor versetzt.

Das nun fertige PMCA Homogenat wurde bis zur weiteren Verwendung in Aliquots mit jeweils 1 ml bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2 Stabsonicator PMCA

Die Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) wie von Saborio et. al beschrieben, ist eine Kombination von Beschallung und Inkubation von Hirnhomogenaten, um PK-Resistentes PrP in Anwesenheit von PrP^C zu amplifizieren. (Abbildung 1)

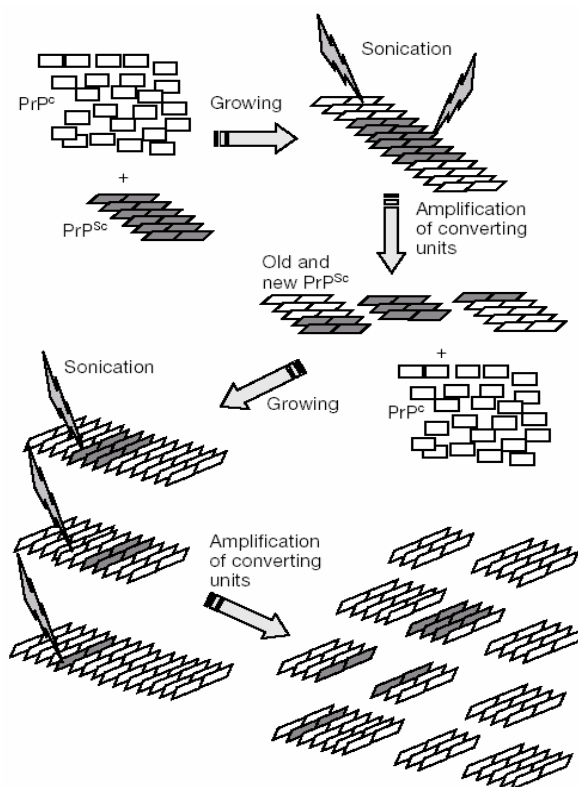


Abbildung 1: Schematische Darstellung der PMCA Reaktion.

Die Amplifikation ist zurückzuführen auf sich wiederholende Zyklen von Inkubation und Sonifikation von PrP^{Sc} in Anwesenheit von PrP^C. Während der Inkubation lagert sich das PrP^C an das PrP^{Sc} Aggregat an und wandelt sich zu PrP^{Sc} um, wohingegen bei der Sonifikation die Aggregate zerkleinert werden und somit neu umwandelnde Einheiten erzeugt werden. (Abbildung nach Saborio et.al 2001)

10%iges PMCA -Wildtyp Hamsterhirnhomogenat (Wt-HM) wurde mit 1:100 10%igem PMCA 263K-Homogenat (263K) versetzt. Alle 60 Minuten wurde nun ein Ansatz von 150µl (z.B. Wt-HM + 1:100 263K) für 5 x 1 Sekunde mit dem Stabsonicator Sonopuls beschallt. Die Sonotrode wurde dabei direkt in den Reaktionsansatz gehalten, um eine optimale Leistungsübertragung zu erreichen. Es wurde darauf geachtet, dass bei unterschiedlichen Proben keine Kreuzkontamination durch den Stab entstand. Verdünnungsreihen wurden in aufsteigender Reihenfolge sonifiziert und bei verschiedenen Ansätzen wurde der Stab dazwischen mit einem mit ddH₂O benetzten Papierhandtuch gereinigt. Erst am Ende des Versuchstages wurde der Stab mit NaOH 2M gereinigt, um während des Versuchs eine Degradation von PrP^C und PrPres durch Rest NaOH zu vermeiden.

Soweit nicht anders beschrieben wurde der Zyklus achtmal wiederholt. Anschließend wurden von jedem Ansatz 20µl für die Western Blot Analyse abgenommen und die Proben und Aliquots wurden bei -80°C eingefroren.

2.2.3 Proteinase K-Verdau

Durch Behandlung von Hirnhomogenaten mit Proteinase-K (1h/37°C, 100µg/ml EK) wird das physiologische PrP^C vollständig abgebaut und ist im Westernblot nicht mehr detektierbar. Das Proteinase-K resistente PrP^{Sc} wird von der Proteinase K zu einem 27-30kD großen Fragment (PrP 27-30, PrPres), das noch so infektiös wie PrP^{Sc} ist, abgebaut (Bolton et. al 1982, Meyer RK et al. 1986).

2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).

Das Gel bestand aus 1,2 ml Sammelgel und 8 ml Trenngel, welches einen 12,5% Acrylamid Anteil enthielt. Es wurden BioRad Minigele verwendet.

Gelzusammensetzung für 2 Gele der SDS-PAGE:

<u>2 x Trenngel 12,5 %</u>		<u>2 x Sammelgel 5 %</u>	
6,78 ml	H ₂ O	5,5 ml	H ₂ O
3,42 ml	2 M Tris pH 8,8 (0,38M Ek)	1,0 ml	1 M Tris pH 6,8
7,5 ml	30% Acrylamid	1,3 ml	30% Acrylamid
180 µl	10% SDS	80 µl	10% SDS
108 µl	10% APS	64 µl	10% APS
10,8 µl	TEMED	6,4 µl	TEMED
18 ml	Summe	8 ml	Summe

APS und TEMED wurden jeweils kurz vor dem Gießen des Gels hinzugegeben, um die Polymerisierungsreaktion zu starten. Das Trenngel wurde vorsichtig mit ddH₂O überschichtet, um einen geraden Abschluss zu erzeugen. Nach ca. 30 Minuten war das Trenngel erstarrt, das Wasser wurde weggeschüttet, die mit APS und TEMED gestartete Sammelgellösung hinzugegeben und der Kamm positioniert. Nach weiteren 15 Minuten war auch dieses polymerisiert. Die Gele wurden entweder gleich verwendet oder im Kühlschrank, in feuchten Tüchern gehüllt (haltbar bis zu einer Woche), aufbewahrt.

Die Gele wurden in die Gelkammer eingebaut und mit Lauffpuffer versetzt. 20 µl PK-verdaute Proteinproben, sowie der 5 µl Marker in 15 µl ddH₂O wurden mit 5 µl 5x LSB versetzt und 5 Minuten bei 95°C im Thermoblock aufgekocht. Anschließend wurden 10 µl der denaturierten Proben in die Taschen geladen. Um keine Konzentrationsunterschiede durch Verdampfung zu erhalten, wurden die Proben nach dem Aufkochen kurz zentrifugiert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte im Sammelgel bei einer Stromspannung von 80 Volt für ca. 20 Minuten und anschließend im Trenngel bei 150 Volt für ca. 45 Minuten.

2.2.5 Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine - Western Blot

Für immunochemische Nachweise werden Proteine nach ihrer Auftrennung in Polyacrylamidgelen über Elektroelution mit Hilfe des „semi-dry“ Verfahrens (Towbin et al., 1979) auf immobilisierende PVDF Membranen übertragen.

Die PVDF Membran wurde kurz in Methanol, dann in Blotpuffer getränkt und dann auf ein in Blotpuffer getränktes Gel Blotting Filterpapier gelegt. Auf die Membran wurde dann das Gel gelegt, von dem bereits das Sammelgel abgetrennt wurde und das auch kurz das Blotpufferbad durchlaufen hatte. Es wurde darauf geachtet, dass zwischen den einzelnen Schichten keine Blasen vorhanden waren, indem die Blasen mittels eines runden Stabes zur Seite herausgerollt wurden. Auf das Gel kam dann wiederum ein nasses Filterpapier und dieses „Sandwich“ wurde dann so in die Blotting Apparatur gelegt, dass die PVDF Membran näher zur Anode zum liegen kam. Der elektrophoretische Transfer wurde in einer Hoefer Semiphor Western Blot Apparatur durchgeführt. Es konnten bis zu maximal 8 Gele gleichzeitig geblottet werden, wobei pro Gel eine Stromstärke von 40mA angelegt wurde.

Daraufhin wurde die Membran für 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in I-Block gegeben, um die unspezifischen Proteinbindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde der Primär-Antikörper 3F4 in I-Block 1:2000 verdünnt und die Membranen unter leichtem Schütteln für 1h auf dem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde 4 x 4min in IBlock gewaschen und dann für 1h in Anti-mouse-HRP Antikörper 1:2000 in IBlock leicht schüttelnd inkubiert. Nach einem 4 x 4 minütigem Waschschrift in PBS-Tween wurde die Membran für 5 Minuten in ECL Lösung inkubiert und die entstandene Chemilumineszenz für 5 Minuten mit der DIANA Digitalkamera detektiert. Das Bild des Blots wurde im *.tiff Format gespeichert und stand nun für eine quantitative Auswertung mit der AIDA Software digital zur Verfügung.

2.2.6 Auswertung der Western Blot Bilder

Um Aussagen zur Qualität der Amplifikation der PMCA machen zu können, wurde die PrPres Menge vor der PMCA Reaktion mit der PrPres Menge nach Ende der Amplifikation miteinander verglichen.

Für die Auswertung mussten die Banden quantifiziert werden. Die diglycosylierte Bande wurde als weitaus stärkste Bande zur Intensitätsmessung herangezogen. Mit Hilfe der AIDA Software (Firma Raytest) kann man die Intensität jeder einzelnen Bande bestimmen und in tabellarischer Form nach Microsoft Excel exportieren. Um nur das spezifische Proteinsignal zu messen, wurde der Hintergrund (Background) von der Bandenintensität subtrahiert (Abbildung 2A).

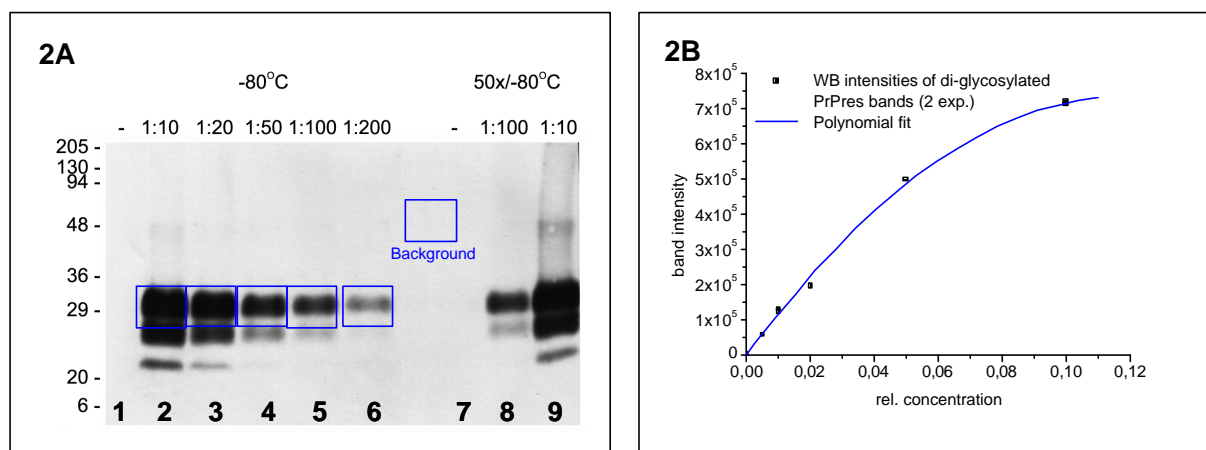


Abbildung 2: Quantifizierung der Western Blot Banden Intensitäten.

A: Spur 1-6 Verdünnungsreihe von 263K Homogenat in Wildtyp Homogenat (0, 10, 5, 2, 1, 0,5%);

Spur 7-9: 0, 1, 10% Verdünnung von 263K nach 50 x 1sec Sonifizieren und sofortigem Einfrieren.

B: Bandenintensität von den Diglycosylierten Banden aus Blot A. Im Messbereich der PMCA-Reaktion (0,01-0,02 = Bande 5,6 Abb. A) ist die Intensität direkt proportional zur eingesetzten Proteinmenge.

Die Intensität einer Bande im Western Blot ist direkt proportional zu der aufgetragenen PrPSc Menge nach PK-Verdau (Abbildung 2B). Die Intensität von der amplifizierten Bande wurde nun durch die nicht amplifizierte Bande dividiert, so dass man einen Amplifikationsfaktor erhielt, der die Reaktion charakterisierte.

2.2.6.1 Normierung von PMCA Versuchen

Bei den Versuchen zum Einfluss der Metallionen auf die Prionamplifikation mussten sehr viele Proben miteinander verglichen werden, die die maximale Kapazität von 15 Proben pro Mini Gel überstieg. Daher wurde für jedes Metallion ein eigenes Gel verwendet, wobei auf allen Gelen identische Proben als Kontrollen vertreten waren:

- keine PMCA (Probe, die sofort nach Ansetzten wieder eingefroren wurde),
- PMCA ohne Zusatz (Probe, die mit PBS versetzt wurde als Standard-PMCA),
- PMCA mit EDTA (Probe, die als Zusatz EDTA erhalten hat).

Durch Normierung der Kontrollen (siehe unten), konnten Intensitäten auf unterschiedlichen Gelen miteinander verglichen werden. Es fiel auf, dass Parallelproben manchmal unterschiedliche Bandenintensitäten lieferten, so dass alle Proben und Kontrollen als Doppelansätze auf das Gel aufgetragen wurden. Bevor unterschiedliche Gele miteinander verglichen werden konnten, mussten die Bandenintensitäten anhand der Kontrollen normiert werden (**Abbildung 3**)

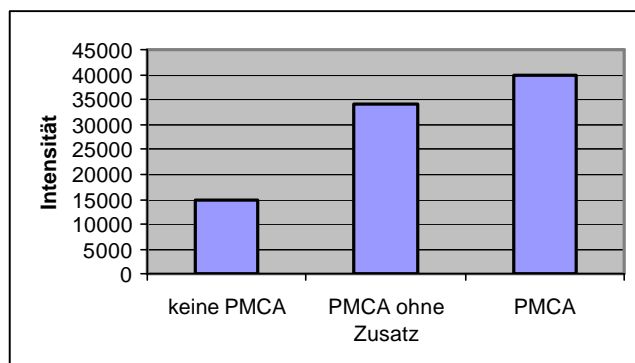


Abbildung 3: Intensitätsmessung der Western Blot Bande.

Auf jedem Blot wurden als Referenzwerte zu den unterschiedlichen PMCA Versuchen (PMCA) die Intensität der nichtamplifizierten (keine PMCA) und ohne Zusatz amplifizierten Proben (PMCA ohne Zusatz) gemessen.

Hierzu wurden von allen Intensitäten der Doppelansätze jeweils Mittelwerte ($\overline{Int(x)}$) gebildet. Dieser Mittelwert wurde jeweils durch den Mittelwert der nichtamplifizierten ($\overline{Int(keinePMCA)}$) Probe dividiert, so dass man einen Amplifikationsfaktor F erhielt (Formel1)

$$\text{Formel 1: } F_{amp}(x) = \frac{\overline{Int(x)}}{\overline{Int(keinePMCA)}}$$

Bei unterschiedlichen Gelen war der absolute Amplifikationsfaktor jedoch unterschiedlich, aufgrund der Intensität der keine PMCA-Probe.

Die relativen Amplifikationsfaktoren der PMCA Proben waren in Abhängigkeit zu der

Standard PMCA jedoch durchaus vergleichbar, so dass nur das PrPres der einzelnen Proben in Abhängigkeit von der Standard PMCA betrachtet wurde (**Abbildung 4**). Das neu entstandene PrPres der PMCA ohne Zusatz wurde als 100% definiert (Formel 2).

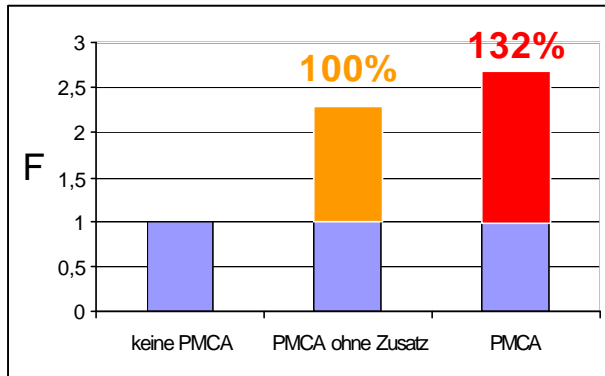


Abbildung 4: Normierung der Amplifikationsfaktoren.

Durch Bildung des Quotienten aus den Proben durch die nichtamplifizierte Probe (keine PMCA) erhält man den Amplifikationsfaktor F.

Das neuamplifizierte Material der Standard PMCA (PMCA ohne Zusatz) wurde auf 100% definiert, so dass alle weiteren Proben in Abhängigkeit zu der PMCA ohne Zusatz verglichen werden können.

$$\text{Formel 2: } F_{amp}(PMCA\text{ohneZusatz}) - 1 = F_{norm} = 100\%$$

Alle PMCA Proben mit Zusatz von Metallionen/EDTA wurden in Abhängigkeit von der PMCA ohne Zusatz in Prozentwerten angegeben (Formel 3).

$$\text{Formel 3: } \Delta F_{(PMCA)} = \frac{F_{amp}(PMCA) - 1}{F_{norm}} = \dots\%$$

In der **Abbildung 20** werden die PMCA Proben mit Metallionen in %-Abhängigkeit der PMCA ohne Zusatz dargestellt, die auf 100% normiert wurden.

2.2.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen mit der ELISA Methode

Der Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) erkennt Proteine ohne vorherige elektrophoretische Auftrennung mithilfe spezifischer Antikörper. Für quantitative Fragestellungen in Proteingemischen/Homogenaten, wie man sie bei der PMCA benötigt, hat sich der Sandwich ELISA angeboten. Dabei wird zuerst ein Antikörper (Capture-Antikörper) an die feste Phase, der Mikrotiterplatte gebunden, dann bindet das Antigen an den Capture-Antikörper, um dann in einem weiteren Schritt von dem Primärantikörper erkannt zu werden. Wichtig hierbei ist zu beachten, dass die beiden Antikörper an unterschiedliche Epitope des Antigens binden müssen.

Für den Capture Antikörper wurde 3F4 (Kascsak et al., 1987a) gewählt, da er sehr gut menschliches und Hamster PrP erkennt und bindet. Der Primärantikörper musste nun auch die Kriterien erfüllen, dass er sowohl menschliches als auch Hamster PrP erkennt und an ein anderes Epitop als 3F4 bindet. Diese Funktion wurde laut (Krasemann et al., 1996) von 12F10 erfüllt. Da sowohl 3F4 als auch 12F10 monoklonale Mausantikörper sind, konnte für die kolorimetrische Detektion kein Anti-mouse-HRP-AK verwendet werden, da sowohl der ausschließlich an das Antigen gebundene 12F10 als auch der im Überschuss an die Platte gebundene 3F4 erkannt worden wäre. Deswegen wurde 12F10 mit Hilfe des B-TAG Kits von SIGMA nach Herstellerangaben biotinyliert, so dass das Biotin durch Streptavidin erkannt werden konnte, welches wiederum an HRP gekoppelt war. Die Meerrettich Peroxidase konnte nun in einem weiteren Schritt die Farbreaktion des OPD katalysieren. Die Biotinylierung wurde in einem uns vertrauten Detektionssystem, dem Western Blot, überprüft. Es zeigte sich in wiederholten Western Blot und ELISA Versuchen, dass entgegen Beschreibung von Bio-Rad 12F10 im nativen als auch im biotinylierten Zustand zwar humanes aber kein Hamster PrP erkennen konnte. Daraufhin wurde SAF53 und SAF61 anhand eigener früher Western Blot Bilder für die ELISA Detektion ausgewählt. Beide Antikörper wurden mit dem B-TAG Kit nach Herstellerangaben biotinyliert und im ELISA getestet, wobei sich SAF53 für die Detektion von Hamster PrP besser geeignet hat.

2.2.7.1 Denaturierung des Antigens für ELISA Detektion

Die Vorbereitung des Antigens fand in einer eigenen Mikrotiterplatte (nicht der ELISA-Platte) statt.

20µl PMCA-Proben bzw. Homogenate mit 263K Zusatz wurden PK-verdaut (100µg/ml) und nach 1h bei 37°C mit PMSF (EK 25mM) abgestoppt. Kontrollen von rPrP wurden als

Verdünnungsreihe in NaPi angesetzt.

Für die ELISA Versuche, konnte das PrP nicht in SDS, wie beim Western Blot, denaturiert werden, da SDS sowohl die Antikörperbindung des Capture Antikörpers an die ELISA Platte, als auch die Bindung vom Antigen an die Antikörper beeinflussen würde. Deswegen wurde die Denaturierung mit 4M GndHCl bei 37°C/1h durchgeführt, welches PrPres ebenso wie SDS denaturiert, sowie die Infektiosität der Scrapie Probe beseitigt (Bellon et al., 2003).

Es wurden zu jeweils 20µl Probe 20µl 8M GndHCl hinzugefügt, um eine EK von 4M zu erreichen. rPrP-Kontrollen wurden ohne PK-Verdau gleich behandelt. Für die ELISA Detektion musste die Probe von 4M Guanidium auf 0,4M Guanidium verdünnt werden, um eine Antikörperinteraktion eingehen zu können. Ein Vergleich von GndHCl und SDS zeigt **Abbildung 5**.

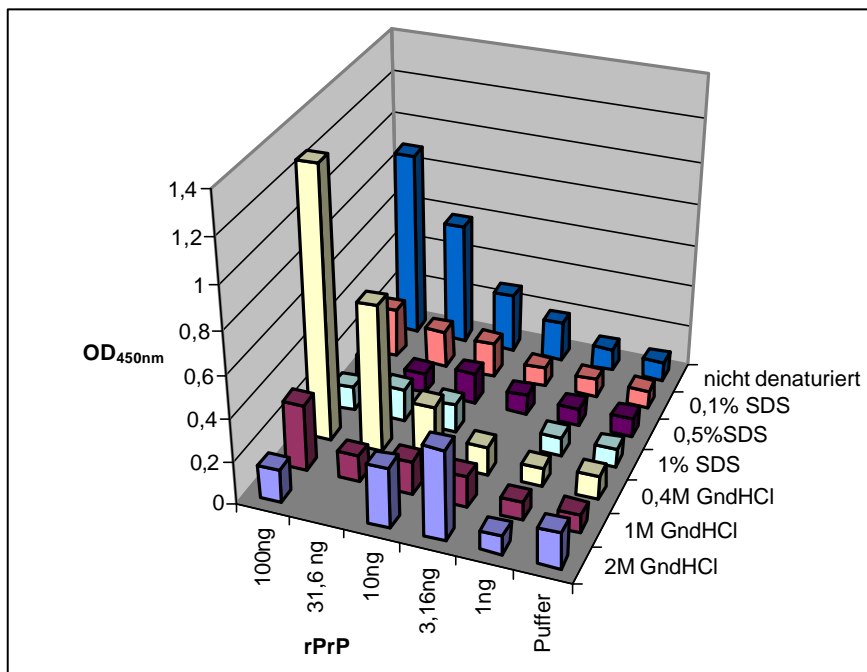


Abbildung 5: Einfluss von Denaturierung mit Guanidium/SDS auf ELISA Detektion

Eine Verdünnungsreihe von rPrP und Puffer wurde mit Guanidium 2M, 1M und 0,4M sowie mit SDS 1%, 0,5%, 0,1% denaturiert und mit 3F4 200ng/well und SAF53-Biot 1:500 im ELISA gemessen. Als Kontrolle wird eine Verdünnungsreihe von rPrP ohne vorherige Denaturierung gezeigt. Es zeigte sich, dass quantitative Messungen von rPrP in 0,4M Guanidium möglich sind.

2.2.7.2 Präparation der ELISA Platte

Um das Antigen an die feste Phase zu binden, musste zuerst der 3F4 Antikörper an die Platte gebunden werden, der wiederum eine Bindung mit dem Antigen eingehen konnte.

Dabei wurde der Capture-Antikörper (3F4 in Carbonat-Bicarbonat Puffer pH 9,6 verdünnt) auf eine Nunc Maxisorp Mikrotiterplatte (ELISA-Platte) gegeben und entweder über Nacht bei 4°C oder 2h bei 25°C inkubiert (coating).

Die eingesetzte 3F4- Konzentration bei der mit SAF53-Biot eine Menge von 0,31ng rPrP pro well detektiert werden konnte, lag bei 500ng 3F4/100µl Carbonat Bicarbonat Puffer pro well (**Abbildung 6**). Nach Beendigung des Coatings wurde der Antikörper aspiriert und anschließend 1h mit PBS BSA 5% 200µl/well inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen auf der ELISA Platte abzusättigen und anschließend mit dem Microplate Washer 3x mit jeweils 200µl ELISA-Waschpuffer gewaschen (=Waschschritt). Anschließend wurden 180µl NaPi pro well in die ELISA Platte pipettiert, welche nun fertig für die Antigenaufnahme war.

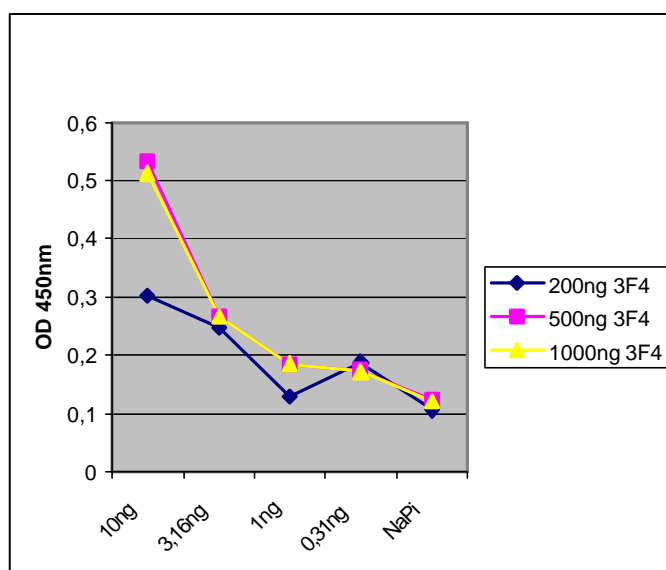


Abbildung 6: Bei einer Konzentration von 500ng/well 3F4 konnte rPrP mit einer Sensitivität von bis zu 0,31 ng/well sicher vom Puffer (NaPi) unterschieden werden.

2.2.7.3 Detektion des Antigens

Jeweils 20µl des vorbereiteten Antigens (siehe 2.2.7.1) wurden aus der Mikrotiterplatte in die pro well mit 180µl NaPi vorbereitete ELISA Platte (siehe 2.2.7.2) pipettiert. Hierbei wurde die Konzentration des GndHCL von 4M auf 0,4M verdünnt und war somit nicht mehr in der Lage die Antikörper zu denaturieren. Das Antigen wurde für 1h bei 25°C in der ELISA Platte inkubiert, wobei das Antigen an den immobilisierten 3F4 Antikörper gebunden wurde. Nach dem Waschschritt wurden 100µl/well des Primärantikörpers

SAF53-Biot 1:500 in Waschpuffer für 1h bei 25°C in der Platte inkubiert. Auf den nächsten Waschschrift folgte die Hinzugabe von ExtraVidin-HRP. Extravidin (100µl/well 1:1000 in Waschpuffer) bindet an das Biotin des biotinylierten SAF53 Antikörper, das wiederum 1h/25°C inkubiert wurde. Auf den letzten Waschschrift folgte die Zugabe von OPD 200µl/well, das entsprechend der HRP-Konzentration und somit der PrP Konzentration der Probe eine dementsprechende Gelbfärbung der wells erzeugte. Die kolorimetrische Detektion erfolgte nach 20, 30 und 40 Minuten bei 450nm im ELISA Reader. Die Daten zur Optischen Dichte (OD_{450nm}) wurden über die Software KJunior vom ELISA Reader ausgelesen und nach Microsoft Excel exportiert.

2.2.7.4 Kontrollexperimente zur Validierung des ELISA

Um quantitative Aussagen treffen zu können, musste sichergestellt werden, dass Parallelproben die gleiche Signalintensität liefern und Verdünnungsreihen eine proportionale Änderung der optischen Dichte zeigen. Verdünnungsreihen von 10; 3,16; 1 und 0,31 ng rPrP in Puffer konnten von dem ELISA System klar unterschieden werden (Abbildung 5+7), was zeigte, dass der ELISA quantitative Aussagen zu rPrP-Mengen machen kann. Um die Reproduzierbarkeit zu testen, wurden 12 wells mit 10ng/well rPrP und 72 wells mit 3,16ng/well, 12 wells Puffer sowie 42 wells Wt-HM +1:20 263K im ELISA gemessen (Abbildung 7).

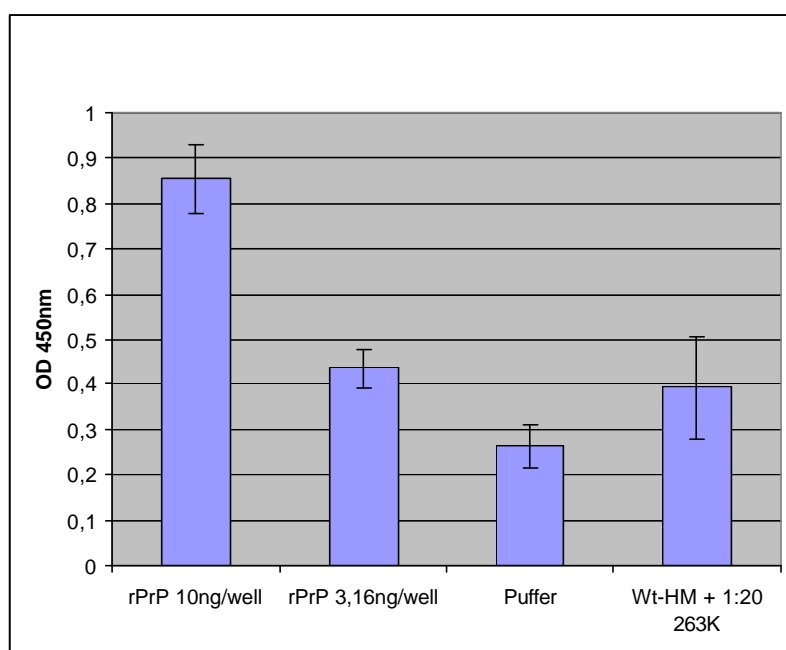


Abbildung 7: Parallelproben im ELISA

rPrP 10ng/well in Puffer (n=12), rPrP 3,16ng/well (n=72), Puffer (NaPi 10mM NP40 10%, n=12) und Wt-HM + 1:20 263K nach PK-Verdau (n=42) wurden in Guanidium 4M denaturiert 1h/37°C und dann 1:10 in Puffer verdünnt mit ELISA gemessen.

Während rPrP in Puffer sehr einheitlich detektierbar ist ($OD_{450} 0,44 \pm 0,04$), schwanken die Werte bei PrPres Detektion in Homogenaten erheblich ($OD_{450} 0,39 \pm 0,11$). Die PrP Detektion in Homogenaten wurde daraufhin noch intensiver untersucht. Auch auf den Einfluss einer möglicherweise nicht vollständigen abgestoppten PK wurde intensiver eingegangen (**Abbildung 8**).

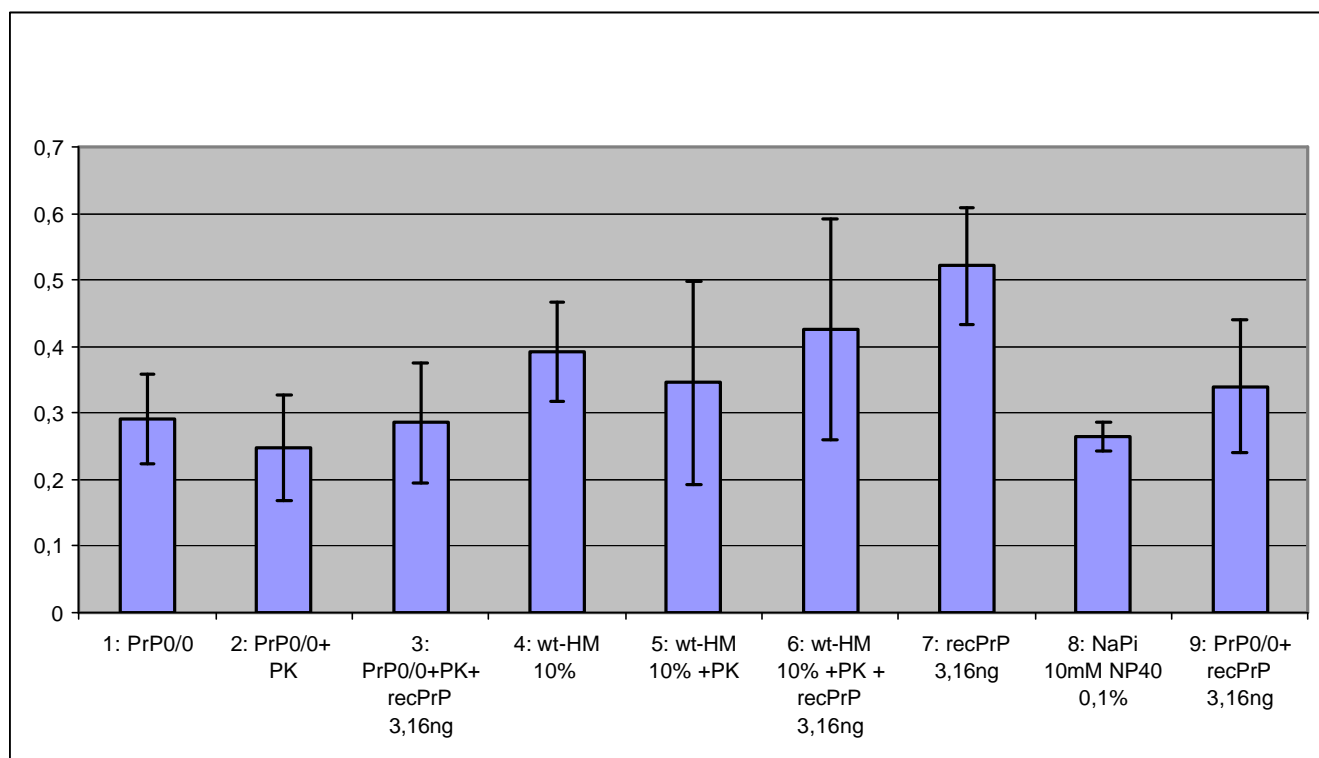


Abbildung 8: Einfluss von Homogenaten und PK-Verdau auf ELISA Detektion.

PrP^{0/0}-Maus Homogenat (1-3) und Wildtyp-Homogenat (4-6) wurden ohne Behandlung (1,4), nach 1h/37°C PK-Verdau und Stopp mit PMSF (2,5) und nach PK-Verdau und PMSF Stopp und anschließender Hinzugabe von rPrP 3,16ng (3,6) mit ELISA gemessen. Zur Kontrolle wurde Puffer (8), 3,16ng rPrP in Puffer (7) und 3,16ng rPrP in PrP0/0 (9) mit ELISA gemessen. Alle Proben wurden vor ELISA Detektion 1h/37°C in Guanidium denaturiert.

Es zeigte sich, dass die Standardabweichung aller Homogenate mit PrP^{0/0}, PrP^C oder mit rPrP eine sehr viel größere Streuung erfährt, als Puffer oder reinem rPrP.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Sensitivität des ELISAs für rPrP in Puffer ausreichend ist, aber die Anwendung an der PMCA Applikation daran scheitert, dass keine quantitativen Aussagen zu PrP in Anwesenheit von Homogenaten gemacht werden können, wie es benötigt werden würde.

3 Ergebnisse

Ziel der „Protein Misfolding Cyclic Amplification“ (PMCA) ist die Amplifikation von PrP^{Res} durch Kombination von Sonifikation und Inkubation von Hirnhomogenaten. Dies ist die erste Methode mit dem PK-resistentes PrP in größerer Menge *in vitro* erzeugt werden kann und somit neue Untersuchungen zum pathophysiologischen Umfaltungsprozeß möglich sind. Die PMCA dient der Untersuchung von Faktoren, die die Umfaltung beeinflussen um Therapeutika zu entwickeln. Zum anderen kann die PMCA als Amplifikationsmethode diagnostisch hilfreich sein, um bisher nicht detektierbare PrP^{Sc} Mengen zu amplifizieren und dann einer Detektion zuzuführen, so dass eine Prion-Erkrankung bereits in einem früheren Stadium erkannt werden kann.

Das Maß der Amplifikation erhält man durch Intensitätsanalyse der Immunoblots und den Vergleich der zu Beginn eingefrorenen Probe und der Probe, die den PMCA Zyklus durchlaufen hat (siehe auch 2.2.6).

3.1 Kontrolleexperimente zur Validierung der PMCA Methode

3.1.1 PMCA und Kontrollen

Die nach dem PMCA Protokoll (siehe 2.2.1) hergestellten Homogenate wurden zu 10, 1, 0,5 und 0 % mit PMCA Homogenaten von mit Scrapie infizierten Hamstern vermischt. Um den Effekt der PMCA auf die Amplifikation des PrPres zu ermitteln, wurden die unterschiedlich gespikten Homogenate folgender Prozeduren unterzogen: ohne Inkubationszeit bei -80°C eingefroren (Abbildung 9,1-4), ohne Sonifikation 23h bei 37°C inkubiert (Abbildung 9,15-18), 10 Zyklen PMCA (Abbildung 9, 5-8), 23 Zyklen PMCA (Abbildung 9,10-13).

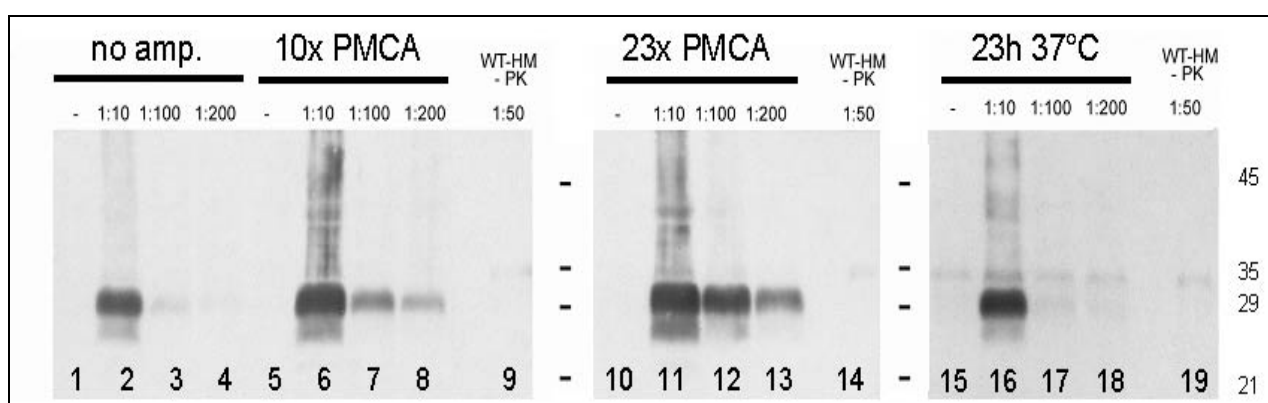


Abbildung 9: Hirnhomogenat von gesunden Syrian Hamstern (wt-HM) wurde 1:10, 1:100 und in 1:200 Verhältnissen mit Hirnhomogenaten von mit Scrapie 263K infizierten Hamstern vermischt.

Diese Homogenate wurden 10 (5-8) bzw 23 (10-13) Zyklen der PMCA-Reaktion unterzogen. Als Kontrolle dienten die sofort bei -80°C eingefrorenen Proben (1-4) sowie die 23h bei 37°C inkubierten(15-19) Proben. Die Western Blot Analyse nach Pk-Verdau (siehe 2.2.3) zeigt das PK-verdaute Fragment PrP²⁷⁻³⁰, die Intensität der Bande ist proportional zur eingesetzten PrP^{Sc} Menge.

Im Western Blot zeigte sich deutlich eine Amplifikation der Banden, die der PMCA unterzogen wurden, wobei gezeigt werden konnte, dass die Menge des PMCA-Produkts von der Zykluszahl abhängt. Auch die nicht sonifizierte Probe zeigte gegenüber der sofort eingefrorenen Probe eine leichte Verstärkung des Signals, was auch in anderen Arbeiten bestätigt werden konnte (Lucassen et al., 2003). Bei genauerer Betrachtung konnte man feststellen, dass die Amplifikation beim 1:100 Verhältnis, gegenüber den anderen Mischungsverhältnissen den größten Dynamikbereich aufweist, so dass diese Verdünnung für die weiteren Versuche verwendet wurde.

3.1.2 PMCA und Leistung

Als nächstes wurde die Abhängigkeit des Amplifikationsfaktors von der eingesetzten Sonifizierungsleistung untersucht. Hierzu wurden mit 1:100 263 K versetzten Homogenaten mit n Pulsen (n= 0, 1, 5, 20, 60) sonifiziert und dann jeweils 1 Stunde über 10 Zyklen inkubiert (**Abbildung 10**).

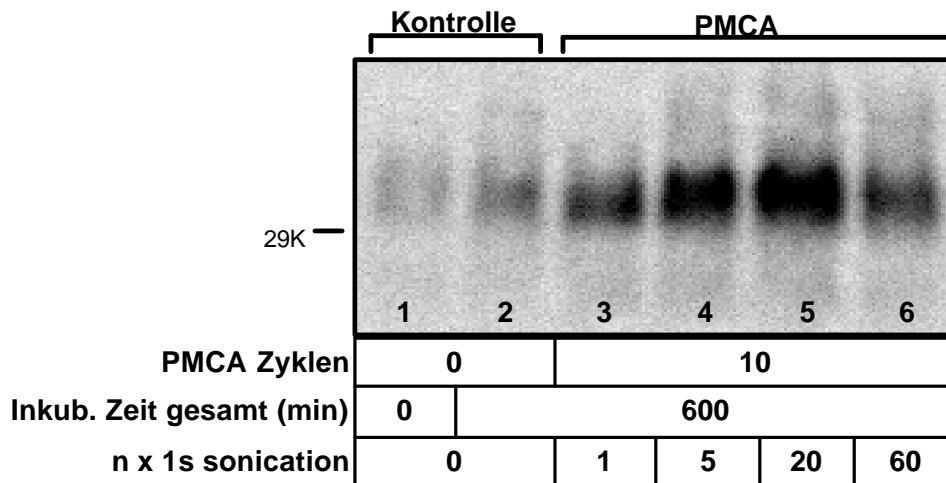


Abbildung 10: Abhängigkeit der Amplifikation von der Sonifizierungsleistung.

Wt-HM +1:100 263K Homogenat wurde mit 10 Zyklen PMCA behandelt (Spur 3-6) wobei pro Stunde n Impulse (n= 1, 5, 20, 60) verabreicht wurden. Als Kontrolle dienen die sofort eingefrorene (Spur 1) und die 10 Stunden inkubierte Probe (Spur 2).

Es zeigte sich, dass die maximale PrPres Amplifikation nach 10 Zyklen in einem Bereich zwischen 5-20 x 1 sec liegt.

3.1.3 PMCA und Inkubationszeit

Um den Einfluss der Inkubationszeit auf die Amplifikationsleistung zu untersuchen, wurden 10 Zyklen PMCA mit 5 x 1s Sonifikation pro Zyklus mit Gesamtinkubationszeiten von 10, 50, 150, 300 und 600 min durchgeführt (**Abbildung 11**).

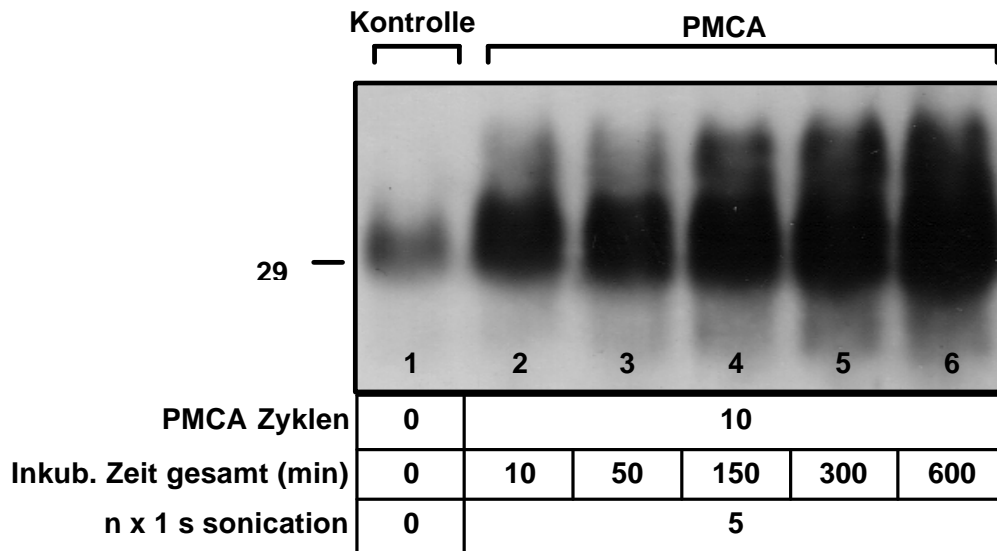


Abbildung 11: Abhängigkeit der Amplifikation von der Inkubationszeit.

Wt-HM +1:100 263K Homogenat wurde entweder sofort bei -80°C eingefroren (Spur 1), oder mit 10 Zyklen PMCA behandelt. Die jeweilige gesamte Inkubationszeit betrug 10, 50, 150, 300 oder 600 min/37°C (Spur 2-6).

Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der Inkubationszeit zwischen den Sonifikationsschritten zu einer Erhöhung des Amplifikationsproduktes führt.

3.1.4 Einfluss von PMCA auf PrPC

Weiterhin wurde untersucht, ob PrPres aus Wildtyp Homogenat ohne PrP^{Sc} durch die verschiedenen Schritte der PMCA (Einfrieren, Inkubation, Sonifikation, PK-Verdau) entsteht. Das 10%ige Wildtyp Homogenat wurde entweder sofort eingefroren, 10h PMCA unterzogen, 10h bei 37°C inkubiert oder 50 x 1 sec sonifiziert. Dann wurden Aliquots ohne PK und mit 100µg/ml und 10µg/ml PK versetzt (**Abbildung 12**).

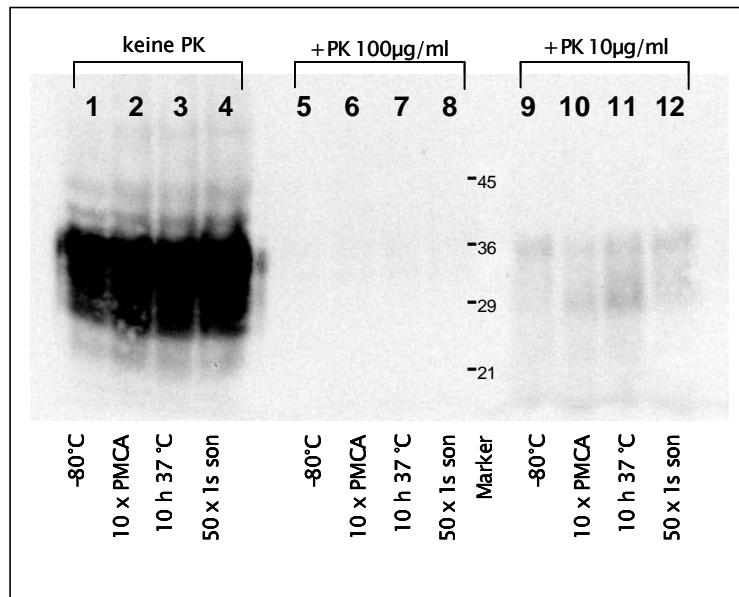


Abbildung 12: Einfluss der PMCA auf den PK-Verdau.

Wildtyp Homogenat von gesunden Hamstern wurde sofort eingefroren (Spur 1, 5, 9), 10 Zyklen PMCA unterzogen (Spur 2, 6, 10), 10h bei 37°C inkubiert (Spur 3, 7, 11) oder 50 x 1 sec sonifiziert und ohne Inkubation eingefroren (Spur 4, 8, 12). Die Proben wurden ohne PK-Verdau (Spur 1-4), mit 100µg/ml PK 1h bei 37°C verdaut (Spur 5-8) oder mit 10µg/ml PK 1h bei 37°C verdaut (Spur 9-12). Nach unvollständigem PK-Verdau ist noch ein Rest PrP^C zu detektieren (Spur 9-12)

Während bei der in allen Versuchen verwendeten PK-Konzentration von 100µg/ml (Spur 5-8) weder PrP^C noch PrPres Banden zu erkennen sind, sind bei der 10fach geringeren Konzentration von 10µg/ml (EK, Spur 9-12) PrP^C spezifische Banden bei 30-36kD zu detektieren. Hierbei handelt es sich um nicht verdautes PrP^C. Das PK-resistente Fragment aus PrP^{Sc} würde man im Western Blot bei 27-30kD erwarten, was hier nicht der Fall ist (siehe auch Einleitung 1.2.2.) Es zeigte sich, dass die Teilschritte der PMCA Methode, kein PrPres erzeugen können, wenn kein PrP^{Sc} Seed vorhanden ist.

3.1.5 Quantitative Reproduktion der PMCA

Um unterschiedliche Ansätze vergleichen zu können, muss man sicherstellen, dass Parallelproben die gleiche Amplifikationsrate aufweisen. In jeweils 4 Probengefäßen wurde Wt-HM + 1:100 263K Homogenat 8 Zyklen PMCA unterzogen. Gleichzeitig wurden 4 Probengefäße sofort eingefroren (Abbildung 13).

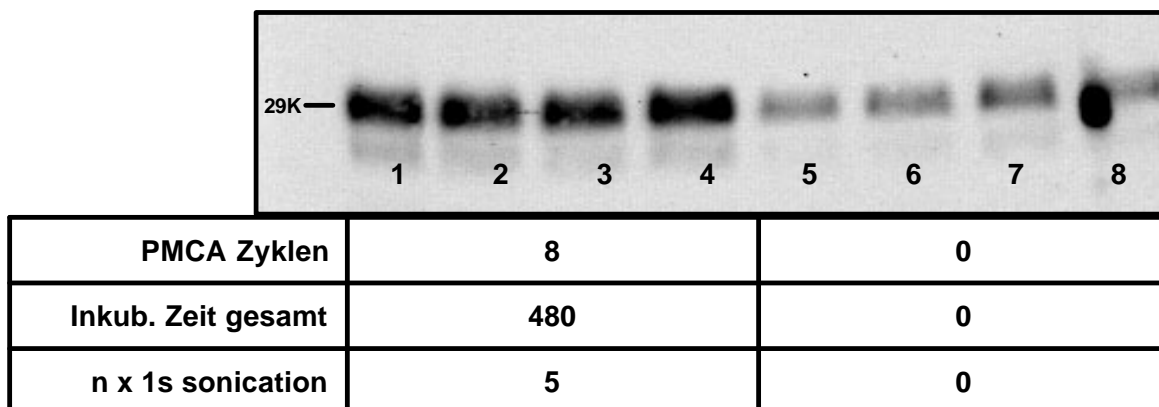


Abbildung 13: Amplifikation von Parallelproben.

Vier Parallelproben von Wt-HM +1:100 263K wurden jeweils 8 Zyklen PMCA unterzogen (Spur 1-4) oder sofort eingefroren (Spur 5-8). Bei dem starken kreisförmigen Signal in Spur 8 handelt es sich um ein Artefakt.

Es wurde gezeigt, dass sich Parallelproben gleichermaßen gut amplifizieren lassen ($F_{amp}=2,6 \pm 0,3$) und auch die sofort eingefrorenen Proben keine für Western Blots unübliche Unterschiede in der Intensität aufwiesen (Standardabweichung $\pm 20\%$).

3.1.6 PMCA mit serieller Transmission von PrPres

Um herauszufinden, ob das neue PrPres autokatalytisch die Konversion von PrP^C zu PrPres ermöglichen kann, wurde nach 10 Zyklen PMCA (10h) die Wt-HM + 1:20 263K - Probe 1:2 bzw 1:2,5 in frisches Wildtyp Homogenat von gesundem Syrian Hamster verdünnt. Vor und nach jeder Verdünnung wurden jeweils 20µl Aliquots für die Western Analyse entnommen. Das verdünnte Homogenat wurde wiederum 10 Zyklen PMCA unterzogen, bevor das amplifizierte Homogenat mit PrPres wieder in frisches Homogenat verdünnt wurde. Dieser Vorgang aus 10x PMCA und serieller Verdünnung wurde insgesamt 9mal wiederholt (I-X), so dass das initiale Material zum Schluss um das 512 bzw. 3815 fache verdünnt wurde (**Abbildung 14**).

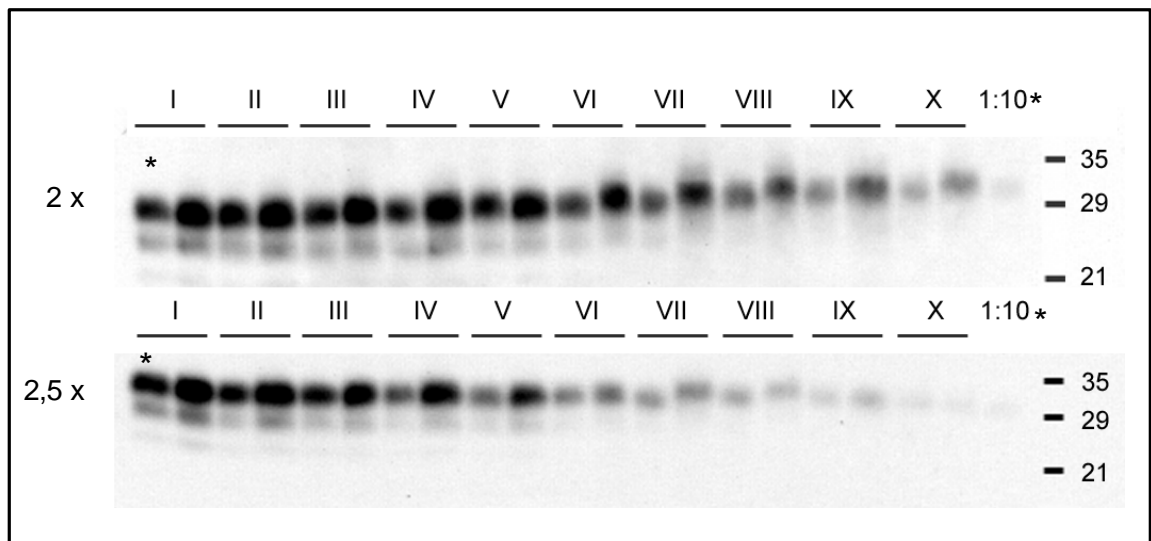


Abbildung 14: Serielle Transmission und Amplifikation von PrPres

Wt-HM+1:20 263K wurde 10 Zyklen PMCA unterzogen und anschließend 2fach (oberes Bild) oder 2,5fach (unteres Bild) in frisches Wt-HM verdünnt. Der Vorgang von Amplifikationen und Verdünnung wurde 9fach wiederholt (I-X). Vor und nach jedem 10er Zyklus PMCA wurden Aliquots für die Western Analyse entnommen (z.B. I: linke Bande: vor PMCA, rechte Bande: nach PMCA). Die letzte Spur zeigt eine 1:10 Verdünnung in Wt-HM des initialen Homogenats(*).

Von Verdünnung zu Verdünnung sank der Gehalt an PrP^{Sc} exponentiell, während der Gesamtgehalt an PrPres nur einen leichten Rückgang zeigte (**Abbildung 15**), da der Verdünnungsfaktor von 2 den mittleren Amplifikationsfaktor leicht überstieg.

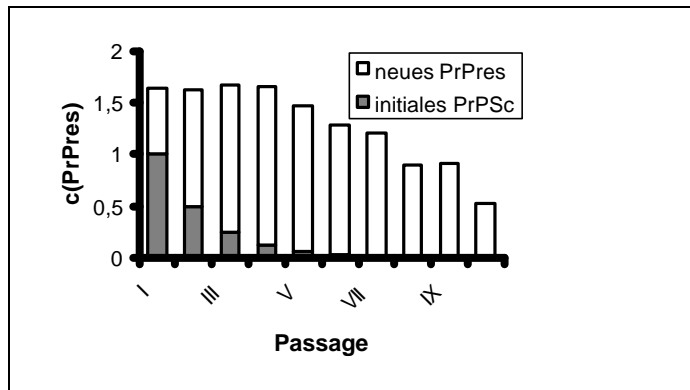


Abbildung 15: PrPres nach jeweils 10 PMCA-Zyklen und serieller 2facher Verdünnung (I-X) Relative Mengen von initialem PrP^{Sc} (grau) und neuem PrPres (weiß).

Es zeigte sich, dass der Amplifikationsfaktor meist zwischen 1,5 und 2,0 lag und unabhängig von den Verdünnungsschritten war.

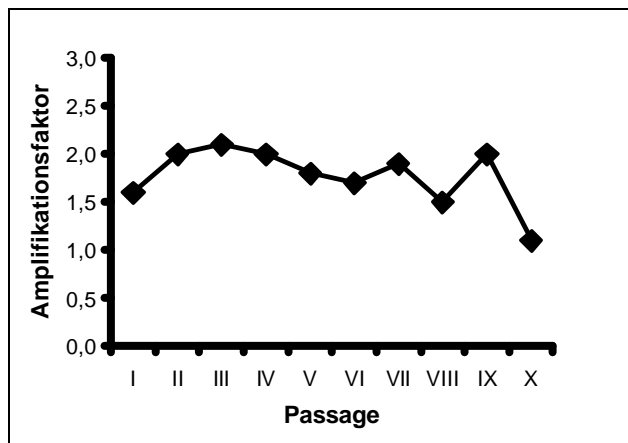


Abbildung 16: Amplifikationsfaktoren von den PMCA Experimenten mit serieller Transmission von PrPres (Verdünnung 2 fach)

Die katalytische Aktivität ist unabhängig von dem relativen Anteil von PrP^{Sc} aus dem initialem 263K und dem neu geformten PrPres.

Die mittlere Amplifikationsrate lag bei 1.75 ± 0.3 (2fache Verdünnung) und 1.8 ± 0.4 (2,5fache Verdünnung) (**Abbildung 16**). Die totale Amplifikation lag bei 270- bzw. 280fach für die 2- und 2,5 fache Verdünnungen.

Zusätzlich wurde die biologische Infektiosität des entstandenen PrPres von M.Beekes am RKI Berlin untersucht. 3 Gruppen Hamster wurden mit 3 unterschiedlichen Substraten inokuliert: Initiales PMCA Substrat (1:20 263K in Wt-HM), PMCA Reaktionsprodukt nach 10 facher serieller Transmission, sowie eine 10 fache Verdünnung des initialen PMCA Substrates ohne PMCA. Man stellte keine Zunahme an Infektiosität durch die PMCA fest (Bieschke et al., 2004). Die Versuche zur seriellen Amplifikation entstanden in Zusammenarbeit von Jan Bieschke, Petra Weber, Nikolaus Sarafoff, Michael Beekes, Armin Giese und Hans Kretzschmar und die Ergebnisse wurden 2004 publiziert (Bieschke et al., 2004). Kürzlich konnte eine Arbeitsgruppe mit der Methode der seriellen Transmission erstmals infektiöses PrPres in vitro erzeugen und somit den Beweis für die Prionhypothese führen (Castilla et al., 2005a)

3.2 Hemmung der PrPres Erzeugung durch rekombinantes PrP

Für die Generierung von PrPres wäre es von großem Interesse rekombinantes PrP (rPrP 23-231) vom Syrian Hamster (SHa) einzusetzen, um die Entstehung und die Eigenschaften von PrPres besser charakterisieren zu können. Die Konzentration von PrP^C pro mg Gesamtprotein im Hamsterhirn beträgt 0,07µg/mg Protein (Pan et al., 1992). Pro mg Feuchtgewicht beträgt der Proteinanteil ca 100mg, so dass man davon ausgehen konnte, dass pro mg Hamsterhirn 7µg PrP^C vorhanden sind.

Zuerst wurde gezeigt, dass eine Amplifikation von 1:100 263K in Hirnhomogenat von Mäusen, welche kein PrP^C exprimieren (Nullmäuse, PrP^{0/0}), nicht stattfand. Dies bestätigt die These, dass als Substrat für die PMCA natives PrP^C zur Verfügung stehen muss. Auch eine Hinzugabe von rPrP zu dem Ansatz in Nullmaushomogenat änderte die Menge an detektierbarem PrPres nach 8 Zyklen PMCA nicht (**Abbildung 17**), so dass gezeigt wurde, dass rPrP nicht als PMCA Substrat in Nullmaushomogenat zur Verfügung steht.

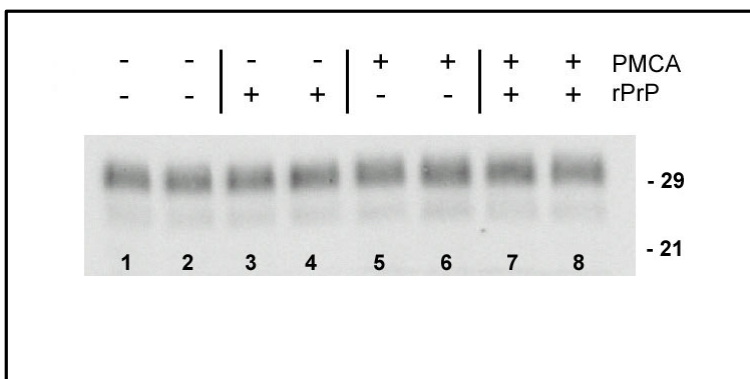


Abbildung 17: Natives PrP^C ist Substrat für PMCA.

PrP^{0/0}-Homogenat + 1:100 263K wurde sofort eingefroren (Spur 1-4) oder 8 Zyklen PMCA unterzogen (Spur 5-8). Es fand weder mit (Spur 7,8) noch ohne rPrP (Spur 5,6) eine Amplifikation von PrPres statt.

Als nächstes wurde untersucht, ob in Anwesenheit von PrP^C eine Umwandlung von rPrP zu PrPres möglich wäre. Es wurde rPrP (23-231) von Syrian Hamster (SHa) in siebenfachem Überschuß zu PrP^C in den PMCA Ansatz (1:100 263K in Wt-HM) hinzugegeben. Es wurde festgestellt, dass in Gegenwart dieser rPrP Konzentration die Amplifikation von PrPres gehemmt wurde (**Abbildung 18**).

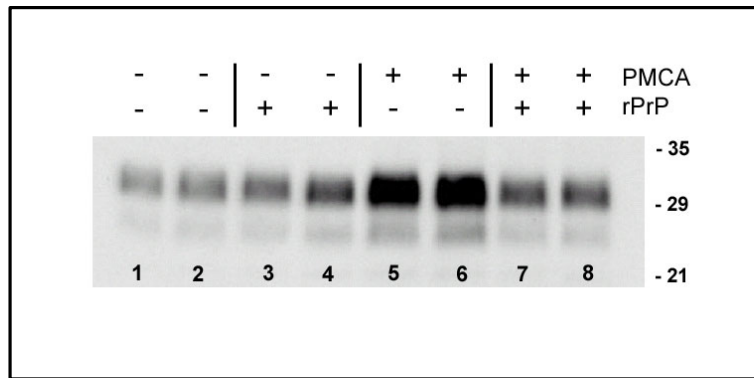


Abbildung 18: Inhibition der PMCA durch rPrP (23-231)

Wt-HM +1:100 263K wurde sofort eingefroren (Spur 1-4) oder 8 Zyklen PMCA unterzogen (Spur 5-8). rPrP inhibiert die Amplifikation von PrPres (Spur 7,8) im Vergleich zu der Probe ohne Zugabe von rPrP (Spur 5,6) wo eine Amplifikation stattgefunden hat. (Vergleich Spur 1,2)

Um herauszufinden, ob die Inhibition von rPrP konzentrationsabhängig ist, wurde rPrP zu PrP^C im Verhältnis von 10:1, 3:1, 1:1 und 1:3 eingesetzt. Es zeigte sich, dass eine Hemmung der Amplifikation bereits bei substöchiometrischer Zugabe von SHa rPrP stattfand, wohingegen die Zugabe von murinem rPrP oder BSA in zehnfachem Überschuss keine hemmenden Effekte auf die PMCA hatten (**Abbildung 19**).

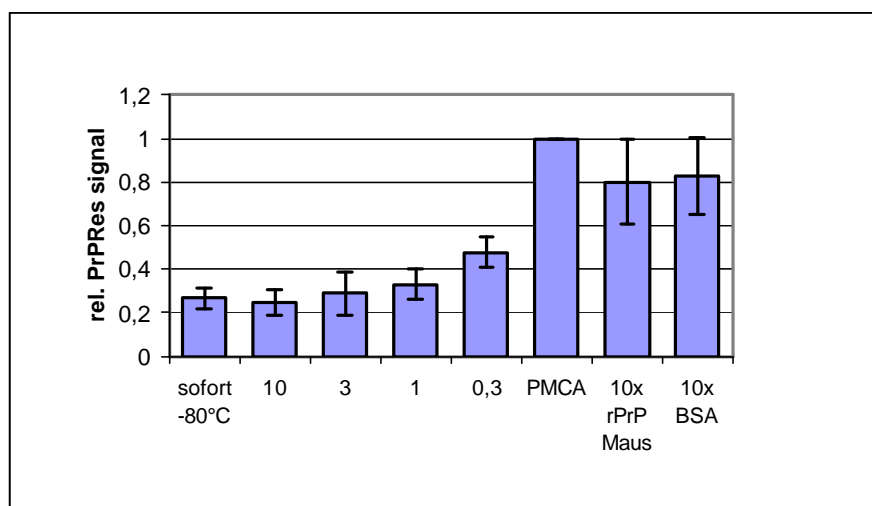


Abbildung 19: Inhibition der PrPres Amplifikation durch rPrP

Wt-HM + 1:100 263K wurde mit 0-10 fachem Verhältnis von rPrP/PrP^C mit SHa rPrP versetzt und 8 Zyklen der PMCA unterzogen. Die Werte stammen aus 46 Versuchen die mittels Western Blot Analyse und digitaler Intensitätsmessung auf die PMCA Reaktion ohne Zusatz normiert wurden. Die Mittelwerte und die Standardabweichung sind dargestellt. Ein 10facher Überschuss an murinem rPrP oder BSA wurde in zusätzlichen Proben als Kontrollen verarbeitet.

SHa rPrP inhibiert signifikant die PrPres Amplifikation verglichen zur Amplifikation ohne rPrP ($P < 0,003$) und verglichen zu der Amplifikation in Anwesenheit von murinem rPrP im Überschuss ($P < 0,05$). Diese Ergebnisse sind in der Gemeinschaftsarbeit von Jan Bieschke, Petra Weber, Nikolaus Sarafoff, Michael Beekes, Armin Giese und Hans Kretschmar publiziert worden (Bieschke et al., 2004)

3.3 Metallionenkonzentration und Prionamplifikation

Metalloberflächen können PrP^{Sc} binden und Infektiosität übertragen, wie in der Vergangenheit gezeigt wurde (Flechsich et al., 2001). Es wurde deswegen argumentiert, dass die Metalloberfläche des Sonikatorstabes, mikroskopische Metallpartikel die vom Stab abgesondert werden oder Metallionen, die sich während des Sonikationsprozesses lösen, für die PrPres Amplifikation, die man bei der PMCA beobachtet, essentiell sind.

Metallionen wie Kupfer, Mangan, Zink und Nickel haben einen Einfluss auf die Umfaltung, Aggregation und Protease Resistenz von dem Kupferbindenden PrP (siehe 1.3.2). In den Versuchen wurde der Einfluss von den Chloridsalzen der genannten Metalle auf die Amplifikation von Prionen in vitro (PMCA) untersucht. Als Kontrolle wurde noch der Einfluss der Metalle auf die PK-Resistenz und den pH-Wert im Reaktionsansatz untersucht.

Für die Metallionenversuche wurde das Saborio Protokoll zu EDTA freiem Protease Inhibitor geändert (siehe 2.2.1).

3.3.1 Metallionenkonzentration und PMCA

Um den Einfluss von Metallionen auf die PMCA charakterisieren zu können, wurden unterschiedliche Ansätze von Wt-HM +1:100 263K –Homogenat ohne EDTA amplifiziert. Amplifikationsfaktoren von 6-8 unterschiedlichen Experimenten wurden normiert, indem man den Zuwachs von PrPres bei der PMCA ohne Zusatz von Metallionen oder EDTA als 100% definierte (siehe 2.2.6.1).

Der Einfluss der Metallionen auf den PK Verdau muss von dem Einfluss der Metallionen auf die PMCA Reaktion unterschieden werden. Hierzu wurde der Zuwachs von PrPres Western Blot Intensitäten von PMCA Reaktionen verglichen, wo Metallionen nach der PMCA Reaktion aber vor dem PK Verdau (**Abbildung 20b**, 50 μ M: weiß; 500 μ M grau), oder vor der PMCA Reaktion und damit ebenfalls vor dem PK Verdau (**Abbildung 20b**, 50 μ M: gestreift; 500 μ M: schwarz) hinzugegeben wurden. Um den Einfluss der Metallionen zu überprüfen, die bereits im Homogenat vorhanden sind, wurde EDTA im Überschuss (1mM) vor der PMCA Reaktion hinzugegeben (**Abbildung 20a**, gestreift)

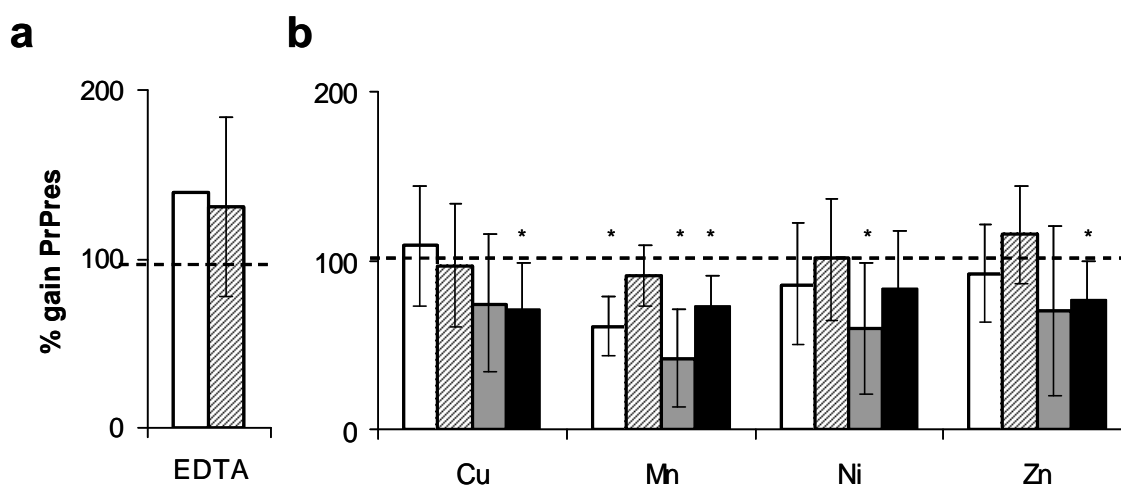


Abbildung 20: Mn, Ni und Zink fördern die PrPres Amplifikation, während Cu keinen Effekt zeigt. Alle Metallionen verringern die Stabilität von PrPres gegenüber PK während EDTA die Stabilität erhöht.

a: EDTA(1mM) wurde vor dem PK Verdau (weiß) oder vor der PMCA Reaktion (n=34, gestreift) hinzugegeben.

b: CuCl₂, MnCl₂, NiCl₂ und ZnCl₂ wurde vor (gestreift: 50 μ M, schwarz: 500 μ M) oder nach der PMCA Reaktion (weiß: 50 μ M, grau: 500 μ M) hinzugegeben. PrPres Konzentrationen wurden nach 8 Zyklen von n=6-8 unabhängigen PMCA Reaktionen bestimmt wie bereits beschrieben. Die gestrichelte 100 % Linie zeigt den Zuwachs von PrPres in der Kontroll PMCA ohne Zugabe von Metallsalzen oder EDTA. Initiale PrP^{Sc}-Intensitäten wurden auf 0% festgelegt.

Mangan, Nickel und Zink jedoch nicht Kupfer fördern die PMCA Reaktion bei 50 μ M (**Abbildung 20b**, gestreift) und 500 μ M (**Abbildung 20b**, schwarz) Konzentration, verglichen mit

den Kontrollreaktionen bei denen die divalenten Kationen nach der PMCA hinzugegeben wurden (**Abbildung 20b**, 50µM: weiß; 500µM: grau). Bei 50µM-Konzentration (**Abbildung 20b**, gestreift) konnte bei Cu, Ni und Zn kein Einfluss auf die PrPres PK-Resistenz festgestellt werden, während Mn die PK-Resistenz verringerte. Die Zugabe von 500µM Metallionen verringerte die PrPres Menge um 40-70% verglichen mit der Kontroll PMCA Reaktion (=100%). Der Anstieg in der PrPres Intensität durch den positiven Einfluss auf die PMCA in Anwesenheit von Mn, Ni und Zn wird durch den destabilisierenden Effekt, den die Metallionen in diesem Versuchsansatz auf die PK-Resistenz des entstandenen PrPres ausüben, verringert. Im Großen und Ganzen ist die Menge von PrPres, die in Anwesenheit von Metallionen entstanden ist geringer, als die Menge die in den Kontrollreaktionen entstanden ist, wo weder Metallsalze noch EDTA eingesetzt wurde (100%).

Durch das Binden von freien Metallionen mit EDTA im Reaktionsansatz erhöht sich die detektierbare PK Resistente PrPres Menge nach der PMCA Reaktion (**Abbildung 20a**). Der Anstieg von PrPres in Anwesenheit von EDTA lässt sich am besten mit einer Aktivitätsminderung der Proteinase K erklären, die bekannterweise von Ca^{2+} -ionen abhängig ist (Bajorath et al., 1988). Der Einfluss der verschiedenen Versuchsansätze auf die PK Resistenz von PrP^{Sc} ohne PMCA ist im nächsten Kapitel ausführlich beschrieben.

3.3.2 Metallionenkonzentration und PK-Verdau

Proteinase K ist ein metallabhängige Proteinase (Bajorath et al., 1988), so dass untersucht wurde, welchen Einfluss die eingesetzten Kationen auf den PK Verdau haben. Hierzu wurde ein Wildtyp Homogenat vom Syrian Hamster mit 1:50 263 K Homogenat versetzt und die Proben mit den zweiwertigen Metallionen: Kupfer, Mangan, Nickel und Zink in zwei verschiedenen Konzentrationen (50 μ M und 500 μ M) versetzt. Als Kontrolle dienten sowohl die Proben, welche ddH₂O bekamen als auch die Proben mit 1mM und 5mM EDTA (**Abbildung 21**). Die Proben wurden nicht amplifiziert sondern gleich PK-verdaut (EK 100 μ g/ml) und mit Western Analyse detektiert und mittels digitaler Intensitätsmessung ausgewertet.

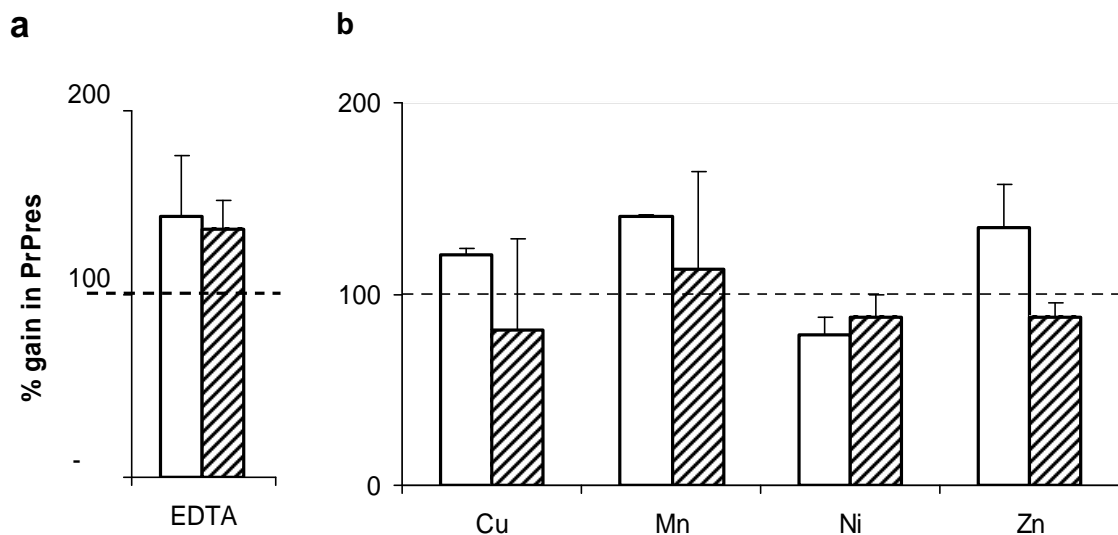


Abbildung 21: Einfluss von Metallionen und EDTA auf den PK-Verdau

Wt-HM + 1:50 263K wurde mit **(a)** EDTA 1mM (weiß) und 5mM (gestreift) sowie **(b)** Metallionen in 50 μ molarer (weiß) und 500 μ molarer (gestreift) Konzentration versetzt. Die Proben wurden nicht amplifiziert sondern gleich PK-verdaut und mittels Western Analyse und digitaler Intensitätsmessung detektiert (n=2). Die gestrichelte 100 % Linie zeigt die Menge von PrP^{Sc} in einer Probe ohne Zugabe von Metallsalzen oder EDTA.

Es zeigte sich, dass bei einer Metallionenkonzentration von 500 μ M eine Aktivitätserhöhung der PK erfolgt, da weniger PrP^{Sc} detektiert wird. In Anwesenheit von EDTA ist 140% PrP^{Sc} detekrierbar, verglichen mit der 100% ddH₂O Kontrolle

3.3.3 Metallionenkonzentration und pH-Wert

Um herauszufinden, ob sich durch Zugabe von Metallionen bzw. EDTA der pH-Wert des Ansatzes ändert, wurde 10%iges Wildtyphomogenat vom Syrian Hamster mit EDTA 1mM und den Metallionen: Kupfer, Mangan, Nickel, Zink versetzt. Als Kontrolle diente die Probe mit ddH₂O Zusatz (Abbildung 22). Die Proben wurden zum Zeitpunkt 0 und nach 24stündiger Inkubation bei Raumtemperatur mit der pH-Elektrode InLab 423 gemessen.

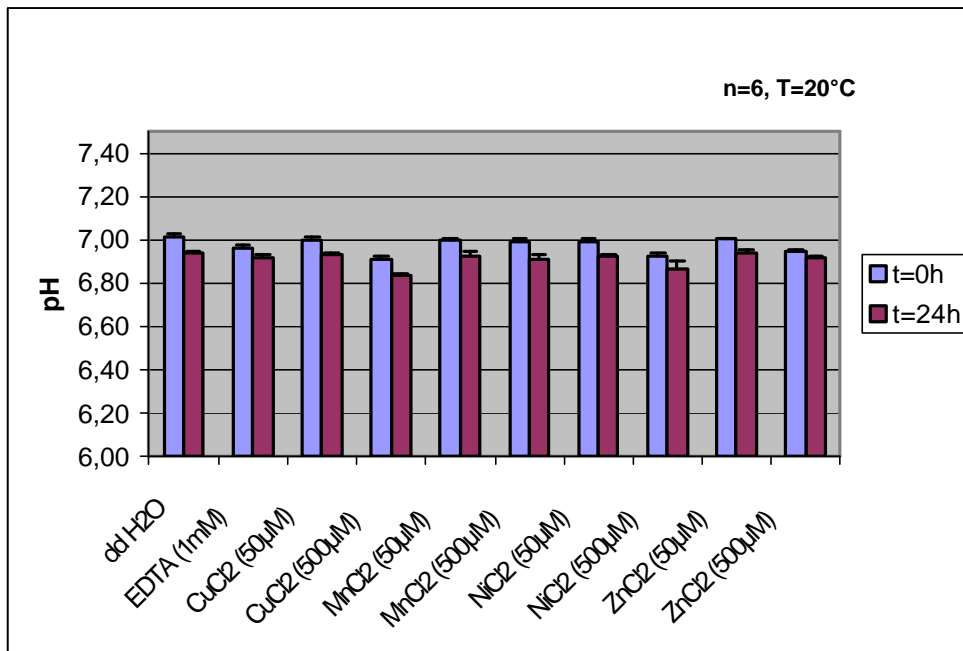


Abbildung 22: pH Werte von Wildtyphomogenaten mit Metallionen und EDTA

10%iges Wildtyphomogenat vom Syrian Hamster wurde mit ddH₂O(Kontrolle) und Metallionen in 50µM und 500µM Konzentration, sowie EDTA 1mM versetzt und der pH Wert zu den Zeitpunkten t=0 und 24h gemessen. Die Mittelwerte von jeweils 6 Ansätzen sowie die Standardabweichung sind dargestellt.

Es zeigte sich, dass der pH Wert im Mittel um maximal 10^{-1} variiert und dass auch nach 24h die Abnahme des pH Werts bei allen Proben gleichmäßig ist. Die unterschiedliche Intensität des PrPres in den verschiedenen Metall Proben, konnte also nicht auf eine Änderung des pH-Werts zurückgeführt werden.

3.4 Automatisierung der PMCA

Die manuelle PMCA Methode mit dem Stab, wie von Saborio et. al beschrieben, ist vom Untersucher abhängig, sehr zeitaufwendig und arbeitet im offenen System, so dass Kontaminationen auftreten können. Die Auswertung ist auf ein Western Blot Gel beschränkt, so dass maximal 15 Proben miteinander verglichen werden können. Eine Automatisierung der PMCA in einem geschlossenen System wäre aufgrund der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, der Laborsicherheit und des geringeren Arbeitsaufwands von enormen Vorteil.

3.4.1 Entwicklung des Wasserbadamplifikators

Die Nachteile der manuellen PMCA konnte zum Teil durch die Entwicklung einer indirekten Amplifikation im Wasserbadamplifikator beseitigt werden. Die Timerfunktion des Ultraschallwasserbads SONOREX 52H wurde mithilfe eines Taktgebers der Firma Siemens (Typ 3RP1555-1AP30) überbrückt, so dass nun in sekundengenau bestimmbar und individuell einstellbar Pause und Puls Zeiten, das Ultraschallbad zyklisch beschallt werden und gleichzeitig über die bereits vorhandene Temperierungsfunktion das Wasserbad auf 37°C konstant gehalten werden konnte. Die Proben wurden in geschlossenen Probengefäßen in einem eigens angefertigten Schwimmer im Bad genau positioniert (**Abbildung 23**

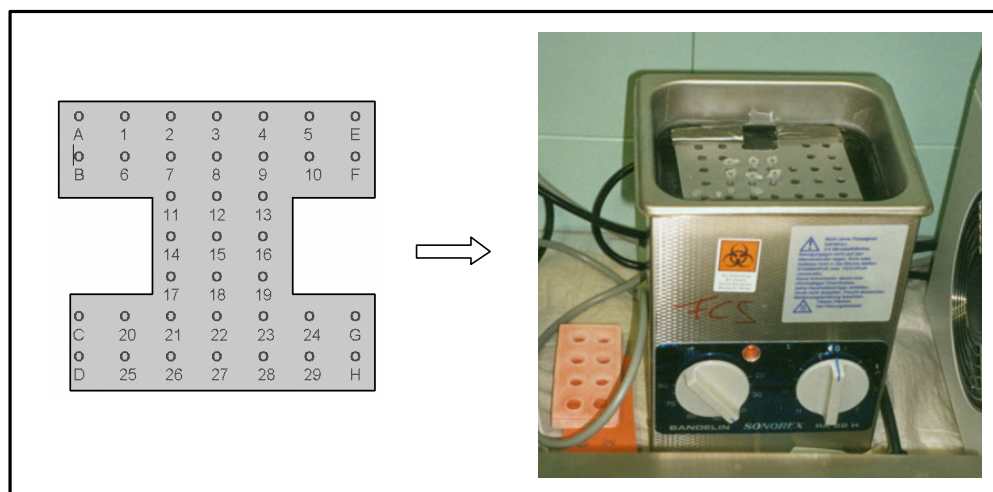


Abbildung 23: Schwimmfähiger Probenhalter für 200µl Probengefäße (der Schwimmer).

Eine 11 x 12 cm große Kunststoffplatte mit 37 Löchern (Durchmesser 4 mm, Abstand 10mm) und Styroporverstärkung am Rand der Platte wurde genau mittig im Wasserbadamplifikator positioniert und am Rand des Bades fixiert.

3.4.2 Automatische PMCA im Wasserbadamplifikator

Bei der automatischen PMCA wurden die Sonifikations- und Inkubationsschritte vom Wasserbadamplifikator (siehe 3.4.1) durchgeführt. Für die Pulszeit wurden 30sec und für die Inkubationszeit 29 Minuten 30sec gewählt. Die Proben bestanden aus Wt-HM + 1:100 263K mit 5mM EDTA versetzt und wurden in die Position 1-28 in den Schwimmer gegeben und für 20 Stunden (40 Zyklen) amplifiziert. Ein manuelles Eingreifen war nach Starten der Maschine nicht nötig.

Die Probe wurden mittels Western Analyse detektiert und mit digitaler Intensitätsmessung quantifiziert (siehe Kap 2.2.6). Es zeigte sich in 2 unterschiedlichen Ansätzen, dass eine indirekte Amplifikation mit Amplifikationsfaktoren von bis zu 14 möglich war. Diese Werte konnten bei der manuellen PMCA nicht erreicht werden. Im Mittel betrug der Amplifikationsfaktor $5,23 \pm 2,90$. Weiterhin wurde gezeigt, dass die indirekte Amplifikation von der Position der Probe im Schwimmer abhängig ist, was auf die inhomogene Verteilung der Ultraschalldruckwellen im Wasserbad zurückzuführen ist (**Abbildung 24**).

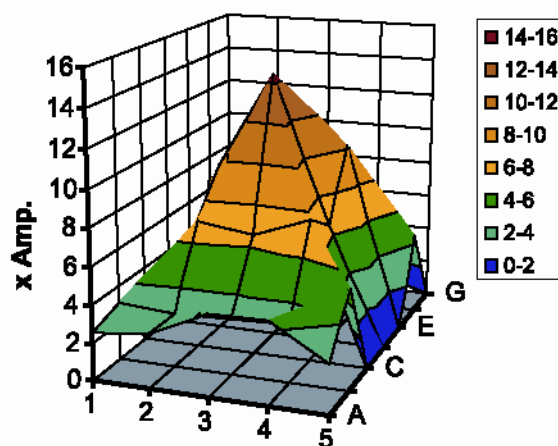


Abbildung 24: Der Amplifikationsfaktor bei der indirekten PMCA im Wasserbadamplifikator ist abhängig von der Schwimmerposition (Ultraschalleistung).

Wt-HM + 1:100 263K mit 5mM EDTA wurde im Wasserbadamplifikator 20 Stunden (40 Zyklen) amplifiziert. Die Probengröße von jeweils 60 μ l wurde im geschlossenen Gefäß an definierte Positionen in den Schwimmer gegeben, welcher an den Amplifikator fixiert wurde. Die Sonifikationszeit betrug 30sec, die Inkubationszeit 29min 30sec. PrPres wurde nach PK-Verdau mittels Western Analyse detektiert und mit digitaler Intensitätsmessung quantifiziert. Die Abbildung zeigt die Amplifikationsfaktoren im Vergleich zur nicht amplifizierten Probe, in Abhängigkeit von der Position auf dem Schwimmer. Im Mittel betrug der Amplifikationsfaktor $5,23 \pm 2,90$.

Somit wurde auch bei der indirekten Sonifikation eine Leistungsabhängigkeit der PMCA gezeigt (Vergleiche 3.1.2). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die PMCA nicht abhängig ist von der Metalloberfläche des Sonifikationsstabes, der bei der manuellen Methode eingesetzt wird.

3.4.3 Entwicklung des Munich Prion Cyclers (MPC)

Die inhomogene Leistungsverteilung des Wasserbadamplifikators erlaubt keine Vergleiche von Proben, aufgrund der platzabhängigen inhomogenen Amplifikationsfaktoren von Proben gleichen Inhalts. So kann eine Änderung des Amplifikationsfaktors, der für ein Substanz Screening im High-Throughput-Verfahren interessant wäre, nicht eindeutig auf den Inhalt der Probe zurückzuführen werden. Eine homogenere Amplifikationsrate versprach der Sonicator 3000 der Firma Misonix mit dem Microplate Horn. Die Abstrahlfläche des Microplate Horns bei dem Gerät ist von einem Acyrling eingefasst, so dass ein mit Wasser oder anderen Flüssigkeiten befüllbares kreisrundes Becken entsteht. Die Bodenfläche wird vollständig von der Abstrahlfläche ausgekleidet und enthält eine Vertiefung, die speziell für Mikrotiterplatten ausgelegt ist (**Abbildung 25**).



Abbildung 25: Microplate Horn

Die Mikrotiterplatte wird in das mit Wasser gefüllte Beschallungsbecken gegeben, dessen Boden vollständig von der Abstrahlfläche ausgekleidet wird.

Die Sonifikationsleistung des Sonicator 3000 kann in 10 verschiedenen Stufen eingestellt werden. Zykluszahl, Pause- und Puls-Zeiten können individuell und sekundengenau eingestellt werden. Das Gerät kann das Beschallungsbecken nicht temperieren, besitzt jedoch Anschlüsse für Schlauchverbindungen, so dass ein externes Thermostat angeschlossen werden konnte (**Abbildung 26**). Da mit infektiösem Material gearbeitet wurde, wurde das Thermostat nur indirekt an den Munich Prion Cycler (MPC) angeschlossen. Das Inkubierwasser welches im Kreislauf 1 das Beschallungsbecken temperiert, zirkuliert mit Hilfe einer Schlauchpumpe durch eine speziell angefertigten Kupferspirale, die im Thermostat auf die gewünschte Temperatur geheizt wurde. Dadurch wurde gewährleistet, dass etwaige Infektiosität, die während der PMCA aus der Mikrotiterplatte hätte austreten können, das Thermostat nicht kontaminiert hätte. Die Temperierfunktion, die die Temperatur im Thermostat bestimmt, wurde über einen im Kreislauf 1 integrierten externen Temperaturfühler reguliert.

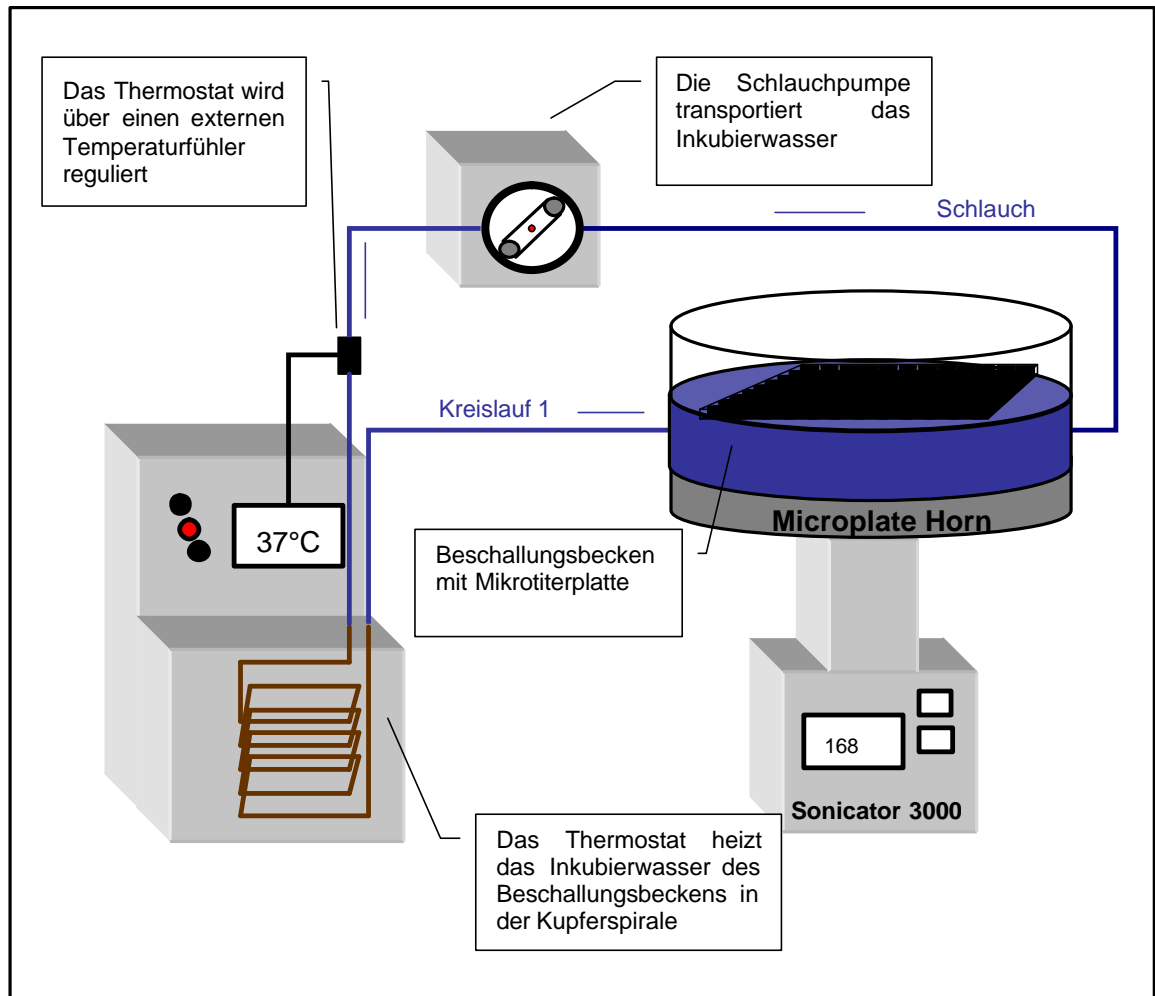


Abbildung 26: Schematische Darstellung des Munich Prion Cyclers (MPC)

Die zu amplifizierenden Proben befinden sich in der Mikrotiterplatte im Beschallungsbecken auf dem Microplate Horn. Der Sonicator 3000 kann in variablen Puls und Pausezeiten sekundengenau und zyklisch das Becken beschallen. Die konstante Inkubiertemperatur ist über das auf 37°C temperierte Wasser im Kreislauf 1 gewährleistet.

3.4.4 Automatische PMCA im Munich Prion Cycler (MPC)

Im Munich Prion Cycler konnten Proben im Mikrotiterplatten Format amplifiziert werden, ohne dass ein manuelles Eingreifen erforderlich war. Der MPC wurde auf Stufe 5 (168W) mit einer Pulszeit von 30sec und einer Pausezeit von 29min 30sec auf eine Zykluszahl von 21 Stunden eingestellt. Das Wt-HM wurde 1:100 mit 263K Scrapie Hirn versetzt und zusätzlich mit 1mM EDTA und in 60µl Aliquots auf 28 Positionen der Mikrotiterplatte verteilt. Neben zentralen Positionen wurden auch randständige Positionen besetzt, um einen etwaigen Abfall der Amplifikationsleistung am Rand der Platte beobachten zu können (Abbildung 27). Der Versuch wurde bei 25°C durchgeführt.

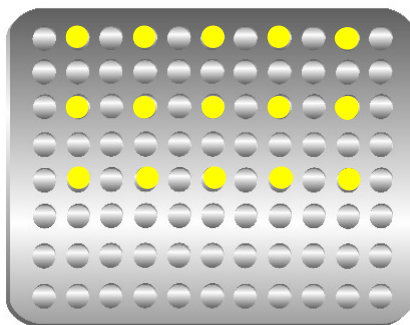


Abbildung 27: Probenbeladung der Mikrotiterplatte im Munich Prion Cycler (MPC).

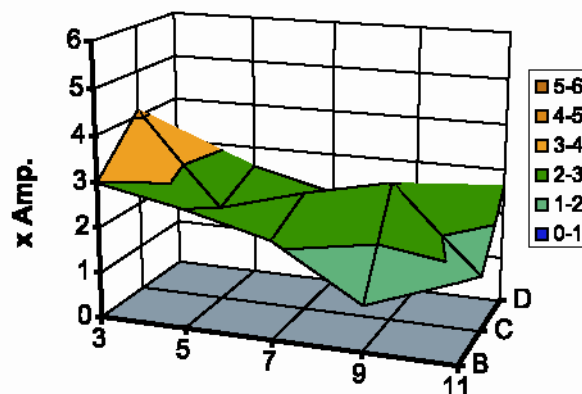


Abbildung 28: Bei der indirekten PMCA im Munich Prion Cycler ist kein Abfall des Amplifikationsfaktors am Rand der Platte zu beobachten.

Wt-HM + 1:100 263K mit 1mM EDTA wurde im Munich Prion Cycler 21 Stunden (42 Zyklen) amplifiziert. Die Probengröße von jeweils 60 µl wurde an 28 Stellen in die Mikrotiterplatte gegeben und mit Klebefolie verschlossen (siehe Abbildung 27). Die Sonifikationszeit betrug 30sec, die Inkubationszeit 29min 30sec. PrPres wurde nach PK-Verdau mittels Western Analyse detektiert und mit digitaler Intensitätsmessung quantifiziert. Die Abbildung zeigt die Amplifikationsfaktoren im Vergleich zur nicht amplifizierten Probe, in Abhängigkeit von der Position auf der Mikrotiterplatte. Im Mittel betrug der Amplifikationsfaktor $3,0 \pm 0,7$.

Es zeigte sich nach Western Analyse und digitaler Intensitätsmessung ein mittlerer Amplifikationsfaktor von $3,0 \pm 0,7$, wobei kein Abfall der Faktoren am Rand der Platte festzustellen war (Abbildung 28).

4 Diskussion

Die Arbeit „Amplifikation von Prionen in vitro“ beruhte auf der Amplifikationsmethode die erstmals 2001 vorgestellt wurde (Saborio et al., 2001). Bei der PMCA wird erstmals PK-resistentes PrPres in ausreichender Menge in vitro hergestellt, welches molekularbiologisch dem Erreger spongiformer Enzephalopathien gleicht. Die PMCA erlaubt somit eine in vitro Untersuchung des pathologischen Umfaltungsprozess von PrP^C zu PrP^{Sc} für diagnostische und therapeutische Studien.

4.1 Etablierung und Analyse der Einzelschritte der PMCA Methode

Die PMCA Methode amplifiziert Prionen durch Mischung von infizierten und gesunden Hamsterhirnmogenaten und darauffolgender Inkubation und Sonifikation des Reaktionsansatzes. Eine Amplifikation wird durch densitometrische Messung und Vergleich der PrPres Western Blot Banden zu Beginn und am Ende der PMCA Reaktion ermittelt (Saborio et al., 2001). Es wurden ausgiebig die Einzelschritte der PMCA Methode, insbesondere die Quantifikation der Western Blot Bande und die Auswirkungen der Sonifikationsleistung und der Inkubationszeit auf die Amplifikationseffizienz untersucht. Des Weiteren wurde das eingesetzte Substrat variiert, sowie der Einfluss des PK Verdaus auf die PrPres Entstehung untersucht.

Zur Quantifikation von PrPres Banden war nicht viel bekannt und auch die Autoren der PMCA Methode haben keine Angaben über Verdünnungsreihen von PrP^{Sc} im Western Blot gemacht. Wir haben zunächst gezeigt, dass die Intensität der PrPres Bande direkt proportional zur eingesetzten PrP^{Sc} Menge ist (Kap. 2.2.6), so dass Intensitätsmessungen von PrPres Banden die Proteinmenge in vitro repräsentieren.

Saborio et al. zeigten, dass das Amplifikationsprodukt mit Zunahme der Zyklen ansteigt, was von uns bestätigt werden konnte (Kap 3.1.1). Gleichzeitig konnten Sie keine Amplifikation beobachten, wenn der Reaktionsansatz nur inkubiert und nicht sonifiziert wurde. Eine neuere Arbeit, die den Einfluss von Mn auf die PrPres Entstehung von PrP^C untersucht, unterstreicht den Einfluss der Sonifikation bei der PMCA (Kim et al., 2005). In unseren Experimenten konnten wir ohne Sonifikation einen moderaten Anstieg von PrPres zeigen, der auch in der modifizierten PMCA (Lucassen et al., 2003) beschrieben wurde, die ohne Sonifikation und mit einer veränderten Homogenatzusammensetzung arbeitet. Amplifikationsfaktoren von 58 ± 20 die initial publiziert wurden (Saborio et al., 2001), konnten bisher von keiner anderen Arbeitsgruppe reproduziert werden. Studien haben einen Amplifikationsfaktor von 10 über 24h beschrieben (Lucassen et al., 2003). In

unserem Labor konnten konstante Amplifikationsfaktoren von $1,75 \pm 0,3$ für jeweils 10 Zyklen über einen Zeitraum von 100 Zyklen gezeigt werden, was zu einer Gesamtamplifikation von 270 geführt hat (Bieschke et al., 2004). Kürzlich wurde eine 200.000 fache Amplifikation mit Amplifikationsfaktoren von $1,9 \pm 0,2$ für jeweils 10 Zyklen über 150 PMCA Zyklen mit serieller Transmission von PrPres gezeigt (Piening et al., 2005). Bei Proben, die nur inkubiert wurden, konnten in derselben Arbeit initial Amplifikationsfaktoren von 2,1 gezeigt werden. Nach seriellen Transmissionsschritten sank der Faktor jedoch auf 1,4 und 1,1 bis dann nach dem 6. Schritt kein PrPres mehr zu detektieren war. Dies zeigt, dass amplifiziertes PrPres das nicht sonifiziert wurde, nicht autokatalytische Eigenschaften besitzt wie PrPres aus PMCA Versuchen (Piening et al., 2005; Bieschke et al., 2004) und somit nicht die Eigenschaften der Prionhypothese wie PK Resistenz und autokatalytische Aktivität erfüllt. Der Sonifikationsschritt ist somit essentiell für die in vitro Amplifikation von Prionen. Der Einfluss der Sonifikationsleistung auf die Konversionseffizienz wurde untersucht. Homogenate wurden stündlich mit $n \times 1 \text{ sec}$ ($n=0, 1, 5, 20, 60$) Impulsen des Stabsonicators amplifiziert und es konnte eine optimale Amplifikation bei 5-20x 1sec Impulsen festgestellt werden, so dass das PMCA Protokoll bestätigt werden konnte (Kap. 3.1.2). Eine neuere Studie konnte die Wichtigkeit optimierter unterschiedlicher Sonifikationsleistung bei Amplifikation von Prionen verschiedener Species wie Hamster, Maus, Schaf, Ziege, BSE und Mensch zeigen (Soto et al., 2005)

Die bekannten Daten ließen keine Rückschlüsse auf die Reproduzierbarkeit der Amplifikation zu. In vier Parallelansätzen wurden 4 Reaktionsansätze nach dem PMCA Protokoll amplifiziert und es konnte eine Abweichung von nur 10% der Amplifikationsfaktoren ($F_{\text{amp}}=2,6 \pm 0,3$) festgestellt werden (Kap 3.1.5), so dass die PMCA Reaktion reproduzierbar ist.

PrP^{Sc} ist weitgehend PK resistent während PrP^C nur eine sehr schwache PK Resistenz aufweist (Bolton et al., 1982). Bei der PMCA Reaktion wird PrP^C zu PrPres in Anwesenheit von einem PrP^{Sc} seed umgewandelt. Es wurde untersucht, ob durch Inkubation oder Sonifikation von PrP^C bereits eine PK resistenz entsteht, sowie ob die PK Konzentration einen Einfluss auf die PrP^C Detektion hat. Bei einer PK Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ $37^\circ\text{C}/1\text{h}$ wurde PrP^C nicht vollständig abgebaut, wohingegen bei $100 \mu\text{g/ml}$ $37^\circ\text{C}/1\text{h}$ keine Western Blot Bande mehr zu detektieren war (Kap. 3.1.4). Dies konnte in anderen Arbeiten bestätigt werden, wo bei $10 \mu\text{g/ml}$ $37^\circ\text{C}/1\text{h}$ auch kein Signal detektiert wurde (Kim et al., 2005). Des Weiteren konnte in unseren Versuchen keine de novo PK Resistenz festgestellt werden, wenn nur PrP^C eingesetzt wurde und Homogenate

sonifiziert oder inkubiert wurden (Kap 3.1.4).

Zur Erzeugung von PrPres ist PrP^C erforderlich. Eine Sonifizierung in PrP^{0/0} Homogenat, welches kein PrP^C enthält, zeigte keine Verstärkung der PrPres Bande nach 8 Zyklen PMCA (Kap. 3.2).

Der Inkubationsschritt der PMCA wird bei 37°C durchgeführt. Es wurde gezeigt, dass eine Amplifikation im Bereich von 25°C-37°C gut abläuft, wohingegen keine Signalverstärkung bei 4°C gemessen werden konnte (Lucassen et al., 2003). Eine Erhöhung der Temperatur auf 65°C zeigte in Anwesenheit von Mn eine Umfaltung von PrP^C zu PrPres, wohingegen bei 100°C keine PK Resistenz gemessen werden konnte (Kim et al., 2005). Dies zeigt, dass die PMCA bei physiologischen Temperaturen erfolgen muss, da entweder Prion Proteine oder Cofaktoren eine temperaturabhängige Kinetik aufweisen oder bei unphysiologischen Temperaturen ihre Funktion aufgeben. Der optimale pH Wert für in vitro Prion Amplifikation wurde mit pH 6-8 gezeigt (Lucassen et al., 2003).

Die PMCA amplifiziert PrPres autokatalytisch in vitro. Der Amplifikationsfaktor ist abhängig von der Zykluszahl und benötigt sowohl Inkubations-, als auch Sonifikationsschritte und sollte bei physiologischen 37°C und pH 6-8 durchgeführt werden. Je nach Stärke der Sonifizierung ändert sich die Effizienz der PMCA Reaktion. Eine Amplifikation ohne Sonifikation ist möglich, scheint aber nicht autokatalytisch aktives PrPres zu erzeugen und erfüllt somit nicht die Prion Hypothese. Neues PrPres kann als seed für weitere Amplifikationen dienen. Parallelansätze zeigten die Reproduzierbarkeit der PMCA, so dass vergleichende Studien mit unterschiedlichen Reaktionsansätzen einen Vergleich der Amplifikationseffizienz ermöglichen. Die Intensitätsmessung von Western Blot Banden repräsentiert die Proteinmenge in vitro.

4.2 Spezifität der PMCA Reaktion; rPrP hemmt PMCA Reaktion

Rekombinantes PrP vom Syrian Hamster (SHa rPrP (23-231)) in 10 fachem Überschuss zu PrP^C hemmt die Amplifikation von PrPres vollständig (siehe 3.2). Um zu überprüfen, ob die Inhibition der PrPres Entstehung spezifisch war, wurde SHa rPrP in Verhältnissen von rPrP/PrP^C von 0,3 bis 10 zu dem Reaktionsansatz hinzugegeben und es wurde gezeigt, dass sogar substochiometrische Mengen an rPrP signifikant die Amplifikation hemmen. Der Amplifikationsfaktor halbierte sich bereits bei einem molarem Verhältnis rPrP/PrP^C von 0,3 und bei einem Verhältnis von =1 konnte fast keine PrPres Formation beobachtet werden ($p < 0,003$). Kontrollen mit murinem rPrP sowie BSA beeinflussten die Amplifikation nicht signifikant ($p < 0,05$) (Kap. 3.2).

Somit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Hamster rPrP (23-231) die PMCA Reaktion von Hamsterhomogenaten spezifisch hemmt und die Ergebnisse konnten publiziert werden (Bieschke et al., 2004).

Es lässt sich mit Prionreplikationsmodellen möglicherweise erklären, warum bereits substöchiometrische Mengen von homologem rPrP die Amplifikation hemmen. Es wäre möglich, dass rPrP spezifisch die Konversionszentren von PrP^{Sc} bzw. PrPres rods blockiert, so dass PrP^C nicht binden kann. Als mögliche Konversionszentren könnte man sich die Enden der PrP^{Sc} Polymere vorstellen, wie in der Vergangenheit vorgeschlagen (Masel and Jansen, 2000). Gleichzeitig zeigt die fehlende Umwandlung von Hamster rPrP, dass die Prionreplikation sehr spezifisch ist und dass außer rPrP und PrPres andere Faktoren wie z.B. das vorgeschlagene Protein X (Telling et al., 1995) für die Konversion essentiell sind. Die Spezifität wird unterstrichen durch die fehlende Inhibition von murinem rPrP was im Gegenzug zu Hamster rPrP nicht in der Lage war, die Konversion zu hemmen.

Versuche PrP^{Sc} in Hirnhomogenaten von anderen Species zu amplifizieren schlugen fehl (Lucassen et al., 2003; Soto et al., 2005) und zeigen erneut die in vivo beobachtete Speciesbarriere auf molekularem Level. Unterschiedliche Konversionseigenschaften von Prionproteinen verschiedener Species konnten bereits mit dem Cell free conversion system bei unterschiedlichen Glycosilierungsmustern (Vorberg and Priola, 2002) und Heterologien in der Aminosäureabfolge (Priola, 1999) gezeigt werden. Der genaue Mechanismus der heterologen Interaktion unterschiedlicher rekombinanter Prionproteine bei der PMCA ist nicht bekannt, zeigt aber, dass die PMCA auf molekularem Level sehr spezifisch arbeitet.

4.3 Metallionen und PMCA

Prion Proteine binden Kupfer in vivo (Brown et al., 1997a) und in geringerer Affinität auch Ni, Mn und Zn (Jackson et al., 2001). Es wird angenommen, dass das Prion Protein Einfluss auf die Kupferaufnahme in Neuronen hat, sowie im synaptischen Spalt eine Pufferfunktion aufweist, um vor toxischen Kupferionen zu schützen (Vassallo and Herms, 2003).

Die Rolle von Metallen bei der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} ist noch nicht endgültig geklärt. Kupferionen haben bei Rückfaltungsversuchen von PrP^C zu PrP^{Sc} einen förderlichen Effekt auf die Regenerierung von Infektiösität und PK-Resistenz gezeigt (McKenzie et al., 1998). Dies konnte zum Teil auch in anderen Arbeiten bestätigt werden, wo die Umfaltung, PK-Resistenz und Aggregation von rekombinantem PrP durch Kupfer

induziert werden konnte (Qin et al., 2000; Stöckel et al., 1998).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass bei Zugabe von Mn, Ni und Zink in ca. 10fach physiologischen Konzentrationen von 50µM und unphysiologischen 500µM die PrPres Amplifikation gefördert wird, während Cu keinen Effekt zeigt (siehe 3.3.1). Gleichzeitig verringern alle Metallionen die Stabilität von neu entstandenem PrPres gegenüber PK. Der positive Effekt den Metallionen auf die Amplifikation haben, wird durch den destabilisierenden Effekt der Metallionen auf die PK-Resistenz des entstandenen PrPres wieder aufgehoben, so dass keine erhöhte PrPres Menge im Vergleich zur PMCA ohne Zusatz detektiert werden konnte. EDTA hat keinen Einfluss auf die PMCA, was bedeutet, dass die Metallionen im Homogenat keinen nennenswerten Beitrag zur Amplifikation in diesem Versuchsansatz leisten. Der Anstieg von PrPres in Anwesenheit von EDTA lässt sich am besten mit einer Aktivitätsminderung der Proteinase K erklären, die bekannterweise von Ca^{2+} -ionen abhängig ist (Bajorath et al., 1988).

Der destabilisierende Effekt auf PrPres durch den PK Verdau bei Hinzugabe von Metallionen kann auf die Eigenschaften von in der PMCA entstandenem PrPres zurückzuführen sein, oder durch eine Aktivitätserhöhung der PK. Eine Aktivitätserhöhung der PK durch Metallionen würde sich auch im Verdau von PrP^{Sc} aus infizierten Hamstern zeigen. Um diesen Einfluss zu untersuchen, wurde die PK Resistenz und der pH Wert von PrP^{Sc} bei Hinzugabe von Metallionen analysiert. Der Versuchsansatz wurde nicht amplifiziert. Es zeigte sich hier, dass Hinzugabe von 500µM Metallionen im Vergleich zu der ddH₂O Kontrolle weniger PrP^{Sc} detektiert wurde. (Kap 3.3.2). Eine signifikante Änderung des pH Wertes konnte durch Hinzugabe von Metallionen nicht festgestellt werden (Kap 3.3.3.). Metallionen bewirken somit einen positiven Einfluss auf die Aktivität der PK bzw. verringern die PK Resistenz von PrPres.

Bisher wurde gezeigt, dass bei Austausch der Kupferionen mit Manganionen PrP^C Proteinase K resistenter wird, was zu der Annahme geführt hat, dass die Mn-Bindung eine Rolle im pathophysiologischen Prozess der PrP^{Sc} Entstehung in vivo hat (Brown et al., 2000). Weitere Studien zeigten einen proaggregatorischen Effekt von PrP Molekülen mit Mn der mit Cu geblockt werden konnte (Giese et al., 2004). Erst kürzlich zeigten Kim et al. mit einer modifizierten PMCA eine Proteinase K Resistenz Entstehung von PrP^C in Anwesenheit von Mn, Cu oder Fe Salzen. Hierbei war die PK-Resistenz bei Zugabe von Cu zum Reaktionsansatz noch höher als mit Mn (Kim et al., 2005), was den bisherigen Daten widerspricht. Die physiologische Relevanz dieser Versuche ist jedoch zu diskutieren, da Metallionen in mM-Konzentration eingesetzt wurde, was den 100-

1000fachen physiologischen Spiegeln entspricht. In der gleichen Studie wurde in Gehirn und mitochondrialer Fraktion von Scrapie Hamstern eine um 33% erhöhte Konzentration an Mn gefunden. Erhöhung der Mn Konzentration konnte in der Vergangenheit auch in Gehirnen von CJD Patienten gezeigt werden (Wong et al., 2001), wobei gleichzeitig die Kupferkonzentration um 50 % vermindert war im Vergleich zu Normalpersonen. Andere Studien wiederum konnten keinen Effekt von EDTA auf die nichtdenaturierende PMCA erkennen (Lucassen et al., 2003).

Metalle wie Kupfer und Mangan haben einen Effekt auf die Konformation von PrP^C und PrP^{Sc}, spielen eine Rolle bei der Konversion, sowie scheinen die PK Resistenz zu beeinflussen. Der genaue Mechanismus inwiefern welches Metall welchen Konformationszustand von PrP bevorzugt bzw. die Umwandlung katalysiert ist noch ungewiß. Es wurden Hypothesen aufgestellt, dass das kupferbindende PrP^C in vivo über eine Änderung der Metallbindung die Konformationsänderung erleichtert und proaggregatorisch wirkt (Lehmann, 2002). Wie der Ligandenaustausch durch PrP^{Sc} induziert wird und ob das infektiöse PrP^{Sc} Metall bindet muss noch erforscht werden. Rekombinantes PrP aus E.Coli ohne Ligand konnte einen Scrapie Phänotyp in transgenen Mäusen induzieren und neuropathologisch wurde PrPres in Hirngewebe nachgewiesen (Legname et al., 2004).

Eine Erklärung für die Ergebnisse dieser Doktorarbeit wäre, dass Metallionen die Amplifikation fördern, jedoch das in der PMCA entstandene PrPres destabilisiert (Sarafoff et al., 2005). Man kann sich den destabilisierten Zustand als ein Metallgebundenes PrP-Zwischenprodukt in der Umfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc} vorstellen. Stabiles infektiöses PrP benötigt jedoch keine Metallbindung wie Versuche mit rPrP gezeigt haben (Legname et al., 2004), so dass durch EDTA das stabilste PrPres mit der stärksten PK-Resistenz gebildet wird.

4.4 Automatisierung der PMCA

Die PMCA Reaktion wie von Saborio et al. beschrieben hat einige Nachteile. Man arbeitet mit infektiösem Material in einem offenen System und verursacht eine Kontamination der Sicherheitswerkbank. Diese entsteht durch Spritzverluste beim Sonifizieren, die je nach Kontakt der Sonotrode mit der Wand des Reaktionsgefäßes, sowie der Eintauchtiefe in den Reaktionsansatz entstehen. Es handelt sich hierbei um mm-Abstände die von dem Untersucher nicht fehlerfrei durchgeführt werden können. Diese Probenverluste schränken die reproduzierbare Quantifizierung von Ergebnissen ein. Weiterhin ist sowohl

die Durchführung der PMCA Methode als auch des Western Blots sehr zeitaufwendig und die Anzahl der zu untersuchenden Proben, die miteinander verglichen werden sollen, ist auf ein Western Blot Gel mit maximal 15 Banden beschränkt. Für die Untersuchung von möglichen Therapeutika ist jedoch eine große Anzahl an Parallelproben vonnöten, um Analysen mit großem Durchsatz durchführen zu können. Neben der PMCA Methode sollte deswegen auch die quantitative PrPres Detektion automatisiert werden.

Es wurden zwei Systeme zur automatischen Amplifikation im geschlossenen System entwickelt. Der Wasserbadamplifikator sonifizierte zyklisch das temperierte Becken in dem die Proben in einem Schwimmer genau positioniert wurden (Kap. 3.4.1). Es zeigte sich nach 23 h eine maximale Amplifikation von 14fach in der Mitte des Bades wohingegen die Konversionseffizienz zum Rand des Beckens hin gleichmäßig absank (Kap. 3.4.2). Der gleichmäßige Abfall der Amplifikationseffizienz zum Rande hin lässt sich am besten durch unterschiedliche Ultraschalleistung aufgrund Interferenzphänomenen im Ultraschallbad zurückführen. Leistungsabhängige Effizienz der Konversion konnte ich dieser Arbeit bei der manuellen PMCA gezeigt werden (Kap. 3.1.2) und wurde mittlerweile in zwei kürzlich erschienenen Arbeiten bestätigt (Soto et al., 2005; Kim et al., 2005).

Aufgrund der inhomogenen Ergebnisse mit dem Wasserbad wurde mit einem Microplate Horn der Munich Prion Cycler (MPC) entwickelt, wo der gesamte Boden des Beschallungsbeckens vom Abstrahlkopf der Ultraschallsonotrode besteht, so dass eine homogene Leistungsverteilung erwartet wurde. Die Proben befanden sich in einer mit Plastikfolie versiegelten Mikrotiterplatte, so dass Verluste und Kontaminationen ausgeschlossen werden konnten (Kap. 3.4.3). Es konnte nach 23h Amplifikation eine gleichmäßigere Amplifikation von $3,0 \pm 0,7$ gezeigt werden, wobei kein Abfall der Faktoren am Rand der Platte festzustellen war (Kap. 3.4.4).

Die Detektion von PrPres erfolgte mit Western Blots. Amplifikationsstudien im Mikrotiterformat für high throughput Analysen benötigen ein automatisierbares schneller Durchführbares Detektionssystem wie den ELISA Test. Der ELISA für PrP wurde am Labor mit einer Sensitivität für 0,31ng für rPrP in Puffer etabliert (Kap. 2.2.7). Diese Sensitivität wäre ausreichend für Messung von 1:100 263K in 10% Wt-HM was laut Rechnung eine Menge von 1,23ng in 20 µl Reaktionsansatz haben müsste (Pan et al., 1992). Westernblotmessungen von rPrP und 263k Homogenaten bestätigten diese Rechnung (Daten nicht gezeigt). Leider konnten ELISA Messungen von PrP in Homogenaten im Gegensatz zu Western Blot Messungen (3.1.5) keine quantitativen Aussagen liefern (Kap. 2.2.7.4). Dies lässt sich mit dem Einfluss von Proteinen und

Membranbestandteilen im Homogenat erklären, die möglicherweise eine Störung der PrP-Antikörper-Bindung verursachen. Conformation Dependant Immunoassays (CDI) die für die Diagnose von Prionkrankheiten eingesetzt werden sollen, benutzen deswegen einen PrP-Aufreinigungsschritt mit Phosphowolframsäure (Safar et al., 2005), wobei das Detektionslimit für diesen Ansatz wichtig ist, aber keine Quantifizierung im ng Bereich. Dieser Aufreinigungsschritt wurde auch beim ELISA versucht, hat jedoch eine Quantifizierung der eingesetzten PrP-Menge unmöglich gemacht (Daten nicht gezeigt). Daten zur immunologischen Quantifizierung von PrP in Homogenaten sind in der Literatur nicht zu finden.

Die Automatisierung von Assays zur Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} wurde auch schon mit dem cell free conversion system gezeigt (Breydo et al., 2005), hat aber den Nachteil, dass nur sehr wenig PrPres im Überschuß von PrP^{Sc} zu PrP^C entsteht. Eine Automatisierung der PMCA Methode ist ein sehr wichtiger Schritt für das Massenscreening von potentiellen Therapeutika und wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen gefordert (Supattapone, 2004; Soto et al., 2005). Der Screening Assay hätte mehrere Vorteile. Die PMCA Technik ist in der Lage, Verbindungen zu identifizieren, die direkt an PrP oder potentiellen Kofaktoren binden. Weiterhin ist es möglich die PMCA Methode auf medizinisch relevante Prionen Stämme anzuwenden. Bisher konnten Hamster, Maus, Schaf, Ziege, Maus, BSE, sCJD Typ1, sCJD Typ 2 und vCJD Prionen Stämme mit der PMCA amplifiziert werden (Soto et al., 2005). Screening Tests, die auf Zellkultur basieren, sind hierfür nur bedingt geeignet, da nur wenige Maus und Schaf Prionen Stämme erfolgreich in Zellkultur vermehrt werden konnten. Kürzlich konnte mit einem automatisiertem PMCA System im Mikrotiterformat Prionen erstmals im Blut detektiert werden (Castilla et al., 2005b). Die hierbei verwendete Methode beruht wie auch beim Munich Prion Cyler auf einer Amplifikation in einem microplate horn. Daten zur quantitativen Reproduzierbarkeit in Abhängigkeit von der Position in der Mikrotiterplatte wurden jedoch nicht gezeigt.

Es konnte mit den beiden hier vorgestellten Systemen zum ersten Mal eine Amplifikation von PrPres mit indirekter Sonifikation von verschlossenen Proben und dem Einfluss der Ultraschalleistung auf die Amplifikation gezeigt werden (Sarafoff et al., 2005). Dies zeigte auch, dass die Metalloberfläche der Sonotrode bei der manuellen PMCA keine katalytische Funktion bei der Konversion des Kupferbindenden PrP^C zu PrPres innehat. Der MPC ermöglicht eine homogene Amplifikation von Parallelproben im Mikrotiterformat. Die Entwicklung der ELISA Technologie zur Quantifizierung von PrP in Homogenaten wird in Zukunft ein limitierender Schritt in der Automatisierung der PMCA Reaktion sein.

5 Zusammenfassung

Die Arbeit „Amplifikation von Prionen in vitro“ beruhte auf der Amplifikationsmethode die erstmals 2001 vorgestellt wurde (Saborio et al., 2001). Bei der PMCA wird erstmals PK-resistentes PrPres in ausreichender Menge in vitro hergestellt, welches molekularbiologisch dem Erreger spongiformer Enzephalopathien gleicht. Die PMCA erlaubt somit eine in vitro Untersuchung des pathologischen Umfaltungsprozess von PrP^C zu PrP^{Sc} für diagnostische und therapeutische Studien.

In dieser Arbeit wurden ausgiebig die Einzelschritte der PMCA Methode, insbesondere die Quantifikation der Western Blot Bande und die Auswirkungen der Sonifikationsleistung und der Inkubationszeit auf die Amplifikationseffizienz untersucht. Je nach Stärke der Sonifizierung ändert sich die Effizienz der PMCA Reaktion (Kap.3.1.2) . Eine Amplifikation ohne Sonifikation ist möglich, scheint aber nicht autokatalytisch aktives PrPres zu erzeugen und erfüllt somit nicht die Prion Hypothese 3.1.3 und 4.1). Neues PrPres kann als seed für weitere Amplifikationen dienen (Kap. 3.1.6). Parallelansätze zeigten die Reproduzierbarkeit der PMCA, so dass vergleichende Studien mit unterschiedlichen Reaktionsansätzen einen Vergleich der Amplifikationseffizienz ermöglichen (Kap 3.1.5). Die Intensitätsmessung von Western Blot Banden repräsentiert die Proteinmenge in vitro (Kap. 2.2.6).

Es konnte gezeigt werden, dass PrP^C und PrP^{Sc} essentiell für die Durchführung der Reaktion sind. Somit konnte gezeigt werden, dass die PMCA im Einklang mit der Prionhypothese steht, die besagt, dass ein pathogener PrP^{Sc}-Seed die Umfaltung von nativem PrP^C initiiert. (Kap 3.1.4 und 3.2). Die molekulare Spezifität der PMCA Reaktion wurde hervorgehoben durch die Erkenntnis, dass rPrP die Amplifikation in vitro hemmt (Kap. 3.2, Bieschke et al., 2004).

Prion Proteine binden Kupfer in vivo (Brown et al., 1997a) und in geringerer Affinität auch Ni, Mn und Zn (Jackson et al., 2001). Die Rolle von Metallen bei der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} ist noch nicht endgültig geklärt. In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass bei Zugabe von Mn, Ni und Zink in ca. 10fach physiologischen Konzentrationen von 50µM und unphysiologischen 500µM die PrPres Amplifikation gefördert wird, während Cu keinen Effekt zeigt (Kap. 3.3.1). Gleichzeitig verringern alle Metallionen die Stabilität von neu entstandenem PrPres gegenüber PK (Kap. 3.3.2). Man kann sich den destabilisierten Zustand als ein Metallgebundenes PrP-Zwischenprodukt in der Umfaltung von PrP^C zu PrP^{Sc} vorstellen (Sarafoff et al., 2005).

Die PMCA Reaktion wie von Saborio et al. beschrieben hat einige Nachteile. Man arbeitet mit infektiösem Material in einem offenen System und verursacht eine Kontamination der Sicherheitswerkbank.

Es wurden zwei Systeme zur automatischen Amplifikation im geschlossenen System entwickelt. Der Wasserbadamplifikator sonifizierte zyklisch das temperierte Becken in dem die Proben in einem Schwimmer genau positioniert wurden (Kap. 3.4.1). Es zeigte sich eine maximale Amplifikation von 14fach in der Mitte des Bades wohingegen die Konversionseffizienz zum Rand des Beckens hin gleichmäßig absank (Kap. 3.4.2).

Aufgrund der inhomogenen Ergebnisse mit dem Wasserbad wurde mit einem Microplate Horn der Munich Prion Cyler entwickelt, wo der gesamte Boden des Beschallungsbeckens vom Abstrahlkopf der Ultraschallsonotrode besteht, so dass eine homogene Leistungsverteilung erwartet wurde. Die Proben befanden sich in einer mit Plastikfolie versiegelten Mikrotiterplatte, so dass Verluste und Kontaminationen ausgeschlossen werden konnten (Kap. 3.4.3). Es konnte eine gleichmäßigere Amplifikation von $3,0 \pm 0,7$ gezeigt werden, wobei kein Abfall der Faktoren am Rand der Platte festzustellen war (Kap. 3.4.4).

Es konnte mit den beiden hier vorgestellten Systemen zum ersten Mal eine Amplifikation von PrPres mit indirekter Sonifikation von verschlossenen Proben und dem Einfluss der Ultraschalleistung auf die Amplifikation gezeigt werden (Sarafoff et al., 2005). Dies zeigte auch, dass die Metalloberfläche der Sonotrode bei der manuellen PMCA keine katalytische Funktion bei der Konversion des Kupferbindenden PrP^C zu PrPres innehat. Der Munich Prion Cyler ermöglicht eine homogene Amplifikation von Parallelproben im Mikrotiterformat. Die Entwicklung der ELISA Technologie zur Quantifizierung von PrP in Homogenaten wird in Zukunft ein limitierender Schritt in der Automatisierung der PMCA Reaktion sein (Kap. 2.2.7 und 4.4).

6 Literaturverzeichnis

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

Arnold,J.E., Tipler,C., Laszlo,L., Hope,J., Landon,M., and 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., and Millhauser,G.L. (2000). Identification of the Cu(2+) binding sites in the N-terminal domain of the prion protein by EPR and CD spectroscopy. *Biochemistry* 39, 13760-13771.

Bajorath,J., Hinrichs,W., and Saenger,W. (1988). The enzymatic activity of proteinase K is controlled by calcium. *Eur. J. Biochem.* 176, 441-447.

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

Basler,K., Oesch,B., Scott,M., Westaway,D., Wälchli,M., Groth,D.F., McKinley,M.P., Prusiner,S.B., and Weissmann,C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417-428.

Bellon,A., Seyfert-Brandt,W., Lang,W., Baron,H., Groner,A., and Vey,M. (2003). Improved conformation-dependent immunoassay: suitability for human prion detection with enhanced sensitivity. *J. Gen. Virol.* 84, 1921-1925.

Bendheim,P.E., Barry,R.A., DeArmond,S.J., Stites,D.P., and Prusiner,S.B. (1984). Antibodies to a scrapie prion protein. *Nature* 310, 418-421.

Bernoulli,C., Siegfried,J., Baumgartner,G., Regli,F., Rabinowicz,T., Gajdusek,D.C., and Gibbs,C.J., Jr. (1977). Danger of accidental person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by surgery. *Lancet* 1, 478-479.

Bertsch,U., Winklhofer,K.F., Hirschberger,T., Bieschke,J., Weber,P., Hartl,F.U., Tavan,P., Tatzelt,J., Kretzschmar,H.A., and 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., and Caughey,B. (1995). Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 375, 698-700.

Bieschke,J., Weber,P., Sarafoff,N., Beekes,M., Giese,A., and Kretzschmar,H. (2004). Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 12207-12211.

Bolton,D.C., McKinley,M.P., and Prusiner,S.B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218, 1309-1311.

Bolton,D.C., McKinley,M.P., and Prusiner,S.B. (1984). Molecular characteristics of the major scrapie prion protein. *Biochemistry* 23, 5898-5906.

- Bolton,D.C., Meyer,R.K., and Prusiner,S.B. (1985). Scrapie PrP27-30 is a sialoglycoprotein. *J. Virol.* 53, 596-606.
- Borchelt,D.R., Taraboulos,A., and Prusiner,S.B. (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 267, 16188-16199.
- Breydo,L., Bocharova,O.V., and Baskakov,I.V. (2005). Semiautomated cell-free conversion of prion protein: Applications for high-throughput screening of potential antiprion drugs. *Anal. Biochem.* 339, 165-173.
- Brown P. (1985). Virus sterility for human growth hormone. *Lancet* 2, 729-720.
- Brown,D.R. and Besinger,A. (1998). Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem. J.* 423, 436.
- Brown,D.R., Hafiz,F., Glasssmith,L.L., Wong,B.S., Jones,I.M., Clive,C., and Haswell,S.J. (2000). Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance. *EMBO J* 19, 1180-1186.
- Brown,D.R., Qin,K., Herms,J.W., Madlung,A., Manson,J., Strome,R., Fraser,P., Kruck,T., von Bohlen,A., Schulz-Schaeffer,W., Giese,A., Westaway,D., and Kretzschmar,H. (1997a). The cellular prion protein binds copper *in vivo*. *Nature* 390, 684-687.
- Brown,D.R., Schulz-Schaeffer,W.J., Schmidt,B., and Kretzschmar,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,P., Preece,M.A., and Will,R.G. (1992). Friendly fire in medicine. Hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 340, 24-27.
- Bruce,M.E., Will,R.G., Ironside,J.W., McConnell,I., Drummond,D., Suttie,A., McCardie,L., Chree,A., Hope,J., Birkett,C., Cousens,S., Fraser,H., and Bostock,C.J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389, 489-501.
- Buchanan,C.R., Preece,M.A., and Milner,R.D.G. (1991). Mortality, neoplasia, and Creutzfeldt-Jakob disease in patients treated with human pituitary growth hormone in the United Kingdom. *Br. Med. J.* 302, 824-828.
- Büeler,H., Fischer,M., Lang,Y., Bluethmann,H., Lipp,H.-P., DeArmond,S.J., Prusiner,S.B., Aguet,M., and Weissmann,C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582.
- Castilla,J., Saa,P., Hetz,C., and Soto,C. (2005a). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell* 121, 195-206.
- Castilla,J., Saa,P., and Soto,C. (2005b). Detection of prions in blood. *Nat. Med.* 11, 982-985.
- Caughey,B. (1993). Scrapie associated PrP accumulation and its prevention: insights from cell culture. *British Medical Bulletin* 49, 860-872.
- Caughey,B. and Chesebro,B. (1997). Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathies. *Trends in Cell Biology* 7, 56-63.
- Caughey,B. and Raymond,G.J. (1993). Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP

accumulation in cultured cells. *J. Virol.* 67, 643-663.

Caughey,B., Raymond,L.D., Raymond,G.J., Maxson,L., Silveira,J., and Baron,G.S. (2003). Inhibition of protease-resistant prion protein accumulation in vitro by curcumin. *J. Virol.* 77, 5499-5502.

Caughey,B.W., Dong,A., Bhat,K.S., Ernst,D., Hayes,S.F., and Caughey,W.S. (1991). Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30, 7672-7679.

Centers for Disease Control. Probable variant Creutzfeldt-Jakob Disease in a U.K. Citizen Who Had Temporarily Resided in Texas, 2001-2005.
http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/vcjd/other/probablevcjd_texas2001_2005_111805.htm . 18-11-2006.

Ref Type: Generic

Chandler,R.L. (1961). Encephalopathy in mice produced bby inoculation with scrapie brain material. *Lancet* 1, 1378-1379.

Chazot,G., Broussolle,E., Lapras,C.I., Blättler,T., Aguzzi,A., and Kopp,N. (1996). New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. *Lancet* 347, 1181.

Chesebro,B., Race,R., Wehrly,K., Nishio,J., Bloom,M., Lechner,D., Bergstrom,S., Robbins,K., Mayer,L., Keith,J.M., Garon,C., and Haase,A. (1985). Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* 315, 331-333.

Collinge,J., Beck,J., Campbell,T., Estibeiro,K., and Will,R.G. (1996a). Prion protein gene analysis in new variant cases of Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 348, 56.

Collinge,J., Sidle,K.C.L., Meads,J., Ironside,J., and Hill,A.F. (1996b). 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.L., Smith,C.J., Palmer,M.S., Clarke,A.R., and Jefferys,J.G.R. (1994). Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370, 295-297.

Come,J.H., Fraser,P.E., and 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.

Cuille,J. and Chelle,P.L. (1936). Pathologie animale. La maladie dite tremblante du moutton est-elle inoculable? *C. R. Acad. Sci. (III)* 26, 1552-1554.

Davanipour,Z., Goodman,L., Alter,M., Sobel,E., Asher,D., and Gajdusek,D.C. (1984). Possible modes of transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* 311, 1582-1583.

Deleault,N.R., Lucassen,R.W., and Supattapone,S. (2003). RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* 425, 717-720.

Demaimay,R., Chesebro,B., and Caughey,B. (2000). Inhibition of formation of protease-resistant prion protein by Trypan Blue, Sirius Red and other Congo Red analogs. *Arch. Virol. Suppl* 277-283.

- Dodelet, V.C. and 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., and 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.
- Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., DeVoe, A.G., Streeten, B., and Cowen, D. (1974). Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N. Engl. J. Med.* 290, 692-693.
- Ehlers, B. and Diringer, H. (1984). Dextran sulphate 500 delays and prevents mouse-scrapie by impairment of agent replication in spleen. *J. Gen. Virol.* 65, 1325-1330.
- Eigen, M. (1996). Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophysical Chemistry* 63, A1-A18.
- Farquhar CF and Dickinson AG. (1986). Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection. *J Gen Virol. Mar* 67, 463-467.
- Field, E.J. (1969). Slow virus infections of the nervous system. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 8, 129-239.
- Finkenstaedt, M., Szudra, A., Zerr, I., Poser, S., Hise, J.H., Stoebner, J.M., and Weber, T. (1996). MR imaging of Creutzfeldt-Jakob disease. *Radiology* 199, 793-798.
- Flechsig, E., Hegyi, I., Enari, M., Schwarz, P., Collinge, J., and Weissmann, C. (2001). Transmission of Scrapie by Steel-surface-bound Prions. *Mol. Med.* 7, 679-684.
- Fournier, J.-G., Escaig-Haye, F., De Villemeur, T.B., and Robain, O. (1995). Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrP_c) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences* 318, 339-344.
- Fradkin, J.E., Schonberger, L.B., Mills, J.L., Gunn, W.J., Piper, J.M., Wysowski, D.K., Thomson, R., Durako, S., and Brown, P. (1991). Creutzfeldt-Jakob disease in pituitary growth hormone recipients in the United States. *JAMA* 265, 880-884.
- Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J., and Alpers, M. (1966). Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* 209, 794-796.
- Gajdusek, D.C. and Zigas, V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea. The endemic occurrence of "kuru" in the native population. *N. Engl. J. Med.* 257, 974-978.
- Gerstmann, J., Strüssler, E., and Scheinker, I. (1936). Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z. Neurol.* 154, 736-762.
- Giese, A., Levin, J., Bertsch, U., and Kretzschmar, H. (2004). Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 1240-1246.
- Gordon, W.S. (1946). Advances in veterinary research. Looping-ill, tickborne fever and scrapie. *Vet. Rec.* 58, 516-525.
- Griffith, J.S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043-1044.
- Hanson, R.P., Eckroade, R.J., Marsh, R.F., ZuRhein, G.M., Kanitz, C.L., and Gustafson, D.P. (1971).

Susceptibility of mink to sheep scrapie. *Science* 172, 859-861.

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

Harris,D.A., Lele,P., and Snider,W.D. (1993). Localization of the messenger RNA for a chicken prion protein by insitu hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4309-3796.

Hasnain SS,M.L.S.R.G.J.C.A.J.G.C.J. (2001). XAFS study of the high-affinity copper-binding site of human PrP(91-231) and its low-resolution structure in solution. *J Mol Biol.* 311(3): 467-473.

Herms,J., Tings,T., Gall,S., Madlung,A., Giese,A., Siebert,H., Schurmann,P., Windl,O., Brose,N., and Kretzschmar,H. (1999). Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.* 19, 8866-8875.

Herms,J.W., Kretzschmar,H.A., Titz,S., and Keller,B.U. (1995). Patch-clamp analysis of synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells of prion protein knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 7, 2508-2512.

Herms,J.W., Tings,T., Dunker,S., and Kretzschmar,H.A. (2001). Prion Protein Affects Ca(2+)-Activated K(+) Currents in Cerebellar Purkinje Cells. *Neurobiol. Dis.* 8, 324-330.

Hill,A., Desbruslais,M., Joiner,S., Sidle,K.C., Gowland,I., and Collinge,J. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* 389, 448-450.

Hill,A.F., Butterworth,R.J., Joiner,S., Jackson,G., Rossor,M.N., Thomas,D.J., Frosch,A., Tolley,N., Bell,J.E., Spencer,M., King,A., Al-Sarraj,S., Ironside,J.W., Lantos,P.L., and Collinge,J. (1999). Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet* 353, 183-189.

Hornshaw, M.P., McDermott,J.R., Candy,J.M., and Lakey,J.H. (1995). Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: Structural studies using synthetic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214, 993-999.

Hsich,G., Kenney,K., Gibbs,C.J., Lee,K.H., and Harrington,M.G. (1996). The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N. Engl. J. Med.* 335, 924-930.

Ingrosso,L., Ladogana,A., and Pocchiari,M. (1995). Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters. *J. Virol.* 69, 506-508.

Jackson,G.S., Murray,I., Hosszu,L.L., Gibbs,N., Waltho,J.P., Clarke,A.R., and Collinge,J. (2001). Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Jakob,A. (1921). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Dtsch. Z. Nervenheilkd.* 70, 132-146.

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

Kascsak,R.J., Rubenstein,R., Merz,P.A., Tonna-DeMasi,M., Fersko,R., Carp,R.I., Wisniewski,H.M.,

- and Diring, H. (1987a). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.* *61*, 3688-3693.
- Kascsak, R.J., Rubenstein, R., Merz, P.A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R.I., Wisniewski, H.M., and Diring, H. (1987b). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.* *61*, 3688-3693.
- Kim, N.H., Choi, J.K., Jeong, B.H., Kim, J.I., Kwon, M.S., Carp, R.I., and Kim, Y.S. (2005). Effect of transition metals (Mn, Cu, Fe) and deoxycholic acid (DA) on the conversion of PrPC to PrPres. *FASEB J.*
- Kimberlin, R.H. and Walker, C.A. (1986). Suppression of scrapie infection in mice by heteropolyanion 23, dextran sulphate and some other polyanions. *Antimicrob. Agents Chemother.* *30*, 409-413.
- Kirkwood, J.K., Wells, G.A., Wilesmith, J.W., Cunningham, A.A., and Jackson, S.I. (1990). Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Vet. Rec.* *127*, 418-420.
- Kitamoto, T., Tateishi, J., Tashima, T., Takeshita, I., Barry, R.A., DeArmond, S.J., and Prusiner, S.B. (1986). Amyloid plaques in Creutzfeldt-Jakob disease stain with prion protein antibodies. *Ann. Neurol.* *20*, 204-208.
- Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T., and Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* *370*, 471-473.
- Kocisko, D.A., Priola, S.A., Raymond, G.J., Chesebro, B., Lansbury, P.T., and 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*, 3923-3927.
- Kramer, M.L., Kratzin, H.D., Schmidt, B., Romer, A., Windl, O., Liemann, S., Hornemann, S., and Kretzschmar, H. (2001). Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J. Biol. Chem.* *276*, 16711-16719.
- Krasemann, S., Groschup, M.H., Harmeyer, S., Hunsmann, G., and Bodemer, W. (1996). Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP^{0/0} mice. *Mol. Medicine* *2*, 725-734.
- Kretzschmar, H.A., Ironside, J.W., DeArmond, S.J., and Tateishi, J. (1996). Diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Neurol.* *53*, 913-920.
- Kretzschmar, H.A., Prusiner, S.B., Stowring, L.E., and DeArmond, S.J. (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am. J. Pathol.* *122*, 1-5.
- Kretzschmar, H.A., Tings, T., Madlung, A., Giese, A., and Herms, J. (2000). Function of PrP(C) as a copper-binding protein at the synapse. *Arch. Virol. Suppl* 239-249.
- Lasmezas, C.I. (2003). Putative functions of PrP(C). *Br. Med. Bull.* *66*, 61-70.
- Lasmézas, C.I., Deslys, J.-P., Demalmay, R., Adjou, K.T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J., and Hauw, J.-J. (1996). BSE transmission to macaques. *Nature* *381*, 743-744.
- Laszlo, L., Lowe, J., Self, T., Kenward, N., Landon, M., McBride, T., Farquhar, C., McConnell, I., Brown, J., Hope, J., and Mayer, R.J. (1992). Lysosomes as key organelles in the pathogenesis of prion encephalopathies. *J. Pathol.* *166*, 333-341.

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

Lehmann,S. (2002). Metal ions and prion diseases
6. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 187-192.

Lledo,P.M., Tremblay,P., DeArmond,S.J., Prusiner,S.B., and Nicoll,R.A. (1996). Mice deficient for prion protein exhibit normal neuronal excitability and synaptic transmission in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 2403-2407.

Lopez,G.F., Zahn,R., Riek,R., and Wuthrich,K. (2000). NMR structure of the bovine prion protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 8334-8339.

Lorains,J.W., Henry,C., Agbamu,D.A., Rossi,M., Bishop,M., Will,R.G., and Ironside,J.W. (2001). Variant Creutzfeldt-Jakob disease in an elderly patient. *Lancet* 357, 1339-1340.

Lucassen,R., Nishina,K., and Supattapone,S. (2003). In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl groups. *Biochemistry* 42, 4127-4135.

Madore,N., Smith,K.L., Graham,C.H., Jen,A., Brady,K., Hall,S., and Morris,R. (1999). Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *EMBO J.* 18, 6917-6926.

Manetto,V., Medori,R., Cortelli,P., Montagna,P., Tinuper,P., Baruzzi,A., Rancurel,G., Hauw,J.J., Vanderhaeghen,J.J., Mailloux,P., Bugiani,O., Tagliavini,F., Bouras,C., Rizzuto,N., Lugaresi,E., and Gambetti,P. (1992). Fatal familial insomnia: Clinical and pathologic study of five new cases. *Neurology* 42, 312-319.

Manson,J., McBride,P., and Hope,J. (1992a). Expression of the PrP gene in the brain of *sync* congenic mice and its relationship to the development of scrapie. *Neurodegeneration* 1, 45-52.

Manson,J., West,J.D., Thomson,V., McBride,P., Kaufman,M.H., and Hope,J. (1992b). 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., and 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. and 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., and Gibbs,C.J., Jr. (1981). The familial occurrence of Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease. *Brain* 104, 535-558.

Masullo,C., Pocchiari,M., Macchi,G., Alemá,G., Piazza,G., and Panzera,M.A. (1989). Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by dural cadaveric graft. *J. Neurosurg.* 71, 954-955.

McKenzie,D., Bartz,J., Mirwald,J., Olander,D., Marsh,R., and Aiken,J. (1998). Reversibility of scrapie inactivation is enhanced by copper. *J. Biol. Chem.* 273, 25545-25547.

Merz,P.A., Somerville,R.A., Wisniewski,H.M., and Iqbal,K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 54, 63-74.

- 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., and et al (1999). Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J. Mol. Biol.* 292, 797-818.
- Moser,M., Colello,R.J., Pott,U., and Oesch,B. (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 14, 509-517.
- Nisbet,T.J., MacDonaldson,I., and Bishara,S.N. (1989). Creutzfeldt-Jakob disease in a second patient who received a cadaveric dura mater graft. *JAMA* 261, 1118.
- Nishida,N., Katamine,S., Shigematsu,K., Nakatani,A., Sakamoto,N., Hasegawa,S., Nakaoka,R., Atarashi,R., Kataoka,Y., and Miyamoto,T. (1997). Prion protein is necessary for latent learning and long-term memory retention. *Cell. Mol. Neurobiol.* 17, 537-545.
- Nishina,K., Deleault,N.R., Lucassen,R.W., and Supattapone,S. (2004). In vitro prion protein conversion in detergent-solubilized membranes. *Biochemistry* 43, 2613-2621.
- Oesch,B., Westaway,D., Wälchli,M., McKinley,M.P., Kent,S.B.H., Aebersold,R., Barry,R.A., Tempst,P., Teplow,D.B., Hood,L.E., Prusiner,S.B., and Weissmann,C. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40, 735-746.
- Pan,K.M., Baldwin,M., Nguyen,J., Gasset,M., Serban,A., Groth,D., Mehlhorn,I., Huang,Z., Fletterick,R.J., Cohen,F.E., and Prusiner,S.B. (1993). Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10962-10966.
- Pan,K.M., Stahl,N., and Prusiner,S.B. (1992). Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Sci.* 1, 1343-1352.
- 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., and Kretzschmar,H. (1999). Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann. Neurol.* 46, 224-233.
- Pauly,P.C. and Harris,D.A. (1998). Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J. Biol. Chem.* 273, 33107-33111.
- Piening,N., Weber,P., Giese,A., and Kretzschmar,H. (2005). Breakage of PrP aggregates is essential for efficient autocatalytic propagation of misfolded prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 339-343.
- Pocchiari,M., Schmittinger,S., and Masullo,C. (1987). Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters. *J. Gen. Virol.* 68, 219-223.
- Priola,S.A. (1999). Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomed. Pharmacotherapy* 53, 27-33.
- 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., McKinley,M.P., Bowman,K.A., Bolton,D.C., Bendheim,P.E., Groth,D.F., and Glenner,G.G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35, 349-358.

Qin,K., Yang,D.S., Yang,Y., Chishti,M.A., Meng,L.J., Kretzschmar,H.A., Yip,C.M., Fraser,P.E., and Westaway,D. (2000). Copper(II)-induced conformational changes and protease resistance in recombinant and cellular PrP. Effect of protein age and deamidation. *J Biol Chem* 275, 19121-19131.

Riek,R., Hornemann,S., Wider,G., Glockshuber,R., and Wüthrich,K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* 413, 282-386.

Saborio,G.P., Permanne,B., and Soto,C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810-813.

Safar,J., Roller,P.P., Gajdusek,D.C., and Gibbs,C.J. (1993). Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J. Biol. Chem.* 268, 20276-20284.

Safar,J.G., Geschwind,M.D., Deering,C., Didorenko,S., Sattavat,M., Sanchez,H., Serban,A., Vey,M., Baron,H., Giles,K., Miller,B.L., DeArmond,S.J., and Prusiner,S.B. (2005). Diagnosis of human prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 3501-3506.

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., and Noda,T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380, 528-531.

Sales,N., Rodolfo,K., Hassig,R., Faucheux,B., DiGiamberardino,L., and Moya,K.L. (1998). Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2464-2471.

Sarafoff,N.I., Bieschke,J., Giese,A., Weber,P., Bertsch,U., and Kretzschmar,H.A. (2005). Automated PrPres amplification using indirect sonication. *J. Biochem. Biophys. Methods* 63, 213-221.

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

Sethi S., Lipford G., Wagner H., and Kretzschmar,H. (2002). Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet* 360, 229-230.

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., and Tagliavini,F. (2005). Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *FEBS Lett.* 579, 638-642.

Soto,C., Kascsak,R.J., Saborio,G.P., Aucouturier,P., Wisniewski,T., Prelli,F., Kascsak,R., Mendez,E., Harris,D.A., Ironside,J., Tagliavini,F., Carp,R.I., and Frangione,B. (2000). Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides. *Lancet* 355, 192-197.

Spielhauer,C. and Schatzl,H.M. (2001). PrPc directly interacts with proteins involved in signaling pathways. *J. Biol. Chem.*

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

Steinhoff,B.J., Räcker,S., Herrendorf,G., Poser,S., Grosche,S., Zerr,I., Kretzschmar,H.A., and

- Weber, T. (1996). Accuracy and reliability of periodic sharp wave complexes in Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Neurol.* 53, 162-166.
- Stöckel, J., Safar, J., Wallace, A.C., Cohen, F.E., and Prusiner, S.B. (1998). Prion protein selectively binds copper (II) ions. *Biochem.* 37, 7185-7193.
- Supattapone, S. (2004). Prion protein conversion in vitro. *J Mol. Med.*
- Tagliavini, F., Forloni, G., Colombo, L., Rossi, G., Girola, L., Canciani, B., Angeretti, N., Giampaolo, L., Peressini, E., Awan, T., De Gioia, L., Ragg, E., Bugiani, O., and Salmona, M. (2000). Tetracycline affects abnormal properties of synthetic PrP peptides and PrP(Sc) in vitro. *J Mol Biol* 300, 1309-1322.
- Tagliavini, F., McArthur, R.A., Canciani, B., Giaccone, G., Porro, M., Bugiani, M., Lievens, P.M.J., Bugiani, O., Peri, E., Dall'Ara, P., and et al. (1997). Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters. *Science* 276, 1119-1122.
- Taraboulos, A., Raeber, A.J., Borchelt, D.R., Serban, D., and Prusiner, S.B. (1992). Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol. Biol. Cell* 3, 851-863.
- Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., and 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.
- Thadani, V., Penar, P.L., Partington, J., Kalb, R., Janssen, R., Schonberger, L.B., Rabkin, C.S., and Prichard, J.W. (1988). Creutzfeldt-Jakob disease probably acquired from a cadaveric dura mater graft. Case report. *J. Neurosurg.* 69, 766-769.
- Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rütlicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A., and Manson, J.C. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380, 639-642.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Vassallo, N. and Herms, J. (2003). Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J. Neurochem.* 86, 538-544.
- Verbraucherministerium Deutschland (2005). Anzahl der bestätigten BSE-Fälle in Deutschland. <http://www.verbraucherministerium.de/verbraucher/bse/anzahlbse.htm>.
- Vorberg, I. and Priola, S.A. (2002). Molecular basis of scrapie strain glycoform variation 2. *J Biol. Chem.*
- Waggoner, D.J., Drisaldi, B., Bartnikas, T.B., Casareno, R.L., Prohaska, J.R., Gitlin, J.D., and Harris, D.A. (2000). Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J. Biol. Chem.* 275, 7455-7458.
- Weber, T., Poser, S., and Kretzschmar, H.A. (1994). Prionkrankheiten - heutiger Wissensstand. *Dtsch. Ärztebl.* 44, 2226-2232.
- Weissmann, C. (1996). Molecular biology of transmissible spongiform encephalopathies. *FEBS Lett.* 389, 3-11.

- Wells,G.A.H., Scott,A.C., Johnson,C.T., Gunning,R.F., Hancock,R.D., Jeffrey,M., Dawson,M., and Bradley,R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* 121, 419-420.
- Will,R.G., Ironside,J.W., Zeidler,M., Cousens,S.N., Estibeiro,K., Alperovitch,A., Poser,S., Pocchiari,M., Hofman,A., and Smith,P.G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347, 921-925.
- Will,R.G. and Matthews,W.B. (1982). Evidence for case-to-case transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 45, 235-238.
- Williams,E.S. and Young,S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* 16, 89-98.
- Windl,O. and Kretzschmar,H.A. (2000). Prion Diseases. *Contemporary Neurology (Neurogenetics)* 57, 191-218.
- Wong,B.S., Chen,S.G., Colucci,M., Xie,Z., Pan,T., Liu,T., Li,R., Gambetti,P., Sy,M.S., and Brown,D.R. (2001). Aberrant metal binding by prion protein in human prion disease. *J. Neurochem.* 78, 1400-1408.
- World organisation for animal health (OIE) (2005). Number of cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) reported in the United Kingdom. http://www.oie.int/eng/info/en_esbru.htm.
- Wyatt,J.M., Pearson,G.R., Smerdon,T.N., Gruffydd-Jones,T.J., Wells,G.A.H., and Wilesmith,J.W. (1991). Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Vet. Rec.* 129, 233-236.
- Zeidler,M., Johnstone,E.C., Bamber,R.W.K., Dickens,C.M., Fisher,C.J., Francis,A.F., Goldbeck,R., Higgo,R., Johnson-Sabine,E.C., Lodge,G.J., and et al. (1997a). New variant Creutzfeldt-Jacob disease: psychiatric features. *Lancet* 350, 908-910.
- Zeidler,M., Sellar,R.J., Collie,D.A., Knight,R., Stewart,G., Macleod,M.A., Ironside,J.W., Cousens,S., Colchester,A.C., Hadley,D.M., Will,R.G., and Colchester,A.F. (2000). The pulvinar sign on magnetic resonance imaging in variant Creutzfeldt- Jakob disease. *Lancet* 355, 1412-1418.
- Zeidler,M., Stewart,G.E., Barraclough,C.R., Bateman,D.E., Bates,D., Burn,D.J., Colchester,A.C., Durward,W., Fletcher,N.A., Hawkins,S.A., and et al. (1997b). New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet* 350, 903-907.
- Zerr,I., Helmhold,M., Poser,S., Armstrong,V.W., and Weber,T. (1996). Apolipoprotein E phenotype frequency and cerebrospinal fluid concentration are not associated with Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch. Neurol.* 53, 1233-1238.
- Zerr,I., Schulz-Schaeffer,W.J., Giese,A., Bodemer,M., Schroter,A., Henkel,K., Tschampa,H.J., Windl,O., Pfahlberg,A., Steinhoff,B.J., Gefeller,O., Kretzschmar,H.A., and Poser,S. (2000). Current clinical diagnosis in Creutzfeldt-Jakob disease: identification of uncommon variants. *Ann. Neurol.* 48, 323-329.
- Zobeley,E., Flechsig,E., Cozzio,A., Enari,M., and Weissmann,C. (1999). Infectivity of scrapie prions bound to a stainless steel surface + Kommentar zu diesem Artikel von David M. Taylor. *Mol. Medicine* 5, 240-243.

7 Anhang

7.1 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Zentrums für Neuropathologie und Prionforschung bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Prof. Dr. med. Hans Kretzschmar für die ausgezeichneten Forschungsbedingungen am ZNP und der konstanten Unterstützung über zweieinhalb Jahre.

Meinen Betreuern Dr. rer. nat. Jan Bieschke und Dr. med. Armin Giese möchte ich für den Enthusiasmus und der Geduld danken mit dem sie mir wissenschaftliches Arbeiten beibrachten. Sie waren immer außerordentlich hilfsbereit und voller konstruktiver Vorschläge.

Ich bedanke mich bei der Förderung für Forschung und Lehre der LMU (FöFoLe) für die Aufnahme in das Promotionsstudium „Molekulare Medizin“, in dessen Rahmen diese Arbeit entstanden ist.

Ich danke meinen Eltern Dipl. Biochem. Marina und Dipl. Ing. Nikola Sarafoff für ihre Unterstützung, Weisheit und ihrer Liebe.

7.2 Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Nikolaus Sarafoff
 Geburtsdatum: 20.10.77 in München
 Familienstand: ledig
 Nationalität: Deutsch

Schulbildung / Zivildienst

09/84 - 07/88 Grundschole an der Rotbuchenstraße, München
 09/88 - 07/92 Maria-Theresia-Gymnasium, München
 09/92 - 07/97 Gymnasium Unterhaching mit Abitur
 Abiturfächer: Physik, Chemie (LK), Französisch, Wirtschaftsinformatik (GK)
 08/97 - 08/98 Zivildienst: Rettungssanitäter beim Arbeiter-Samariter-Bund München

Studium

seit 11/98 Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians Universität in München
 08/00 Physikum
 08/01 1. Staatsexamen
 10/01 - 04/03 Promotionsstudium "Molekulare Medizin"
 03/04 2. Staatsexamen
 06/05 3. Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

seit 08/05 Assistenzarzt am Deutschen Herzzentrum München, Kardiologische Klinik

Promotion

12/01 - 06/05 Promotion am Institut für Neuropathologie LMU München (Prof. Kretschmar)
 Titel: Amplifikation von Prionen in vitro
 als Stipendiat des Promotionsstudiums „Molekulare Medizin“ (FöFoLe)

Praktisches Jahr

04/04 - 07/04 1. Tertial Innere Medizin Harvard Medical School (Boston, USA)
 Massachusetts General Hospital
 Mt. Auburn Hospital
 als Stipendiat der Munich-Harvard-Alliance
 08/04 - 11/04 2. Tertial Chirurgie Medical Faculty (Sofia, Bulgarien)
 St. Ekaterina Hospital (Herzchirurgie)
 Pirogoff Hospital (Allgemeinchirurgie)
 12/04 - 03/05 3. Tertial Neurologie Ludwig-Maximilians Universität (München)
 Klinikum Großhadern

Praktika /Studienbegleitende Tätigkeiten

09/99 - 04/00	Studentische Hilfskraft am Institut für med. Psychologie	(Prof. Pöppel)
09/00	Famulatur Akupunktur am Peking University First Hospital	(Peking, China)
04/01	Famulatur Neurochirurgie, Klinikum Großhadern München	(Prof. Tonn)
05/01 - 08/01	Studentische Hilfskraft am Generation Research Program	(Prof. Pöppel)
10/01 - 02/02	Co-Assistent im Präparierkurs der anatomischen Anstalt München	(Prof. Putz)
08/02	Famulatur Allgemeinmedizin, Dr. Koll	(München)
09/02	Famulatur Innere Medizin Elisabeth Krankenhaus	(Berlin)
03/03	Famulatur Allgemein Chirurgie, Bellevue Hospital, NYU	(New York, USA)
05/03 - 11/03	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Neuropathologie	(München)

Ehrenamtliche Aktivitäten / Sonstiges

seit 1989	Mitglied beim Verein Deutscher Pfadfinderinnen und Pfadfinder (VCP)
	1993-2000: Mitarbeit bei der Stammesleitung
10/97 - 10/00	Vorsitzender des Jugendausschusses der Emmauskirche München
06/99 - 12/01	Gründungsmitglied und Vorsitzender der Biotechnologischen Studenteninitiative e.V. München (www.bts-ev.de)
11/01	stellvertretender Projektleiter und Pressesprecher der ScieCon München 2001, der größten deutschen Kontaktmesse für LifeSciences

Sonstige Kenntnisse

08/00 und 7/01	Teilnahme an Rhetorik Seminaren
Sprachen:	Deutsch Muttersprache
	Englisch sehr gute Kenntnisse in Wort und Schrift
	Französisch fortgeschrittene Kenntnisse in Wort und Schrift
Hobbies:	Sport (Joggen, Schwimmen, Basketball, Snowboardfahren)
	Theater
	moderne Kunst

7.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Diese Dissertation wurde selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, den

.....
(Nikolaus Sarafoff)

Dissertation eingereicht am: 29.03.2006