

Aus der Klinik für Neurologie

(Prof. Dr. med. M. Bähr)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Heterogenität von Prionprotein-Isoformen im
Liquor cerebrospinalis von Patienten mit
verschiedenen Typen von Prionenerkrankungen:
Eine Charakterisierung unter Betrachtung zwölf
monoklonaler PrP-Antikörper**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Markus Schlomm

aus

Werl in Westfalen

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Referent/in: Prof. Dr. med. I. Zerr

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Heterogenität von Prionprotein-Isoformen im Liquor cerebrospinalis von Patienten mit verschiedenen Typen von Prionenerkrankungen: Eine Charakterisierung unter Betrachtung 12 monoklonaler PrP-Antikörper" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 05.05.2021

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Schmitz M, **Schlomm M**, Hasan B, Beekes M, Mitrova E, Korth C, Breil A, Carimalo J, Gawinecka J, Varges D, Zerr I (2010): Codon 129 polymorphism and the E200K mutation do not affect the cellular prion protein isoform composition in the cerebrospinal fluid from patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Eur J Neurosci* 11, 2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einleitung	1
1.1 Prionenerkrankungen.....	1
1.1.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE).....	1
1.1.2 Humane Prionenerkrankungen.....	2
1.1.3 Klinische und apparative Diagnostik der CJD.....	6
1.2 Prionen im Nervensystem.....	10
1.2.1 Die physiologische Rolle des zellulären Prionproteins	10
1.2.2 Die <i>Protein-only</i> -Hypothese	10
1.3 Das Prionprotein	11
1.3.1 Vorkommen des zellulären Prionproteins	11
1.3.2 Das PRNP-Gen.....	12
1.3.3 Chemische Struktur des PrP ^c	13
1.3.4 Strukturvergleich von PrP ^c und PrP ^{Sc}	16
1.3.5 Konversion von PrP ^c zu PrP ^{Sc}	17
1.4 Ziele der Arbeit.....	18
2. Material und Methoden	20
2.1 Patienten und Probensammlung	20
2.2 Materialien und Geräte	21
2.2.1 Chemikalien	21
2.2.2 Puffer und Lösungen.....	22
2.2.3 Apparaturen	22
2.2.4 Verbrauchsmaterialien.....	23
2.3 Antikörper	24
2.3.1 Primäre Antikörper.....	24

2.3.2 Sekundärer Antikörper.....	25
2.4 Enzymatische Deglykosylierung von PrP ^c	25
2.5 Bestimmung der PrP-Konzentration	26
2.6 Proteinase K-Verdau	26
2.7 Western Blot.....	26
2.8 Statistische Analyse.....	27
3. Ergebnisse.....	29
3.1 Analyse von PrP ^c -Glykoformen in humanem Liquor und Bestimmung ihrer Nachweisgrenzen	28
3.2 Charakterisierung der PrP ^c -Bandenmuster mittels zwölf verschiedener monoklonaler Antikörper.....	29
3.3 Einfluss des PRNP-Codon-129-Polymorphismus auf die Glykosylierung und Prozessierung von PrP ^c	35
4. Diskussion.....	42
4.1 Heterogenität von PrP ^c	42
4.2 Nachweis unterschiedlicher PrP ^c -Isoformen in humanem Liquor.....	42
4.3 Vergleich von PrP ^c -Isoformen im Liquor verschiedener Typen humaner Prionenerkrankungen.....	44
5. Zusammenfassung.....	47
6. Literaturverzeichnis	48

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: TEM-Aufnahme der Prionprotein-Akkumulation	2
Abbildung 2: PrP-Typisierung nach Proteinase K-Verdau	4
Abbildung 3: Elektroenzephalogramm bei CJD	7
Abbildung 4: Transversale cMRT-Serien von zwei CJD-Patienten	8
Abbildung 5: Histopathologische Veränderungen bei CJD	9
Abbildung 6: Das PRNP-Gen	12
Abbildung 7: Organisation des humanen PrP	13
Abbildung 8: Lokalisation und Verankerung des zellulären Prionproteins	14
Abbildung 9: Topologie der PrP ^c -Glykosylierung	15
Abbildung 10: Biosynthese des Prionproteins und posttranslationale Modifikationen	16
Abbildung 11: Konversion des zellulären Prionproteins	17
Abbildung 12: Mechanismus der PrP ^c -Fehlfaltung	18
Abbildung 13: Materialanordnung in der Blotting-Maschine nach der <i>Semi-dry</i> - Methode.....	27
Abbildung 14: Nachweis von PrP ^c in einer Verdünnungsreihe von CSF mittels Western Blot	29
Abbildung 15: Analyse der Glykosylierungsmuster zellulären Prionproteins.....	31
Abbildung 16: Spezifitätsüberprüfung der PrP-Detektion mittels der Antikörper SAF32 und SAF84	32
Abbildung 17: Deglykosylierung von PrP ^c in humanem Liquor	33
Abbildung 18: Vergleichende Western-Blot-Analyse des Codon-129-Polymorphismus (MM, MV und VV) anhand des Antikörpers 3F4.....	35
Abbildung 19: Western-Blot-Analyse der Liquorproben zweier Kontrollen unterschiedlichen Geschlechts	35
Abbildung 20: Vergleichende Analyse von PrP ^c -Isoformen im CSF verschiedener Typen humaner Prionenerkrankungen	38
Abbildung 21: Schematische Darstellung der detektierten PrP ^c -Spaltprodukte.....	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Häufigkeit der Genotypen an Codon 129 bei sCJD-Erkrankten und in der Normalbevölkerung.....	5
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und ihre Herstellerfirmen.....	21
Tabelle 3: Verwendete Apparaturen und ihre Herstellerfirmen.	22
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 5: Verwendete monoklonale PrP-Antikörper.....	23
Tabelle 6: Verwendete sekundäre Antikörper.....	25

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CJD	<i>Creutzfeldt-Jakob Disease</i>
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i>
ECL	<i>enhanced chemi luminescence</i>
EEG	Elektroenzephalographie
fCJD	<i>familial Creutzfeldt-Jakob Disease</i>
FFI	<i>fatal familial insomnia</i>
FL-PrP	<i>full length prion protein</i>
gCJD	<i>genetic Creutzfeldt-Jakob Disease</i>
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol Anker
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
MM	Methionin/Methionin
MoPrP	Maus Prionprotein
MRT	Magnetresonanztomographie
MV	Methionin/Valin
N-Terminus	Amino-Terminus
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PK	Proteinase K
PNGase F	Peptid N Glykosidase F
PRNP-Gen	Prionprotein Gen
PrP	Prionprotein
PrP ^c	zelluläres Prionprotein
PrP ^{res}	Protease resistentes Prionprotein
PrP ^{Sc}	<i>Scrapie</i> Prionprotein
PVDF	Polyvinyliden Difluorid
rPrP	rekombinantes Prionprotein
RT-QuIC	<i>real-time quaking induced conversion</i>
sCJD	<i>sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease</i>
SDS-PAGE	<i>Sodiumdodecylsulfate Polyacrylamid Gelelectrophoresis</i>
sPrP ^{Sc}	<i>soluble infectious Scrapie prion protein</i>
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
vCJD	<i>new variant Creutzfeldt-Jakob Disease</i>

1. Einleitung

1.1 Prionenerkrankungen

1.1.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE)

Hinter den Begriffen Prionenerkrankungen oder transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) verbergen sich tödliche neurodegenerative Syndrome, die genetische, infektiöse und sporadische Formen umfassen (Kuczius et al. 2007). Die infektiösen Formen umfassen die iatrogene Form und die Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD), bei der eine Parallele zur bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) diskutiert wurde (Collinge 1999). Neben allgemeinen neuropathologischen Merkmalen wie der spongiformen Degeneration, der Gliose und dem neuronalen Untergang innerhalb des zentralen Nervensystems sind Prionenerkrankungen durch eine Akkumulation von Prionen im ZNS betroffener Individuen charakterisiert.

Der Begriff Prion entstammt der ursprünglichen englischen Bezeichnung *proteinaceous infectious agent*. Prionen sind definiert als kleine infektiöse Proteinpartikel, die ursprünglich der pathogenen Isoform, Prionprotein *Scrapie* (PrP^{Sc}), des zellulären Prionproteins (PrP^C) entstammen und frei von Nukleinsäuren sind (Alper et al. 1967; Prusiner 1982).

Bezüglich des hohen β -Faltblatt-Anteils des PrP^{Sc} und seiner Fähigkeit eine fibrilläre Struktur ähnlich Amyloid anzunehmen (Abb. 1) werden TSEs häufig auch mit den Amyloiderkrankungen wie Morbus Alzheimer in Verbindung gebracht. Im Gegensatz zu den Amyloiderkrankungen besitzen Prionenerkrankungen allerdings eine Eigentümlichkeit, und zwar ihre Übertragbarkeit (Gibbs et al. 1968).

Die Natur des übertragbaren Agens stand über lange Zeit im Mittelpunkt zahlreicher Diskussionen (Prusiner 1982). Anhand von Transmissionsexperimenten an PrP⁰⁰-Mäusen, die eine entsprechende Resistenz aufwiesen, konnte gezeigt werden, dass PrP^{Sc} verantwortlich für die Übertragung und Pathogenese von TSEs ist (Büeler et al. 1993).

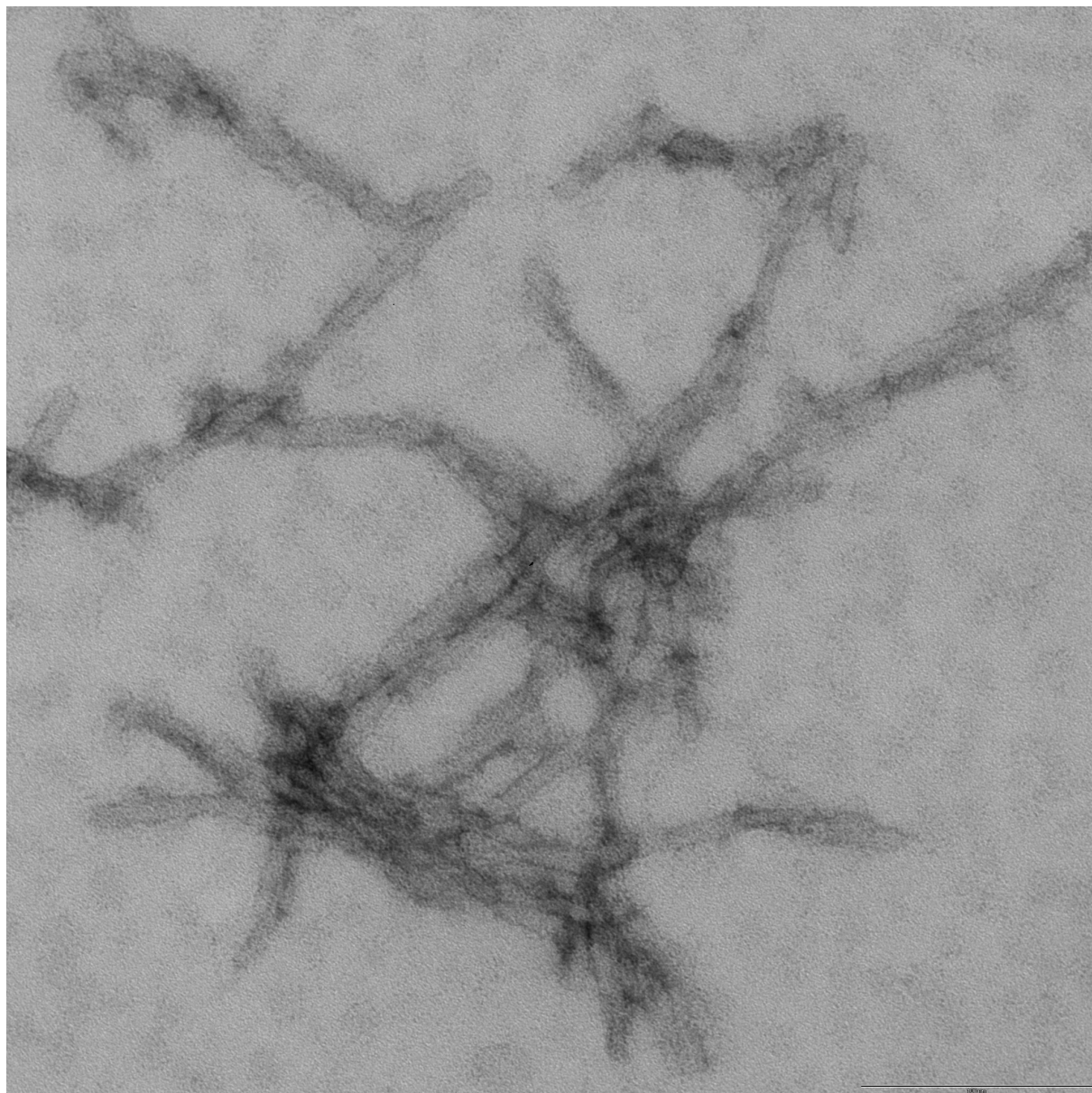


Abbildung 1: TEM-Aufnahme der Prionprotein-Akkumulation. Prionprotein akkumuliert innerhalb von Neuronen unter Bildung von Neurofibrillen, die sich ihrerseits zu Faserclustern zusammenschließen können. (Quelle: Nationales Referenzzentrum für TSE. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. M. Schmitz.)

1.1.2 Humane Prionenerkrankungen

Zu den humanen Prionenerkrankungen zählen klassischerweise die familiären Formen, allen voran die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD, Creutzfeldt-Jakob Disease), darüber hinaus das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS), die letale familiäre Insomnie (FFI) sowie die

Einleitung

inzwischen vermutlich ausgestorbene Kuru-Krankheit (Collinge et al. 2001; Hsiao et al. 1989; Owen et al. 1989).

Prionenerkrankungen beim Menschen sind seltene, verheerende neurologische Störungen, die in drei Formen auftreten: sporadisch, hereditär und erworben. Die sporadische CJD (sCJD) wurde dank ihrer späteren Namensgeber erstmals 1920 durch Creutzfeldt und ein Jahr später durch Jakob als eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems beschrieben (Creutzfeldt 1920). Sie macht etwa 85% aller humanen Prionenerkrankungen aus und besitzt eine jährliche Inzidenz von 1,7-2,3 Erkrankungsfällen pro 1 Million Menschen weltweit (Hermann et al. 2018).

Die Ätiologie der sCJD ist nach wie vor unklar. Gegenstand der Diskussion sind eine Mutation des humanen Prionprotein-Gens (PRNP), eine spontane Konversion von PrP^c in das krankheitsassoziierte PrP^{Sc} (Sc steht für *Scrapie*, c für *cellular*), sowie eine bisher unidentifizierte Exposition mit Prionen über die Umwelt.

Heute sind darüber hinaus prädisponierende genetische Faktoren für die CJD bekannt. So stellt Methionin-Homozygotie am Codon 129 des PRNP-Gens, wo sowohl Methionin als auch Valin inseriert sein können, einen Risikofaktor für die Entwicklung einer Prionenerkrankung dar (Palmer et al. 1991). Aufgrund des Codon-129-Polymorphismus sind die drei Genotypen MM, MV und VV bekannt.

Nach Parchi (1999) existieren zudem zwei verschiedene PrP^{Sc}-Typen, die sich im Molekulargewicht der unglykosylierten PrP^{Sc}-Isoformen nach Proteinase K-Verdau unterscheiden. Parchi et al. konnten 1996 nach Proteinase K-Verdau zwei unterschiedliche unglykosylierte PrP-Formen im Western Blot nachweisen. Diese sind das PrP^{Sc} Typ 1, welches aus einer Spaltung des Proteins an Position 82 mit einer Molekulargröße von 21 kDa resultiert, und das PrP^{Sc} Typ 2 als Ergebnis der Spaltung an Position 97 mit einer Molekulargröße von 19 kDa (Parchi et al. 1996 und 1997). Es wird derzeit angenommen, dass die Konformation des fehlgefalteten PrP^{Sc} die Lokalisation der Spaltung beeinflusst (Parchi et al. 2000). Studien konnten zeigen, dass in maximal 35% der Fälle beide Typen von PrP^{Sc} koexistieren (Parchi et al. 2009), und dass manche Prionenstämme unter vergleichbaren Bedingungen gänzlich proteolysiert werden (Gambetti et al. 2008; Colby et al. 2010). Das entstehende, lösliche sPrP^{Sc} gilt gleichermaßen als pathogen.

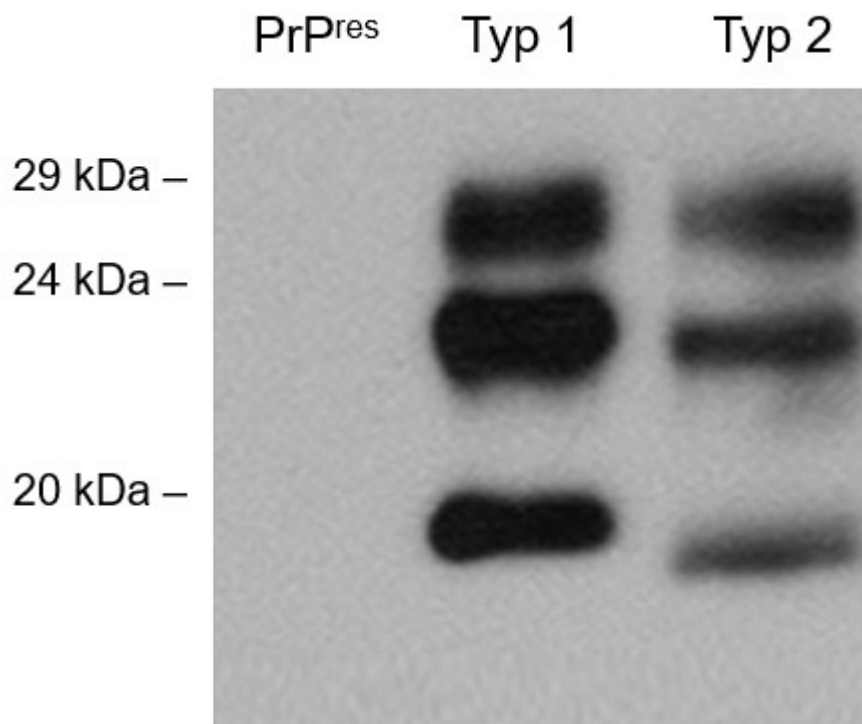


Abbildung 2: PrP-Typisierung nach Proteinase K-Verdau. Unglykosylierte, einfach und zweifach glykosylierte Banden des PK-resistenten PrP^{res} im Western Blot (sCJD Typ 1: 20,5 kDa, sCJD Typ 2: 18,7 kDa). (Quelle: Nationales Referenzzentrum für TSE. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. M. Schmitz.)

In Zusammenhang mit dem genannten PRNP-Codon-129-Polymorphismus existieren insgesamt 6 verschiedene Subtypen der sCJD: MM1+2, MV1+2, VV1+2. Diese lassen sich entsprechend der Häufigkeit ihres Auftretens in typische und atypische Formen unterteilen.

Jener Codon-129-Polymorphismus hat in entscheidendem Maße Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit der Entstehung einer CJD, auf den Krankheitsverlauf und auch auf die Überlebenszeit von CJD-Erkrankten (Parchi et al. 1996; Schulz-Schaeffer et al. 1996; Cali et al. 2006; Collins et al. 2006). MM- oder VV-Homozygotie an Codon-129 korreliert mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung einer sCJD (Heinemann et al. 2007). Die Häufigkeit der Genotypen an Codon-129 in sCJD-Erkrankten (Ladogana et al. 2005) und der Normalbevölkerung (Alperovich et al. 1999) veranschaulicht Tab. 1. sCJD-Erkrankte weisen ein vergleichsweise gehäuftes Auftreten einer MM-Homozygotie auf.

Einleitung

Tabelle 1: Häufigkeit der Genotypen an Codon-129 bei sCJD-Erkrankten und in der Normalbevölkerung.

Codon-129-Polymorphismus	Verteilung bei sCJD-Erkrankten	Verteilung in der Normalbevölkerung
MM	67 %	39 %
MV	16 %	50 %
VV	17 %	11 %

sCJD-Erkrankte weisen sehr häufig den MM1-Typ mit den klinischen Charakteristika in Form eines progredienten dementiellen Syndroms, einer pyramidalen und extrapyramidalen Symptomatik sowie intermittierenden Myoklonien auf (Parchi et al. 1999). Der MV2-Typ läuft klinisch vergleichbar ab. Beim MM1-Typ fällt der Erkrankungsgipfel in die siebte Lebensdekade. Der Krankheitsprogress ist typischerweise sehr rasch, wodurch betroffene Patienten bereits nach durchschnittlich fünf Monaten der Krankheit erliegen. Bei einer sCJD vom VV2-Typ kommt es hingegen zu einem früheren Krankheitsbeginn. Klinisch zeigt sich bei dieser Form häufig eine Ataxie als initiale Symptomatik, zu der erst im Verlauf ein progredientes dementielles Syndrom kommt (Parchi et al. 1996; Zerr und Poser 2002).

Bei der iatrogenen CJD konnten Auswirkungen des Codon-129-Polymorphismus auf die Inkubationszeit der Erkrankung nachgewiesen werden. Bei Homozygotie am Codon 129 ist letztere kürzer als im heterozygoten Fall (Jaegly et al. 1995; Deslys et al. 1998). Bei der vCJD weisen beinahe alle Erkrankten eine Methionin-Homozygotie an Codon 129 auf (Collinge und Rossor 1996). Auf molekularbiologischer Ebene hat der Polymorphismus Auswirkungen auf die PK-Resistenz und PrP^c-Konformation des PrP^{Sc} (Pham et al. 2008; Uro-Coste et al. 2008).

Etwa 15% aller diagnostizierten Prionenerkrankungen entfallen auf hereditäre Formen mit autosomal-dominanten Mutationen im PRNP (Hsiao et al. 1989). Diese Krankheiten umfassen die familiäre CJD, die FFI sowie das GSS. Alle hereditären PRNP-Mutationen besitzen eine hohe Penetranz von nahezu 100%. Auf welche Weise die genannten Mutationen im PRNP genau zur Prionenerkrankung führen, bleibt pathogenetisch noch zu klären. Man geht aber heute davon aus, dass die Mutationen das PrP^c destabilisieren und so den Weg zur pathogenen Konversion zum PrP^{Sc} ebnen.

Einleitung

Die erworbenen Prionenerkrankungen schließen die iatrogene CJD ein, deren Entstehung eine akzidentelle Exposition mit infektiösen Prionen im Rahmen medizinischer Eingriffe voraussetzt, sowie die Kuru-Krankheit, von der Fälle bei Eingeborenenstämmen in den östlichen Hochebenen von Papua Neu Guinea infolge kannibalistischer Rituale beschrieben wurden.

Die häufigsten Auslöser für eine iatrogene CJD waren *Dura mater*-Transplantationen und die Behandlung mit humanem Wachstumshormon, das aus menschlichen Zirbeldrüsen gewonnen worden war (Macario et al. 1992). Die erworbenen Formen umfassen insgesamt aber weniger als 1% aller Prionenerkrankungen.

1.1.3 Klinische und apparative Diagnostik der CJD

Initial liegen bei an einer sCJD erkrankten Patienten meist unspezifische Symptome in Form von Schlafstörungen, Inappetenz und psychischen Veränderungen, zum Teil mit paranoid-halluzinatorischen Phänomenen vor. Im Verlauf kommt es in der Regel zu einer progredienten dementiellen Entwicklung mit Gedächtnisstörungen, Aphasie und einer abnehmenden räumlichen Orientierungsfähigkeit. Die möglichen parallel auftretenden Störungen sind mannigfaltig, häufig finden sich jedoch Sehstörungen, Dysarthrie, Dysphagie, Tremor sowie choreo-athetotische Hyperkinesien.

Typischerweise kommt es im weiteren Verlauf zu einer zerebellären Gangataxie mit Fallneigung. Auffällig bei der sCJD im späteren Stadium sind Myoklonien, die spontan oder aber durch akustische oder sensible Stimuli ausgelöst werden können. Letztere treten häufig mit kurzer Latenz auf den Stimulus auf und werden als „*startle response*“ bezeichnet. Im fortgeschrittenen Stadium können generalisierte tonisch-klonische Anfälle hinzukommen. Im Endstadium sind die meist kachektischen Patienten in aller Regel bettlägerig und akinetisch-mutistisch (Zerr et al. 2009).

Für die Diagnosestellung der CJD und die gleichzeitige Abgrenzung zur Alzheimer Demenz müssen neben einem über Wochen bis Monate rasch fortschreitenden dementiellen Syndrom eines oder mehrere der oben genannten Symptome vorhanden sein. Letztere sind jedoch bei verschiedenen Subtypen der Erkrankung in unterschiedlicher Form und Häufigkeit vorhanden, sodass diese klinisch nicht mit der gleichen Zuverlässigkeit diagnostiziert werden können (Zerr et al. 2000).

Einleitung

Das EEG von CJD-Erkrankten (Abb. 3) zeigt häufig typische Veränderungen in Form von periodisch auftretenden, triphasischen Graphoelementen und periodischen Spike-Wave-Komplexen (PSWCs). Etwa 70 % der Patienten mit einer CJD zeigen ein abnormes EEG, wobei in der Regel mehrfache Ableitungen notwendig sind um typische Veränderungen nachzuweisen.

Neben triphasischen Wellen und PSWCs, die bei fortgeschrittener Krankheit auftreten können, zeigen sich unspezifische Zeichen einer Enzephalopathie, häufig in Gestalt frontaler intermittierender rhythmischer Deltaaktivität (FIRDA). Typischerweise treten die triphasischen Wellen mit einer Frequenz von 1 Hz auf.



Abbildung 3: Elektroenzephalogramm bei CJD. EEG eines Patienten mit sporadischer Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD). Der Befund zeigt periodische bi- und triphasische Komplexe, die bei etwa zwei Dritteln der sCJD-Patienten beobachtet werden. (Quelle: Nationales Referenzzentrum für TSE. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. I. Zerr.)

Einleitung

Magnetresonanztomographisch finden sich gehäuft Hyperintensitäten im Bereich der Basalganglien (Abb. 4). Bei klinischen Varianten kann es auch zu anders lokalisierten (im Falle der Heidenhain-Variante z.B. okzipital betonten) Signalanhebungen kommen, die entsprechend mit ihrem klinischen Bild (z.B. einem Beginn mit visuellen Störungen) korrelieren.

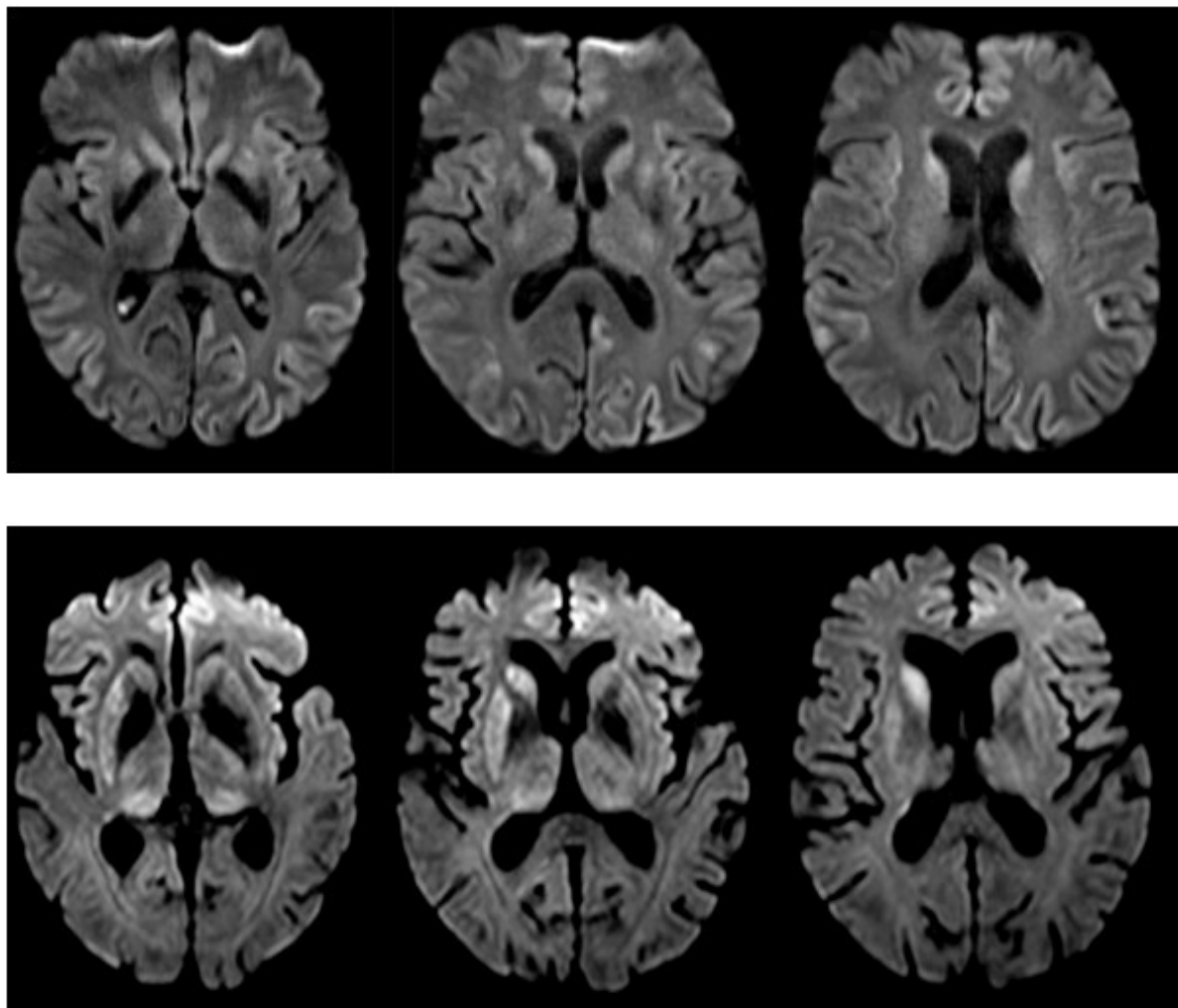


Abbildung 4: Transversale cMRT-Serien von zwei CJD-Patienten. Obere Serie eines MM-Typs mit Nachweis bilateraler Hyperintensitäten im temporo-parietalen und temporo-okzipitalen Kortex sowie im Nucleus caudatus und Putamen. Untere Serie eines VV Typs mit Hyperintensitäten im Nucleus caudatus, Putamen und Thalamus (Pulvinar) (Quelle: Nationales Referenzzentrum für TSE. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. I. Zerr.)

Einleitung

Entgegen anderer neurodegenerativer Syndrome wie dem Morbus Alzheimer, der vaskulären Demenz oder dem Morbus Parkinson finden sich bei der CJD neuropathologische Korrelate zu weniger als 1%. Die paraklinische Diagnostik stützt sich vor allem auf den Nachweis des Proteins 14-3-3 als einen zu über 90% spezifischen und sensitiven Marker (Schmitz et al. 2016). Seine Konzentration im Liquor betroffener Patienten ist infolge der neuronalen Degeneration nach Ausbruch der Erkrankung erhöht und lässt in Verbindung mit weiteren laborchemischen Markern von Demenzerkrankungen wie Tau, α -Synuclein, Protein S-100 oder neuronenspezifischer Enolase (NSE) als ebenfalls unspezifische Marker Rückschlüsse auf die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer CJD zu. Letztlich liegt bis zum heutigen Zeitpunkt noch kein hundertprozentig spezifischer, klinisch *intra vitam* anwendbarer Marker für die Diagnosestellung einer CJD zur Verfügung. Klinische Anwendung findet inzwischen das sogenannte RT-QuIC-Assay (*real-time quaking-induced conversion*) mit einer Sensitivität von 92% und einer Spezifität von 100% (Green 2018; Cramm et al. 2016).

Die Äußerung eines Verdachts auf das Vorliegen einer CJD setzt insofern eine Kombination aus den genannten klinischen Symptomen bei gleichzeitigen typischen apparativen Befunden voraus. Eine Diagnosesicherung kann nachwievor nur durch eine neuropathologisch-histologische Untersuchung des Hirngewebes (Abb. 5) erfolgen.

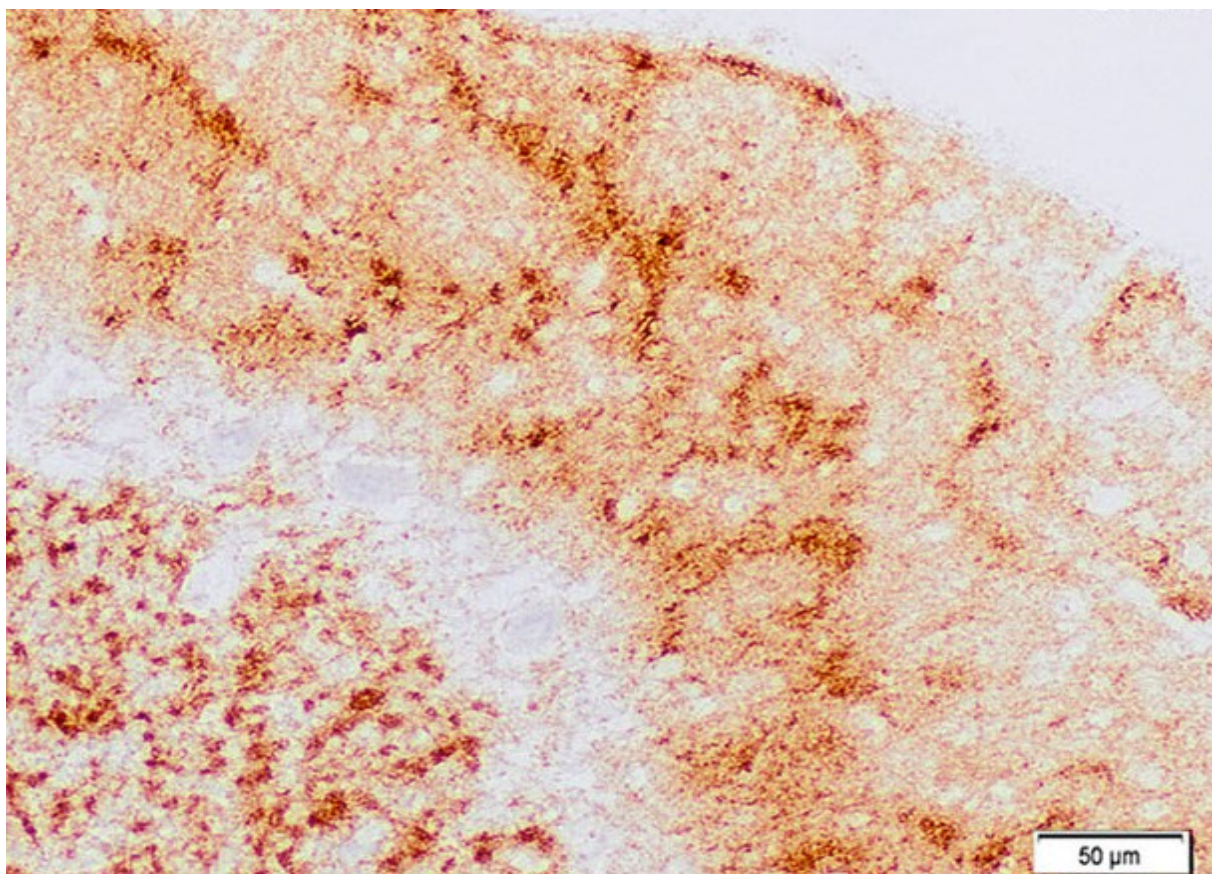


Abbildung 5: Histopathologische Veränderungen bei CJD. Immunhistochemischer Nachweis von PrP^{Sc}-Aggregaten bei familiärer CJD (E200K). (Quelle: Schmitz et al. 2017. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. M. Schmitz.)

1.2 Prionen im Nervensystem

1.2.1 Die physiologische Rolle des zellulären Prionproteins

Die präferentielle Lokalisation des PrP^c auf der Plasmamembran respektive präsynaptischen Endigungen von Neuronen, weist auf seine Rolle bei der synaptischen Signaltransmission und Kontrolle der neuronalen Exzitabilität hin (Hopt 2004). Die Funktion des PrP^c an der Synapse wurde vielfach beschrieben (Collinge et al. 1994; Whittington et al. 1995) und spielt bei humanen Prionenerkrankungen ebenso wie bei *Scrapie* schon zu Beginn der Erkrankung eine entscheidende Rolle (Johnston et al. 1997; Kitamoto et al. 1992).

Entgegen seiner pathologischen Rolle innerhalb transmissibler spongiformer Enzephalopathien sind die physiologischen Aufgaben des PrP^c und seiner Isoformen respektive Modifikationen noch nicht gänzlich geklärt. Vor dem Hintergrund seiner nur sehr geringen Veränderungen im Laufe der Evolution ist aber von einer wichtigen physiologischen Funktion auszugehen (Gabriel et al. 1992). Das PrP^c wurde in allen untersuchten Säugetierarten nachgewiesen, unter anderem in Affen (Schätzl et al. 1995), Hamstern (Kretzschmar et al. 1998), Mäusen (Fischer et al. 1996), zahlreichen anderen Säugetieren (Groschup et al. 1997) sowie Vögeln (Wopfner et al. 1999).

1.2.2 Die *Protein-only*-Hypothese

Die *Protein-only*-Hypothese der Prionverbreitung wurde durch Griffith 1967 eingeführt, der in dem Protein ein infektiöses Agens vermutete, welches die Fähigkeit zur Selbstreplikation besitzt. Die Hypothese wurde mehr als ein Jahrzehnt später durch Prusiner (1982) aktualisiert und erweitert. Sie beschreibt das infektiöse Agens als frei von Nukleinsäuren und vermutet hinter dem pathogenen Prionprotein ein abnormales Konformer des zellulären Prionproteins. Zusätzlich wurde seinerzeit erstmals die Behauptung aufgestellt, dass es sich bei der Verbreitung des infektiösen Agens um einen vom PrP^{Sc} selbst initiierten Prozess handle, der eine konformationelle Konversion von PrP^c zu PrP^{Sc}-Molekülen voraussetzt.

Obwohl die exakte Natur des infektiösen Agens nachwievor Gegenstand von Kontroversen bleibt (Manuelidis et al. 2007), wächst die Evidenz für die *Protein-only*-Hypothese stetig. Die

Einleitung

Resistenz des Erregers gegenüber einer Behandlung mit Substanzen, die Nukleinsäuren inaktivieren, spricht beispielsweise für die *Protein-only*-Hypothese und gegen die Behauptung, ein Virus könne ebenfalls der Verursacher dieser Erkrankung sein (Alper et al. 1967).

Ein weiterer wichtiger Punkt, der für die *Protein-only*-Hypothese spricht, ist die Beobachtung, dass Mäuse, die kein PrP^c besitzen, gegenüber einer *Scrapie*-Infektion resistent sind sowie die Tatsache, dass PrP^c für die Prionausbreitung innerhalb des ZNS benötigt wird (Büeler et al. 1993; Brandner et al. 1996). Genetische Studien haben gezeigt, dass bisher alle der erblichen humanen Prionenerkrankungen mit Mutationen im PRNP-Gen in Verbindung stehen, was die zentrale Rolle des PrP^c in der Pathogenese der Erkrankung zusätzlich unterstützt (Hsiao et al. 1989).

Die erste erfolgreiche Konversion eines rekombinanten, trunkierten Maus-Prionproteins MoPrP (89-230) zu infektiösen Amyloidfibrillen zeigte, dass es sich bei Prionen tatsächlich um infektiöse Proteine handelt. Nach intrazerebraler Inokulation von Fibrillen in transgene Mäuse, die MoPrP (89-231) exprimieren, zeigten die Tiere neurologische Störungen, und Hirnextrakte von ihnen enthielten Protease-resistentes Prionprotein, welches im Western Blot gezeigt werden konnte (Legname et al. 2004).

Dennoch ist der letzte Beweis für die *Protein-only*-Hypothese, die Erzeugung von Infektiösität durch *In-vitro*-Konversion von PrP^c zu infektiösem PrP^{Sc} bislang noch nicht führbar. Es gab Berichte von Infektiösität in Abwesenheit detektierbaren Protease-resistenten PrP^{Sc} (Lasmez et al. 1997) genauso wie *vice versa* von Protease-sensitivem PrP^{Sc} in Aggregaten unterschiedlicher Größe (Safar et al. 2000; Tzaban et al. 2002). Möglicherweise stellt fehlgefaltetes Prionprotein somit nicht die einzige Komponente des infektiösen Agens dar.

1.3 Das Prionprotein

1.3.1 Vorkommen des zellulären Prionproteins

Die zelluläre Form des Prionproteins ist ein in der Evolution hochgradig konserviertes, ubiquitäres Glykoprotein, das in praktisch allen Neuronen des ZNS (Kretzschmar et al. 1986) und in geringerer Menge auch in Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia (Brown et al. 1998) exprimiert wird. Neben seinen Bildungsorten im ZNS wird PrP^c zudem in Leukozyten und Makrophagen (Farquhar et al. 1998; Dodelet und Cashman 1998) sowie im Zuge der Embryonalentwicklung in zahlreichen Organen (Manson et al. 1992) gebildet.

Einleitung

1.3.2 Das PRNP-Gen

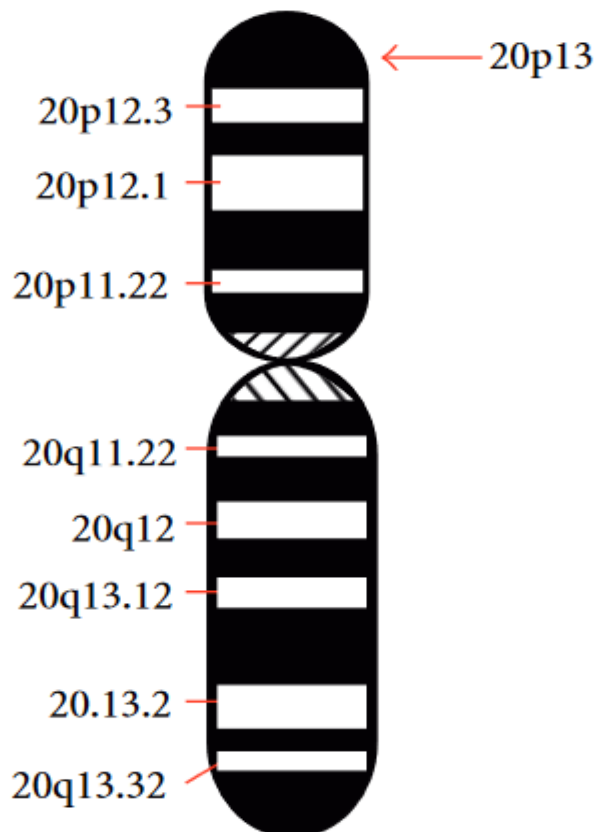


Abbildung 6: Das PRNP-Gen. Lokalisation des PRNP-Gens auf dem kurzen Arm des Chromosoms 20. (Quelle: Dudhatra et al. 2012. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Verlages.)

Das PRNP (*PRion Protein*) ist das menschliche Gen, welches die genetische Information für PrP^c kodiert (Abb. 6). Das humane PRNP-Gen ist auf dem kurzen (p) Arm des Chromosoms 20 zwischen dem Endterminus des Arms und Position 12, von Basenpaar 4,615,068 bis Basenpaar 4,630,233, lokalisiert.

Pathogene Mutationen im PRNP führen zu einer genetischen CJD. Meist handelt es sich um Punktmutationen, die das klassische Syndrom aus rasch progredienter Demenz, zerebellärer Ataxie und Myoklonien zur Folge haben. Stopp-Mutationen im PRNP sind sehr selten und führen zu einer Expression trunkierter PrP^c-Formen und klinisch in der Regel eher zu einer langsam progredienten Demenz, die nicht selten als eine Demenz vom Alzheimer-Typ fehlgedeutet wird (Fong et al. 2017).

Einleitung

1.3.3 Chemische Struktur des PrP^c

Die Primärstruktur des PrP^c umfasst 253 Aminosäurereste (Billeter et al. 1997). Die aus 22 Aminosäuren bestehende N-terminale ebenso wie die 23 Aminosäuren umfassende C-terminale Signalsequenz werden vom Translationsprodukt abgespalten, sodass ein posttranslationales Protein von 208 Aminosäuren Länge resultiert (Abb. 7).

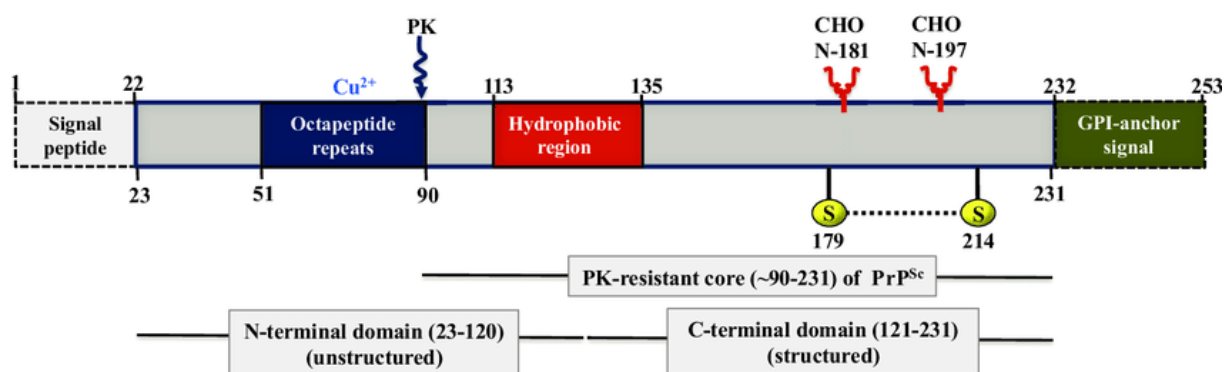


Abbildung 7: Organisation des humanen PrP. Das unprozessierte PrP setzt sich aus 253 Aminosäuren zusammen und beinhaltet ein Signalpeptid (1-22), vier Octapeptid Repeats, eine hydrophobe Region (113-135), eine Disulfidbrücke (179-214), zwei N-gebundene Glykosylierungsstellen (181 und 197), und einen GPI-Anker mit Verbindung zum C-Terminus (232-254). (Quelle: Acevedo und Wille 2014. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Verlages.)

PrP^c wird hauptsächlich an der Plasmamembran von Neuronen gefunden, an die es mittels Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker (Abb. 8) über einen Serinrest bindet (Stahl et al. 1987). Der GPI-Membrananker bindet PrP an Zellmembranen, was ein integraler Bestandteil des Mechanismus der Konformationsänderung zu sein scheint. PrP^c, dessen Ankerkomponente unter experimentellen Bedingungen entfernt wurde, scheint durch die infektiöse Isoform *in vivo* nicht konformiert werden zu können (Chesebro et al. 2005).

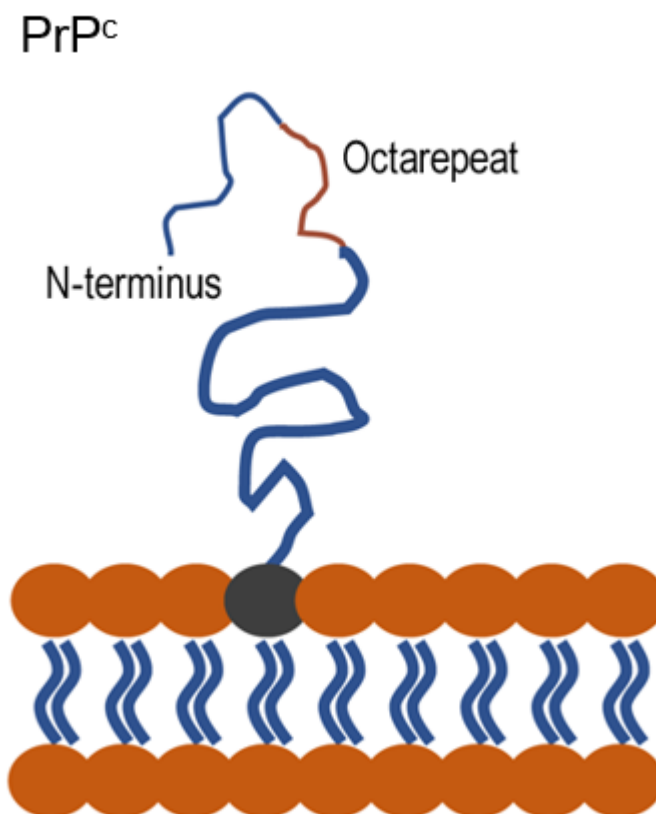


Abbildung 8: Lokalisation und Verankerung des zellulären Prionoproteins. Die Verankerung des Prionoproteins auf der Plasmamembran-Außenseite durch einen GPI-Anker ist ein wichtiger Faktor für die Infektiösität der CJD. (Quelle: Nationales Referenzzentrum für TSE. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. M. Schmitz.)

Das PrP^c verfügt mit den Aminosäuresequenzen 181 und 197 über zwei mögliche Stellen für eine N-Glykosylierung und liegt daher in vier unterschiedlichen Formen vor: unglykosyliert, monoglykosyliert (an jeweils einer der beiden genannten AS-Sequenzen) und diglykosyliert (Abb. 9). Die einzelnen Glykosylierungsformen des PrP^c können anhand ihres Molekulargewichts unterschieden werden. Nach aktuellem Kenntnisstand hat es den Anschein, als würde überwiegend glykosyliertes PrP^c an der Zelloberfläche exprimiert (Iremonger 2013).

Proteine, so auch das Prionprotein, lassen sich nicht nur anhand ihres Molekulargewichts, sondern auch ihrem isoelektrischen Punkt nach auftrennen, was zum Nachweis verschiedener Isoformen führt. Dies wurde in Studien anhand von Hirn- und Liquorproben von CJD-Patienten untersucht (Castagna et al. 2002; Zanusso et al. 2002).

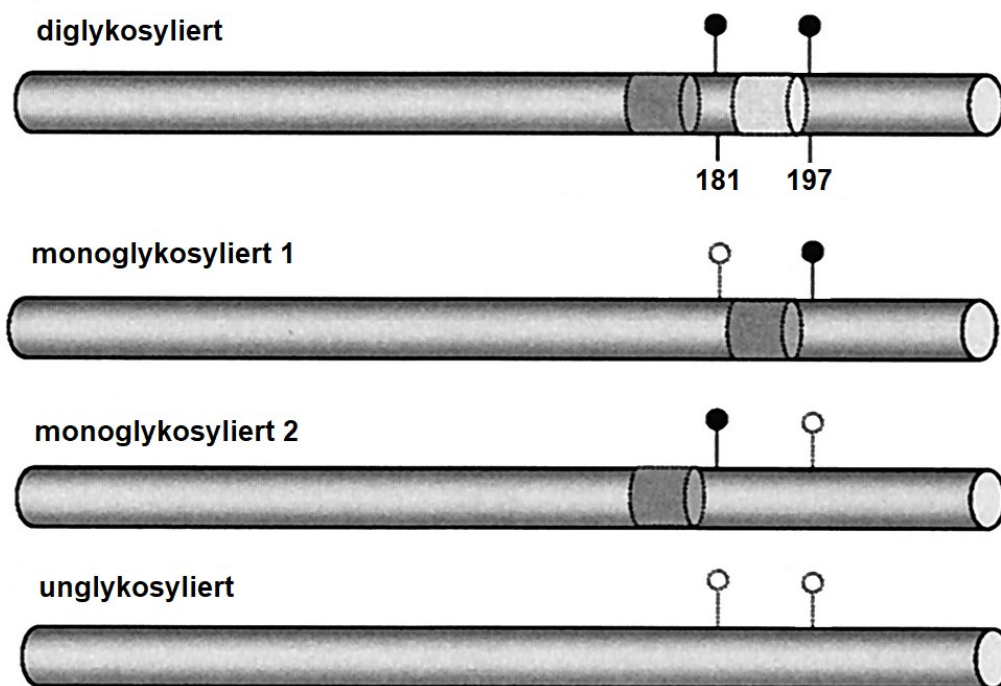


Abbildung 9: Topologie der PrP^c-Glykosylierung. Schematische Darstellung der linearen Struktur des Prionproteins und der Position der zwei N-Glykosylierungsstellen an den Aminosäuresequenzen 181 und 197. Die ausgefüllten und offenen Köpfe der Stecknadelsymbole verweisen auf das Vorhandensein oder Fehlen respektive die Position der Glykanketten. Es resultieren 4 prinzipielle Glykosylierungsformen des PrP^c: die unglykosylierte, die monoglykosylierte (Typ 1 und 2) sowie die diglykosylierte Form. (nach Moudjou et al. 2004)

Die Sekundärstruktur des PrP^c entspricht der eines doppelsträngigen, antiparallelen β -Faltblatts dar. Es verfügt über die drei α -Helices H1, H2 und H3, welche zwischen den Aminosäuren 121 und 231 lokalisiert sind (Riek et al. 1996). Im Zuge der posttranslationalen Modifikationen des PrP^c wird ein N-terminales Signalpeptid abgespalten, eine C-terminale Sequenz entfernt und ein GPI-Anker angeheftet. Zudem kommt es zu Glykosylierungen und zur Ausbildung einer Disulfidbrücke (Abb. 10).

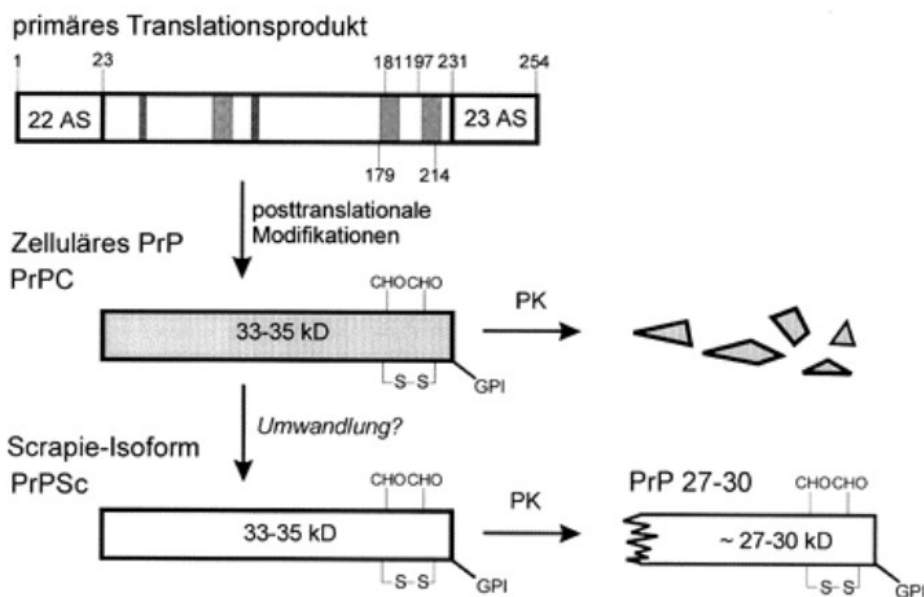


Abbildung 10: Biosynthese des Prionproteins und posttranslationale Modifikationen.

Innerhalb der posttranslationalen Modifikationen des PrP^c wird zunächst ein N-terminales Signalpeptid abgespalten. In der Folge wird eine C-terminale Sequenz entfernt und ein GPI-Anker angeheftet bevor es zur Glykosylierung und zur Disulfidbrücken-Bildung kommt. Nach PK-Verdau resultieren vom PrP^{Sc} nach Abspaltung N-terminaler Aminosäuren die PK-resistenten „Prion-Rods“. Zelluläres PrP wird gänzlich abgebaut. (Quelle: Weissmann 1994. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Verlages.)

1.3.4 Strukturvergleich von PrP^c und PrP^{Sc}

In der chemischen Zusammensetzung von PrP^c und PrP^{Sc} wurden keine Unterschiede gefunden (Riesner 2003). Das bedeutet, dass die AS-Sequenz, die Glykosylierung und der Lipidanker bei beiden Formen identisch sind. Unterschiede zeigen sich jedoch hinsichtlich ihrer Struktur (Abb. 11) und der physikalisch-chemischen Eigenschaften.

Die pathogene Form des Prionproteins, das sogenannte PrP^{Sc} ist ein Konformationsisomer des normalen wirtseigenen Prionproteins PrP^c. Beide Isoformen teilen identische AS-Sequenzen, das PrP^{Sc} unterscheidet sich aber biochemisch vom PrP^c durch seine β -Faltblatt-angereicherte Struktur (Caughey 1991; Riek et al. 1996; Safar et al. 1993; Stöckel et al. 1998), seine Unlöslichkeit in Detergentien sowie seine limitierte Sensitivität gegenüber Proteolyse durch Proteinase K (Prusiner 1998).

Einleitung

Der Unterschied wird im Rahmen eines Proteinase K-Verdau am deutlichsten, innerhalb dessen das PrP^{Sc} nicht komplett hydrolysiert wird, sondern infolge der Abspaltung von ca. 97 N-terminalen AS ein Protein von 27-30 kDa resultiert.

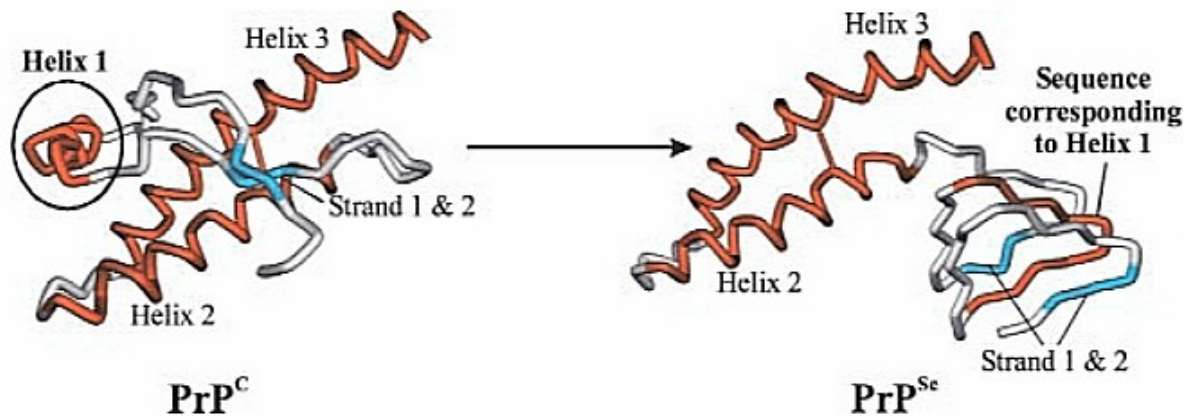


Abbildung 11: Konversion des zellulären Prionproteins. Schematische Darstellung der strukturellen Konversion von PrP^C ins pathogene PrP^{Sc}. (Quelle: Ziegler et al. 2003. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Verlages.)

1.3.5 Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc}

Prusiner und Griffith stellten die Hypothese auf, dass die Vermehrung pathogener Prionen unabhängig von DNA oder RNA abläuft. Die Vermehrung scheint sich in Form einer autokatalytischen Reaktion zu vollziehen, an der möglicherweise Chaperone beteiligt sind (Stöckel et al. 1998). In einem gesunden Organismus ist die spontane Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} sehr unwahrscheinlich. Wird aber die autokatalytische Reaktion durch eine Infektion mit einem pathogenen PrP gestartet, kommt es zur exponentiellen Vermehrung von PrP^{Sc} (Abb. 12).

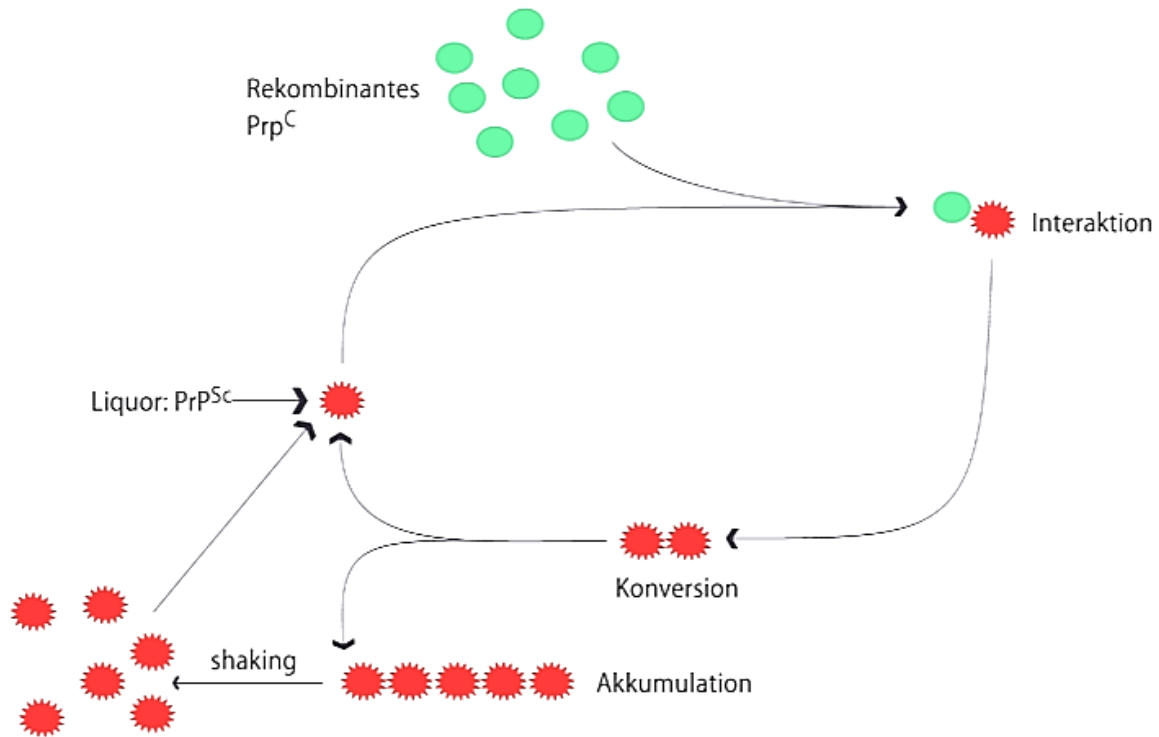


Abbildung 12: Mechanismus der PrP^c-Fehlfaltung. Schematische Darstellung der Konversion des zellulären Prionoproteins nach Interaktion mit seinem abnormalen Konformer unter Bildung von PrP^{Sc}-Konglomeraten. (Quelle: nach Ponto und Zerr 2013. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. I. Zerr.)

1.4 Ziele der Arbeit

Innerhalb der vorliegenden Arbeit wurden Proben des *Liquor cerebrospinalis* von sCJD-Patienten mit unterschiedlichen CJD-Subtypen, die mittels *post mortem* durchgeführter Hirnbiopsie ermittelt worden waren, komparativ zusammen mit Kontrollen analysiert. Ein Ziel der Studie war eine Charakterisierung verschiedener Glykosylierungsformen als posttranslationale PrP^c-Modifikationen unter Verwendung einer großen Auswahl von PrP-Antikörpern, die gegen ein breites Spektrum von Epitopen auf dem PrP^c gerichtet sind. Es wurde untersucht, wie sich die unterschiedlichen PrP^c-Isoformen mit diversen monoklonalen Antikörpern darstellen lassen, und wie sich die Bindungseigenschaften von Antikörpergruppen in Abhängigkeit ihres Epitops (Octarepeat-, Zentral- und N-terminale Region) verändert.

Darüber hinaus wurden PrP^c-Isoformen anhand ihres Bandenmusters im Liquor unterschiedlicher sporadischer CJD-Genotypen mit Codon-129-MV-Polymorphismus (MM, MV,

Einleitung

VV) durch das Western-Blot-Verfahren dargestellt und mit Kontrollen ohne neurodegenerative Erkrankung verglichen. Das Ziel bestand darin einen möglichen Zusammenhang zwischen der Form der Prionenerkrankung (sporadisch oder genetisch) und dem physiologischen PrP^c-Metabolismus zu untersuchen. Da das Glykosylierungsmuster von PrP zur Unterscheidung und Abgrenzung gegenüber PrP^{Sc}-Stämmen/-Typen dient, verwendeten wir das PrP^c-Glykosylierungsmuster um mögliche Unterschiede im PrP^c-Metabolismus im Liquor bei verschiedenen CJD-Genotypen darzustellen.

Zudem untersuchten wir die PrP^c-Prozessierung in humanem Liquor. Das PrP^c verfügt über zwei Haupt-Spaltungsstellen, und zwar die Spaltungsstelle α auf Position 111/112 und β auf Position 96. Die Spaltung an diesen Stellen führt zu unterschiedlichen PrP^c-Fragmenten, deren Expressionsmuster Gegenstand dieser Arbeit sind. Es sollte untersucht werden, ob ein spezifisches PrP^c-Bandenmuster oder ein spezifisches PrP^c-Fragment existiert, welches mit dem PRNP-Codon-129-Polymorphismus, dem PrP^{Sc}-Typ oder mit der Art der Prionenerkrankung (sCJD, gCJD (E200K), FFI, Kontrollen) korreliert. Variationen im PrP^c-Metabolismus könnten Aufschluss über die beobachteten klinischen Varianten zwischen den CJD-Subtypen geben und bei der Suche nach neuen TSE-Biomarkern hilfreich sein.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Probensammlung

Die vorliegende Studie wurde vom Ethikkomitee des Universitätsklinikums Göttingen genehmigt (Nr. 30/01/05) und entsprechend dem Ethikcode des Weltärztebundes durchgeführt. Im Rahmen der Arbeit analysierten wir Liquorproben von 25 verschiedenen sCJD-Patienten, von denen 12 MM-Typen, 8 MV-Typen und 5 VV-Typen waren. Zusätzlich wurde der Liquor von 14 Kontrollpatienten (7xMM, 4xMV und 3xVV) untersucht. Alle als sCJD klassifizierten Proben waren Protein 14-3-3 positiv und stammten von Patienten, die die typischen klinischen Symptome der sCJD präsentierten. Die Routineuntersuchung hatte bezüglich der Zellzahl und des Proteins keine Anomalien gezeigt. Alle CJD-Patienten waren durch neuropathologische Untersuchung als definitive oder wahrscheinliche sCJD-Fälle in Anlehnung an die *diagnostic consensus criteria* (WHO 1998; Zerr et al. 2000 und 2009) klassifiziert worden.

Darüber hinaus testeten wir Liquor von 3 Patienten mit FFI (D178N) sowie von 3 GSS-Patienten (P102L), die alle Methionin-homozygot am Codon-129 waren. Alle Liquorproben von sCJD-, FFI-, und GSS-Fällen wurden vom Nationalen Referenzzentrum für TSE an der Neurologischen Klinik der Universitätsmedizin Göttingen zur Verfügung gestellt. Diese CSF-Proben wurden während der diagnostischen Testung auf das 14-3-3 Protein entnommen. CSF von zehn bestätigten CJD-Fällen (8xMM und 2xMV) mit einer E200K-Mutation wurde vom *Institute of Preventive and Clinical Medicine* in Bratislava, Slowakei, bereitgestellt. Die Kontrollproben waren allesamt Protein 14-3-3 negativ mit insgesamt normalem übrigen Liquorbefund. Organische Erkrankungen des zentralen Nervensystems wurden innerhalb des diagnostischen Workups identifiziert und ausgeschlossen. Zu den Diagnosen dieser Patienten-Gruppe zählten vorwiegend Polyneuropathien, depressive Störungen, Schwindelerkrankungen sowie Schmerzsyndrome. Alle gesammelten Liquorproben wurden zentrifugiert und im Anschluss direkt bei -80°C gelagert. Blutverunreinigte CSF-Proben wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Analyse des Codon-129-Genotyps des PRNP wurde nach Isolation genomischer DNA von Blutproben durch Standardmethoden (Windl et al. 1999) durchgeführt. Im Hinblick auf unsere Studie liegt eine Einverständniserklärung aller eingeschlossenen Patienten vor.

2.2 Materialien und Geräte

2.2.1 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien und ihre Herstellerfirmen.

Substanz	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamidlösung	Carl Roth, Karlsruhe
APS	Bio-Rad, München
Aqua Dest.	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich, München
BSA	Sigma-Aldrich, München
EDTA	Fluka, Neu-Ulm
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Luminol	Sigma-Aldrich, München
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Th.Geyer, Renningen
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
PBS	Biochrom, Berlin
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich, München
PMSF	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Precision Protein Plus Standard	Bio-Rad, München
RotiLoad	Carl Roth, Karlsruhe
SDS	Bio-Rad, München
Tetramethylbenzidin	Carl Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Substanz	Hersteller
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Tris/HCl	Carl Roth, Karlsruhe
Tween	Bio-Rad, München
Tween-20	Merk, Darmstadt
Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe

2.2.2 Puffer und Lösungen

Die Blockierlösung für den Western Blot setzt sich aus 5% Magermilchpulver und 0,2% Tween-20 in PBS zusammen. Die Entwicklungslösung 1 besteht aus 1,5 M Tris/HCl (pH 8,5), 90 mM p-Coumarsiure, 250 mM Luminol und H₂O. Die Entwicklungslösung 2 setzt sich aus 30-prozentigem Wasserstoffperoxid, 1,5 M Tris/HCl (pH 8,5) und H₂O zusammen. Die beiden Entwicklungslösungen (1 und 2) werden unmittelbar vor dem Gebrauch gemischt (Verhältnis 1:1).

Der Laufpuffer für die Gelelektrophorese wird aus 30 g Tris, 144 g Glycin und 10 g SDS aufgefüllt auf 1000 ml H₂O hergestellt. Die Okano-Lösung besteht aus 0,05% Triton X 100, 3 mM Tris (pH 8), 0,1 mM EDTA, 2 mM NaCl, 0,1% BSA und 0,002% SDS. Der Transferpuffer für den Western Blot wird aus 39 mM Glycin, 48 mM Tris Base, 20% Methanol und 1 mM SDS hergestellt. Die Waschlösung T-PBS besteht aus 9,55 g PBS ad 1000 ml H₂O und 10 ml 10% Tween.

2.2.3 Apparaturen

Tabelle 3: Verwendete Apparaturen und ihre Herstellerfirmen.

Gerät	Modell	Hersteller
Imager	Molecular Imager, ChemiDoc XRS+	Bio-Rad
Gelelektrophorese	Power-Pac 3000	Bio-Rad
Gel-Kammern	Mini-PROTEAN-3	Bio-Rad
Glasplatten	Mini-PROTEAN-3	Bio-Rad

Material und Methoden

Gerät	Modell	Hersteller
Rotator	Test-Tube Rotator 34528	Snijders
Rührer	IKA MAG RCT	IKA
Scanner	CanoScan 8400F	Canon International
Schüttler	IKA MTS2	IKA
Schüttler	IKA KS 501 digital	IKA
Semi-Dry Western Blot	Power-Pac 200	Bio-Rad
Short Plates	Mini-PROTEAN-3	Bio-Rad
Spacer Platten 1,5cm	Mini-PROTEAN-3	Bio-Rad
Transfer-Blot	Semi-dry Transfer Cell	Bio-Rad
Vortexer	Vortex Mixer SAB	Stuart
Waage	CP 3202P	Sartorius, Göttingen
Western Blot	Biolane TM HTM	Biolane
Zentrifuge	F-45-30-11	Eppendorf
Zentrifuge	5810-R	Eppendorf
Zentrifuge	5415-D	Eppendorf

2.2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Gerät	Hersteller
E-Cups	Eppendorf, Hamburg
Gerät	Hersteller
Falkon-Röhrchen	Sarstedt, Newton/USA
Nitrozellulosemembran	GE Healthcare Int.

Material und Methoden

Gerät	Hersteller
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pinzetten	Gebr.Rettberg, Göttingen
Scheren	Gebr.Rettberg, Göttingen

2.3 Antikörper

2.3.1 Primäre Antikörper

Tabelle 5: Verwendete monoklonale PrP-Antikörper.

Antikörper	Isotyp	Region	Epitop	Spezies
8B4	IgG1	N-Terminus	37-44	Mensch, Maus, Schaf, Rind, Hirsch, Elch
3B5	IgG2a	Octarepeat	51-89	Mensch, Maus
SAF32	IgG2b	Octarepeat	59-89	Hamster, Mensch, Schaf, Rind, Maus
8G8	IgG2a	Octarepeat	79-92	Hamster, Mensch, Schaf, Maus
ICSM35	IgG2b	Central	96-110	Mensch, Maus, Hamster
3F4	IgG2a	Central	109-112	Mensch, Hamster
SAF84	IgG2b	Central	126-164	Hamster, Schaf, Rind, Maus
1E2	IgG1k	Core	145-154	Mensch, Rind
12F10	IgG2a	Core	142-160	Mensch, Hamster, Rind, Maus

Antikörper	Isotyp	Region	Epitop	Spezies
SAF70	IgG2b	Core	142-160	Mensch, Schaf, Rind, Maus, Hamster
8H4	IgG1	C-Terminus	175-185	Mensch, Maus, Hamster, Schaf, Hirsch, Elch
17B4	IgG1	C-Terminus	197-198	Mensch, Maus, Hamster

2.3.2 Sekundärer Antikörper

Tabelle 6: Verwendeter sekundärer Antikörper.

Antikörper	Spezifität	Verdünnungsgrad	Hersteller
Anti-Maus-IgG	Maus	1:10000	Jackson Immuno Research Suffolk, England Nr. 115 035 062

2.4 Enzymatische Deglykosylierung von PrP^c

Für die Deglykosylierung von PrP^c wurde N-Glykosidase F verwendet. Hierdurch werden N-glykosidisch gebundene Saccharidketten an Position 180 und 191 von der AS Asparagin abgespalten, sodass Asparaginsäure resultiert. Die Methode wird unter Verwendung eines *Glycoprotein deglycosylation kits* (Calbiochem/Merck, Darmstadt) durchgeführt.

Die Prozedur wurde nach den genauen Herstellerinstruktionen durchgeführt. Zunächst wurde der Liquor mit 2,5 µl Denaturierungslösung und 10 µl 5X Reaktionspuffer versetzt und dann für 5 min bei 100°C erhitzt. Anschließend wurden zur Probe 2,5 µl Triton X-100 Detergens gegeben. Nach Abkühlung wurde schließlich 1 µl des Enzyms N-Glykosidase F hinzugegeben. Im Anschluss wurden die Proben für 3 h bei 37°C inkubiert.

2.5 Bestimmung der PrP-Konzentration

Für die Bestimmung der PrP-Konzentration verwendeten wir ein kommerzielles *BetaPrion BSE-ELISA Test Kit* (AJ Roboscreen, Leipzig). Das Kit basiert auf der ELISA-Technik und hat sich als schneller BSE-Test zum qualitativen Nachweis von PrP^{res} im Hirn von Rindern und Schafen bewährt.

Für unsere Zwecke ließen wir die Stufe des Proteinase-K (PK)-Verdau aus, da wir wie erwähnt eine Messung der Gesamtkonzentration von PrP, welches in unserem Ansatz identisch mit dem PrP^c ist, anstrebten (Meyne et al. 2009). Die Liquorproben wurden unverdünnt zugefügt und gemäß den Herstellerangaben verarbeitet.

2.6 Proteinase-K-Verdau

Für die Proteinase-K-Analyse wurde eine 40 µl Liquorprobe von einem sCJD (MV) Patienten mit den empfohlenen Konzentrationen von PK 30 min. lang bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Zur Beendigung des PK-Verdau wurde 2 mM PMSF hinzugegeben. Alternativ wurde der PK-Verdau durch 20-minütiges Erhitzen bei 65°C beendet. Im Anschluss wurden die Proben durch Zugabe von Probenpuffer und Erhitzen auf 95°C denaturiert.

2.7 Western Blot

Insgesamt wurden zwölf verschiedene monoklonale PrP-Antikörper (siehe Tabelle 5) eingesetzt um möglichst große Abschnitte auf dem PrP abzudecken: 8B4 und 8H4 (Alicon, Schlieren, Schweiz), SAF32, SAF70 und 12F10 (Spi-Bio, Massy, Frankreich), 1E2 (AJ Roboscreen, Leipzig), 3B5 und 8G8 (bereitgestellt von Walter Bodemer, Primatenzentrum, Göttingen) und 3F4 (RKI, Berlin). Der Antikörper 17B4 wurde mittels Immunisierung von PrP-Knockout-Mäusen (Büeler et al. 1992) mit rekombinanten Maus-PrP generiert (Korth et al. 1999). Das Epitop von 17B4 wurde auf ein lineares Epitop nahe der zweiten N-Glykosylierungsseite gemappt (Asp 197/198), da es eine monoglykosylierte und eine unglykosylierte Bande in Western Blots von Zelllysaten erkennt, die zuvor mit PrP-N198Q transfiziert worden waren, aber nur die unglykosylierte Bande erkennt, wenn es sich um Zelllysate handelt, die mit PrP N180Q transfiziert wurden (Prusiner et al. 2000).

Material und Methoden

Da wir im Vorfeld dieser Arbeit von einer Variabilität der Gesamtproteinmenge im CSF ausgingen, wurde die PrP^c-Menge für unsere Western-Blot-Analyse auf 1,5 ng pro Bahn festgelegt. Nach Zugabe von Proben-Ladepuffer (BIORAD, München), wurden Proben äquivalenten Proteingehalts (Proteinbestimmung in Anlehnung an Neuhoff et al. 1979 und Bradford 1976) für 2 min. auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (15% w/v Polyacrylamid) gemäß Laemmli (1970) aufgetrennt und auf Polyvinyliden-Difluorid (PVDF) Hydrobond-P Membranen (Amersham, Freiburg) unter Verwendung einer *semi-dry transblot cell* für 70 min. bei 12 Volt übertragen. Für die Markierung mit Antikörpern wurden die PVDF-Membranen mit 5%iger Trockenmilch in PBS sowie 0,1%igem Tween-20 über eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert, und im Anschluss mit den jeweiligen Antikörpern über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membranen wurden schließlich in PBST gespült und mit dem passenden Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper (Jackson Immuno Research, Suffolk, England) (Verdünnung 1:10000) für 1 Stunde inkubiert. Die Banden wurden sichtbar gemacht durch Immersion der Membranen in einem ECL- (*enhanced chemi-luminescence*) Detektionssystem, Lösung und Abbildung auf einer Hyperfilm-ECL.

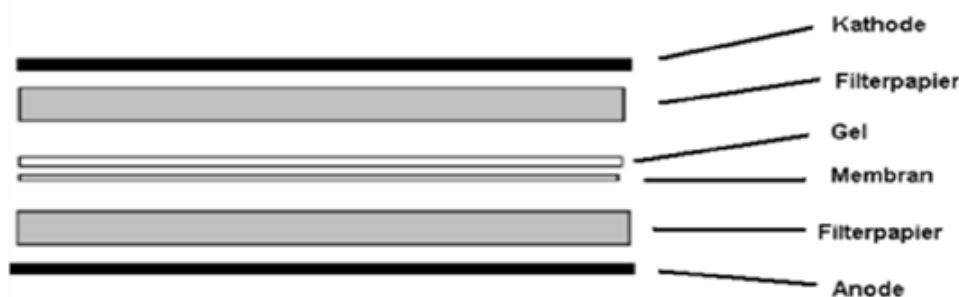


Abbildung 13: Materialanordnung im Western-Blot-Gerät gemäß *Semi-dry*-Methode.

(Quelle: Maibach-Wulf 2014. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. I. Zerr.)

2.8 Statistische Analyse

In unserer Western-Blot-Analyse quantifizierten wir die Bandenintensitäten mittels *Scion Image* und berechneten das Verhältnis der individuell verschiedenen PrP^c-Formen als prozentualen Anteil am Gesamt-PrP^c. Da unsere Werte keiner Normalverteilung folgten, wurde in der statistischen Auswertung der *Wilcoxon-Mann-Whitney*-Test verwendet um alle Banden auf ihre Signifikanz hin zu überprüfen.

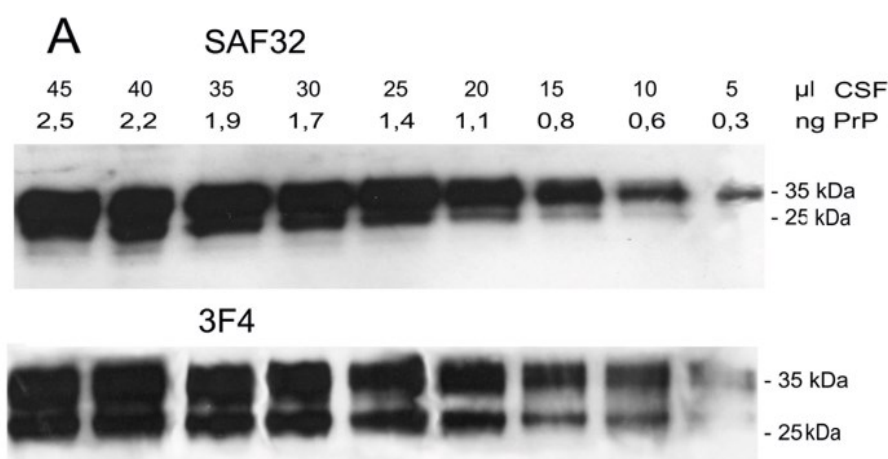
3. Ergebnisse

3.1 Analyse von PrP^c-Glykoformen in humanem Liquor und Bestimmung ihrer Nachweisgrenzen

Verschiedene PrP^c-Isoformen im menschlichen Liquor wurden durch die Western-Blot-Technik differenzierbar. Eine lineare Korrelation von Signalintensität und Menge von PrP^c konnte durch Verwendung serieller Verdünnungen von CSF-Proben eines sCJD (MM) Patienten mit einer ursprünglichen PrP^c-Konzentration von 55 ng/ml beobachtet werden. Sogar kleinste Mengen (5 μ l \sim 275 pg) von PrP^c konnten mittels der Antikörper SAF32 und 3F4 nachgewiesen werden (Abb. 14 A).

Allerdings war eine klare Unterscheidung zwischen der diglykosylierten (36 kDa) und der monoglykosylierten (33 kDa) PrP^c-Form im Liquor schwierig. Der Gebrauch des Antikörpers 17B4, welcher ausschließlich an Asp 197 unglykosylierte PrP^c-Isoformen erkennt, wies anhand des Bandenmusters auf das Fehlen der an Asp 181 monoglykosylierten PrP^c-Form in humanem Liquor hin (Abb. 14 B). Da der Antikörper 17B4 nicht gegen die zweite monoglykosylierte PrP^c-Form an Asp 197 gerichtet ist, können wir das generelle Fehlen von monoglykosyliertem PrP^c nicht ausschließen.

Proteinase-K-resistentes PrP^{Sc} war wie bereits erwähnt durch Western Blot in humanem Liquor von sCJD-Patienten nicht nachweisbar. Nach Behandlung einer CSF-Probe eines sCJD (MV) Patienten mit 3,1 μ g/ml PK konnte kein PrP-Signal gefunden werden (Abb. 14 C).



Ergebnisse

**Abbildung 14: Nachweis von PrP^c in einer Verdünnungsreihe von CSF mittels Western**

Blot. A: Eine Liquorprobe eines Patienten mit sCJD (MM) (PrP^c-Konzentration: 55 ng/ml) wurde mit den Antikörpern SAF32 und 3F4 analysiert. Die verwendete PrP^c-Menge pro Bahn ist angegeben. Beide Antikörper ergaben zwei PrP^c-Banden, die glykosylierte FL-Form zwischen 33 und 36 kDa, und die unglykosylierte Form mit 27 kDa. Die Nachweisgrenze von PrP^c lag um 275 pg. B: Der Antikörper 17B4 zeigte die Abwesenheit von an Asp 181 monoglykosyliertem PrP^c (33 kDa) in humanem Liquor. Hirnhomogenat, das an Asp 181 monoglykosyliertes PrP^c enthielt, wurde als Kontrolle verwendet. C: Ein limitierter PK-Verdau einer sCJD (MV)-Probe zeigte eine Toleranz des PrP^c gegenüber Proteinase K bis zu einer Konzentration von 2.5 lg PK/mL. Die Molekulargewichte sind in kDa auf der rechten Seite dargestellt.

3.2 Charakterisierung der PrP^c-Bandenmuster mittels zwölf verschiedener monoklonaler Antikörper

In dieser Studie wurde eine Auswahl von zwölf unterschiedlichen monoklonalen Antikörpern verwendet, die unterschiedliche Epitope innerhalb der PrP^c-Sequenz erkennen (s. Tab. 5). Alle Antikörper, die gegen den N-terminus, die Octarepeat- und Zentralregion des PrP^c gerichtet sind, zeigten eine Affinität zu glykosyliertem *full-length*(FL)-PrP^c verglichen mit den unglykosylierten PrP^c-Spezies (Abb. 15 A, B). Variationen im PrP^c-Bandenmuster konnten zwischen dem Antikörper 8B4, welcher ein Epitop innerhalb der amino-terminalen Domäne (Verhältnis zwischen unglykosyliertem und glykosyliertem PrP^c: 10% / 90%) erkennt, und Antikörpern, die gegen die Octarepeat- und Zentralregion des PrP^c (Verhältnis zwischen unglykosyliertem und glykosyliertem PrP^c: 25% / 75%) gerichtet sind, beobachtet werden.

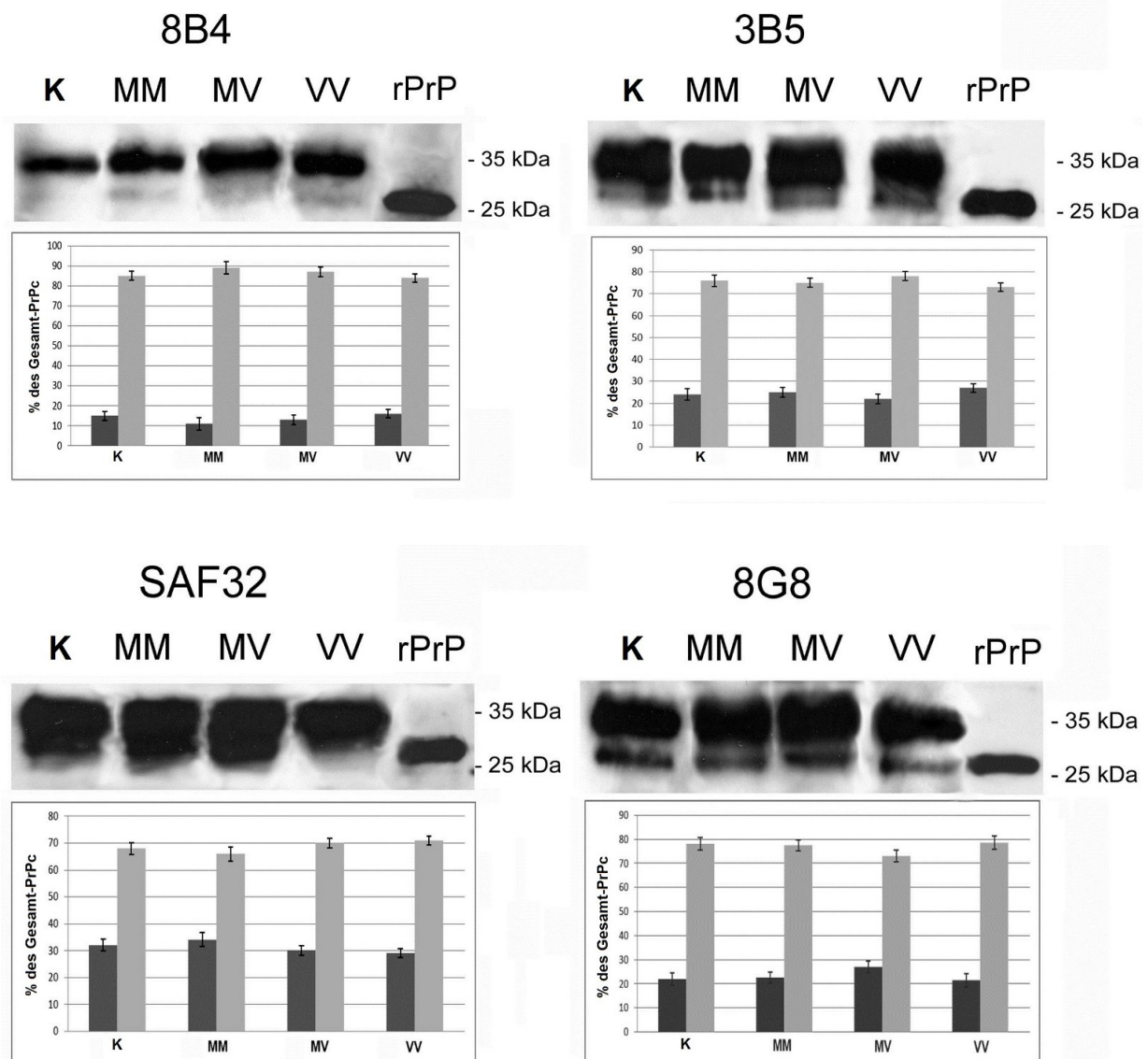
Eine Zunahme der Signalintensität bezüglich der unglykosylierten PrP^c-Form konnte in Western Blots, bei denen auf die Core- oder Carboxy-terminale Region des PrP^c (Aminosäuren 140-180) gerichtete Antikörper eingesetzt wurden, beobachtet werden. Als Vertreter dieser Gruppe von

Ergebnisse

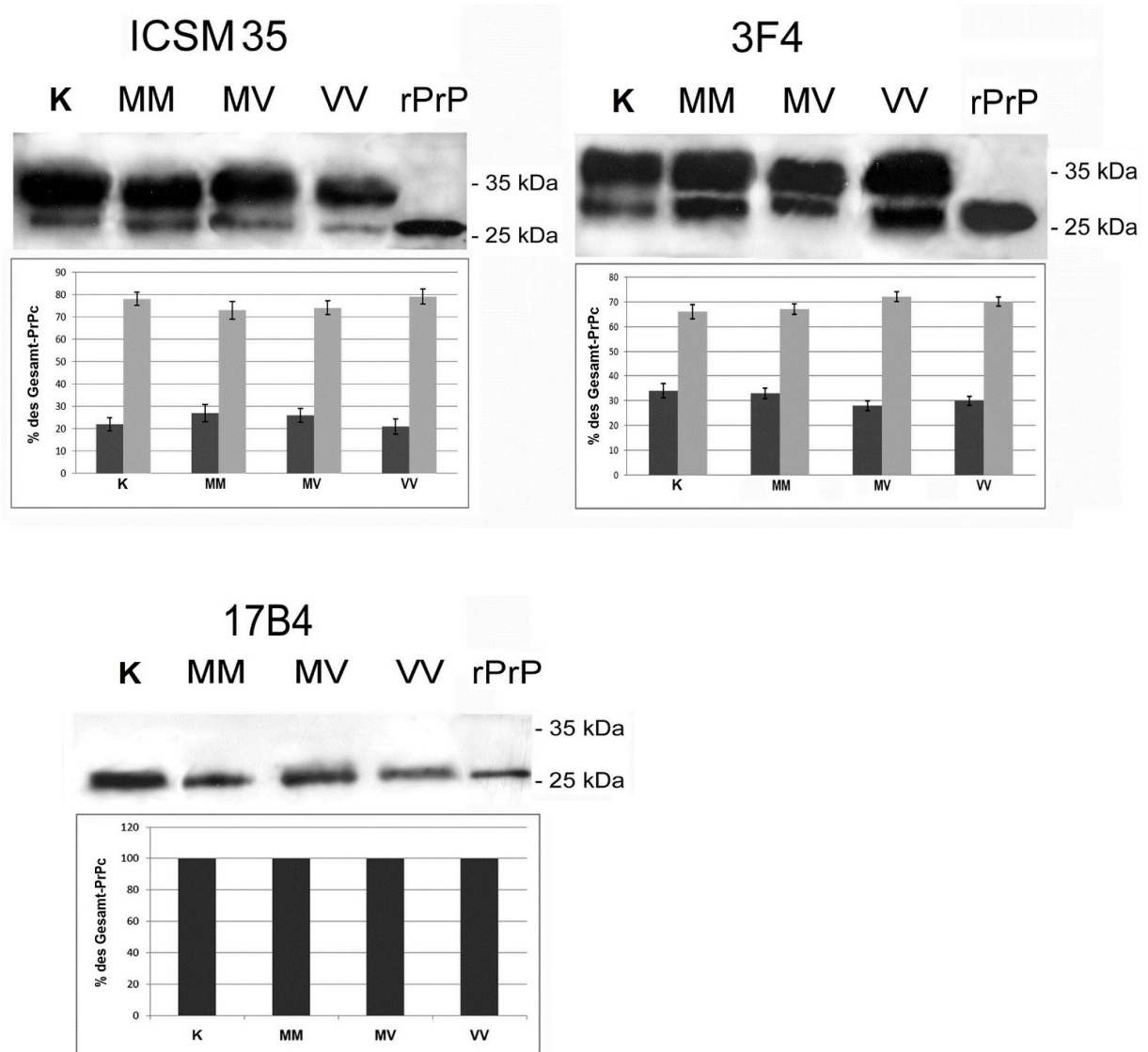
Antikörpern waren 1E2, 12F10 und 8H4 imstande mindestens drei unterscheidbare PrP^c-Isoformen mit den Molekulargewichten 36, 27 sowie 21 kDa nachzuweisen. Zusätzlich zum FL-PrP^c waren diese Antikörper in der Lage eine trunkierte PrP^c-Form von 21 kDa, die mit dem C2-Fragment des PrP^c korrespondieren könnte (Abb. 15 C), zu detektieren.

Ein charakteristisches Bandenmuster konnte mithilfe des monoklonalen Antikörpers, SAF70, der FL-PrP^c (glykosyliert und unglykosyliert) sowie vier trunkierte PrP^c-Fragmente mit einem Molekulargewicht von 21, 18, 13 und 12 kDa erkennt, beobachtet werden. Alle diese PrP^c-Fragmente stellten sich als PK-sensitiv heraus. Darüber hinaus präsentierte SAF70 eine höhere Affinität zum unglykosylierten FL-PrP^c als zu dessen glykosylierter Form (Abb. 15 C).

A



Ergebnisse

B

Ergebnisse

C

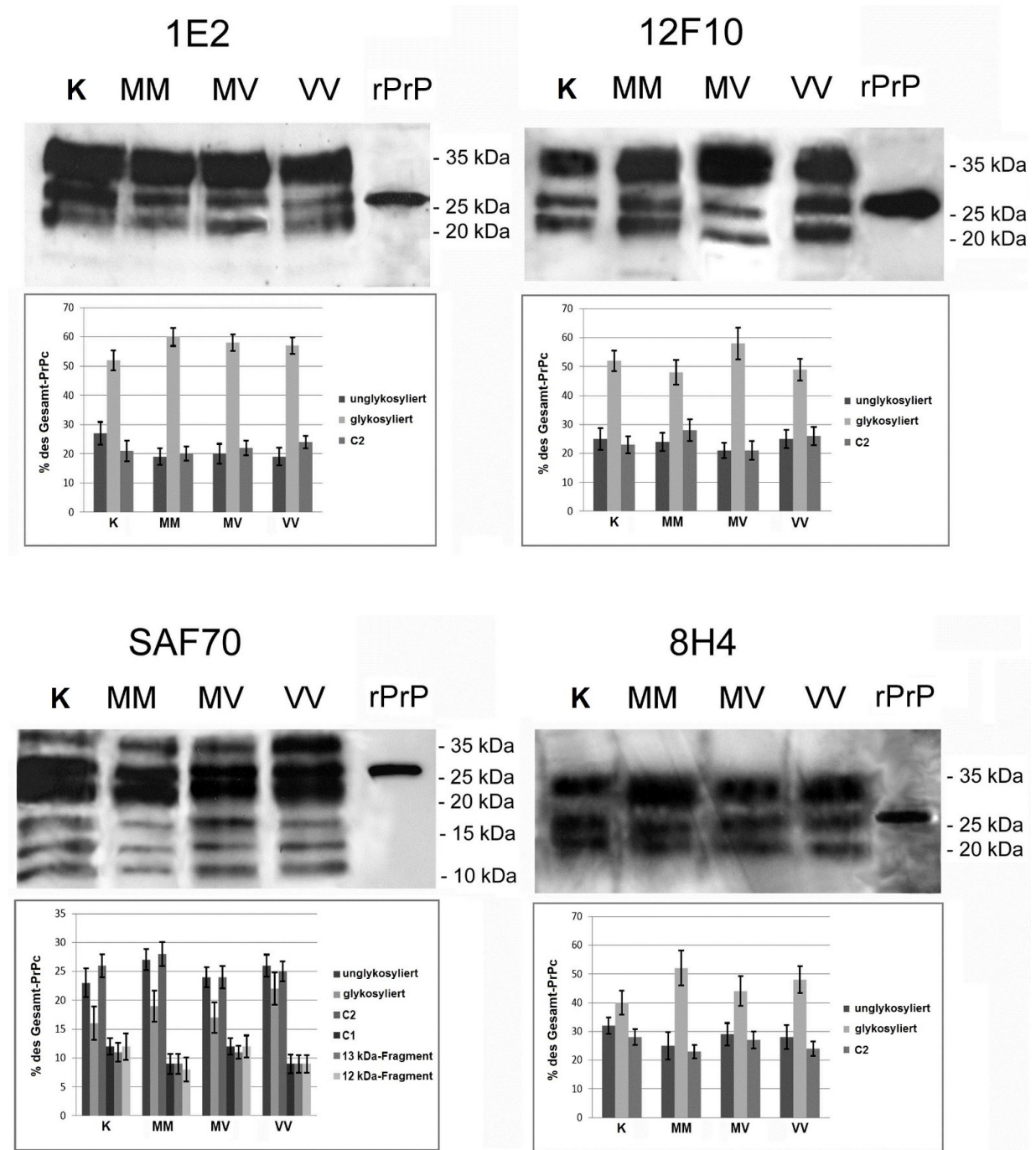


Abbildung 15: Analyse der Glykosylierungsmuster zellulären Prionproteins. Untersuchung der PrP^c-Glykosylierungen der drei sCJD-Codon-129-Genotypen (MM, MV und VV) in humanem Liquor mittels verschiedener Antikörper. A: Verwendung der Antikörper 8B4, 3B5, SAF32 und 8G8 (gegen die N-terminale Domäne und die Octarepeat-Region des PrP^c gerichtet). Zwei PrP^c-Banden wurden als FL-glykosyliertes (36 kDa) und unglykosyliertes (27 kDa) PrP^c detektiert. B: Die Antikörper 3F4 und ICSM35, gerichtet auf die Zentralregion des PrP^c, ergaben

Ergebnisse

ein ähnliches Bandenmuster wie die Antikörper, die gegen den N-terminus oder die Octarepeat-Region gerichtet sind, wobei 17B4 das Fehlen von an Asp 181 monoglykosyliertem PrP^c in allen Codon-129-Genotypen zeigte. C: Die Kern-Region-spezifischen Antikörper, 1E2, 12F10 und 8H4. Dargestellt sind PrP^c-Banden mit 36, 27 and 21 kDa. SAF70 detektierte darüber hinaus trunkierte PrP^c-Formen mit einem Molekulargewicht von 21, 18, 13 und 12 kDa. Eine positive Kontrolle bestehend aus rekombinantem PrP (rPrP) bestätigte die Spezifität der verschiedenen Antikörper. Für jeden Antikörper wurde die PrP^c spezifische Signalintensität aller detektierbaren PrP^c Banden mit 100% definiert. Unglykosyliertes FL-PrP^c (dunkelgraue Balken), glykosyliertes FL-PrP^c (hellgraue Banden) sowie die PrP^c-Fragmente C2, C1, 13 kDa und 12 kDa werden als prozentualer Anteil des Gesamt-PrP^c dargestellt. Für jeden Antikörper bestätigten wiederholte Gel-Durchgänge mit Proben von mindestens vier verschiedenen Patienten (n = 4) pro Gruppe die abgebildeten Proportionen (\pm SD; für jede Probe, P > 0.05, Wilcoxon–Mann–Whitney Test). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD) von vier Individuen (n = 4) und wurden für jede PrP-Form als Prozentanteil des Gesamt-PrP^c kalkuliert.

Der Antikörper SAF84, welcher spezifisch für Hamster-, Maus-, Schaf- und Rinder-PrP^c ist, war erwartungsgemäß nicht in der Lage humanes PrP^c zu detektieren (Abb. 16).

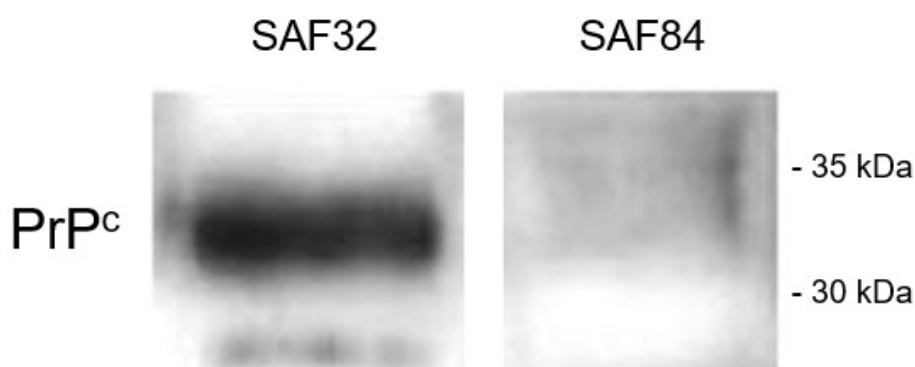


Abbildung 16: Spezifitätsüberprüfung der PrP-Detektion mittels der Antikörper SAF32 und SAF84. Dieselbe Probe humanen Liquors wurde auf zwei verschiedene Gele aufgetragen. Im Western Blot zeigte sich entsprechend der Spezifität der verwendeten Antikörper eine Detektion des zellulären PrP durch SAF32, nicht aber durch SAF84.

Ergebnisse

Für die Deglykosylierung von PrP^c wurde eine Behandlung mit N-Glykosidase F (PNGase F) eingesetzt. Das Verschwinden von glykosyliertem PrP^c und der Anstieg von unglykosyliertem PrP^c demonstriert die Spezifität unserer Immundetektion (Abb. 17 A, B). Zudem beweist es den unglykosylierten Zustand des durch SAF70 nachgewiesenen trunkierten PrP^c-Fragments (Abb. 17 B).

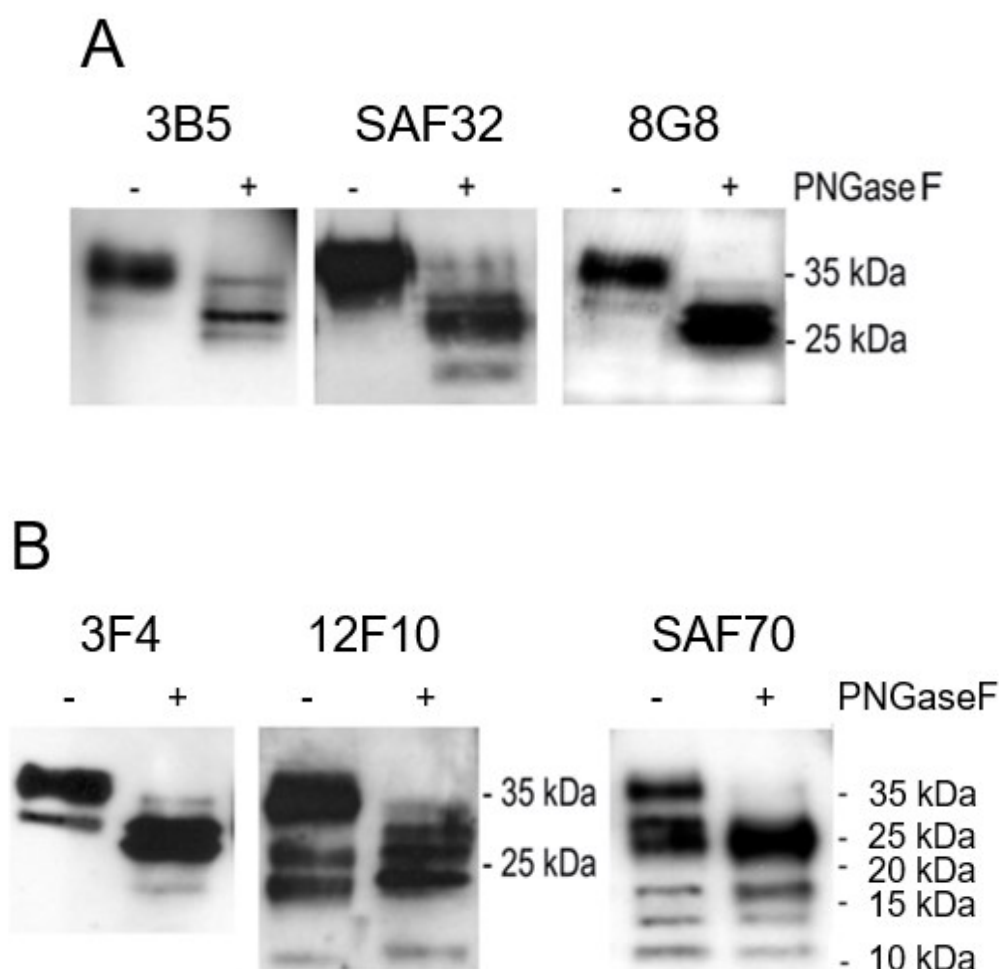


Abbildung 17: Deglykosylierung von PrP^c in humanem Liquor. Die CSF-Proben stammten von Patienten mit sCJD (MM). Sie wurden entweder unbehandelt belassen oder mit N-Glykosidase F (PNGase F) versetzt und anhand der Antikörper 3B5, SAF32 und 8G8 (A) bzw. 3F4, 12F10 und SAF70 (B) untersucht. Nach enzymatischer Deglykosylierung konnte in allen Fällen eine erhöhte Signalintensität der unglykosylierten PrP^c-Isoform beobachtet werden. Eine Überlagerung von unglykosyliertem FL-PrP^c und glykosylierten PrP^c-Fragmenten trat nicht auf. Die gleichen Ergebnisse konnten zweimal mit Proben unterschiedlicher Patienten reproduziert werden.

3.3 Einfluss des PRNP-Codon-129-Polymorphismus auf die Glykosylierung und Prozessierung von PrP^c

In unserer Western-Blot-Analyse unterschiedlicher PrP^c-Isoformen verglichen wir Liquorproben von drei sCJD-Codon-129-Genotypen genauso wie Kontrollproben von Patienten ohne Prionenerkrankung. Wir quantifizierten die Intensität aller PrP^c-Banden mittels *Scion Image*. Unser Ziel war eine Abschätzung des prozentualen Anteils der verschiedenen PrP^c-Formen am Gesamt-PrP^c. Für jede Patientengruppe verglichen wir den PrP^c-Anteil von mindestens vier Individuen und kalkultierten die Standardabweichung. Anschließend wurden die PrP-Anteile der angegebenen Patientengruppen statistisch analysiert.

Interessanterweise fielen nur geringe Variationen zwischen den sCJD-Codon-129-Genotypen und den im Codon-129-Methionin-homozygoten Kontrollen auf. Die Unterschiede waren bei allen untersuchten Antikörpern nicht signifikant ($P > 0.05$, *Wilcoxon-Mann-Whitney-Test*) und könnten auf die individuelle Variabilität der Liquorproben zurückzuführen sein (Abb. 15 A-C). Beispielsweise ergab der Antikörper 3B5 beim Vergleich der Kontrolle mit den sCJD-MM-Gruppen einen Wert von $P = 0.2$. Stärkere Schwankungen konnten in den PrP-Mustern der Kontrolle und sCJD-VV-Gruppen mit dem Antikörper SAF70 beobachtet werden. In diesem Fall ergab die statistische Analyse eine Standardabweichung von $P = 0.09$ für die glykosylierte PrP^c-Form.

Kontrollproben von Patienten, die Methionin-homozygot, Methionin/Valin-heterozygot und Valin-homozygot am Codon 129 (MM, MV und VV) waren, präsentierten ebenso wenig signifikante Unterschiede hinsichtlich ihrer PrP^c-Bandenmuster ($P > 0.05$, Abb. 18).

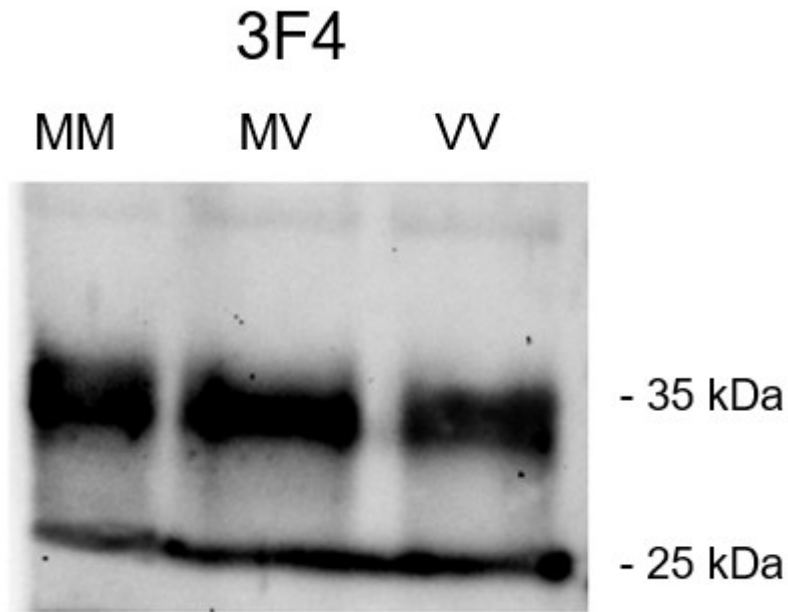
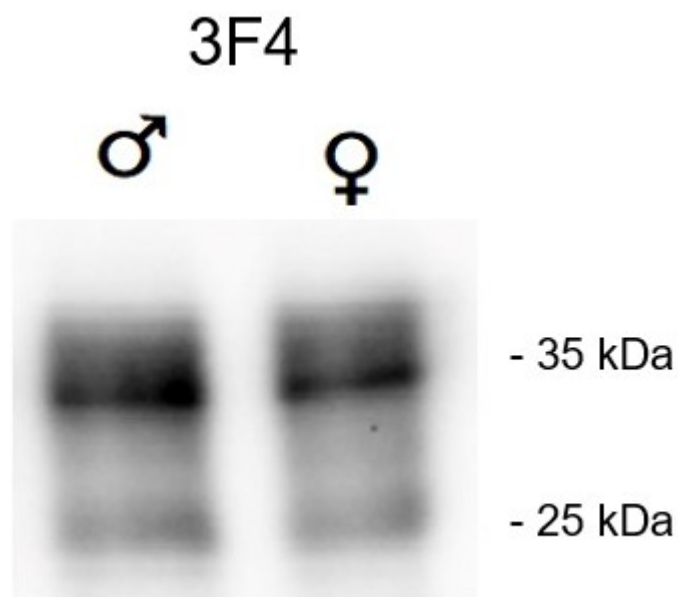


Abbildung 18: Vergleichende Western-Blot-Analyse des Codon-129-Polymorphismus (MM, MV und VV) anhand des Antikörpers 3F4. Bei allen drei Genotypen lässt sich die unglykosylierte ebenso wie die zweifach glykosylierte PrP^c-Form gleichermaßen darstellen.

Unter Verwendung der Antikörper 3F4, 12F10 und SAF70 fanden wir keinen Hinweis darauf, dass das Alter oder das Geschlecht der Patienten (Abb. 19) einen Einfluss auf die Komposition der PrP^c-Isoformen hat.



Ergebnisse

Abbildung 19: Western-Blot-Analyse der Liquorproben zweier Kontrollen unterschiedlichen Geschlechts. Am Beispiel des Antikörpers 3F4 zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der PrP^c-Bandenmuster. Gezeigt wird eine repräsentativer Western Blot von n=5 Patienten.

Im Rahmen einer weiteren Versuchsreihe verglichen wir die PrP^c-Profile im Liquor von sCJD- und gCJD-Patienten. Neben gCJD-Proben von Patienten mit der E200K-Mutation und folglich MM-Homozygotie am Codon 129 bezogen wir auch Proben Methionin-homozygoter sporadischer CJD-Patienten in die Analyse mit ein. Die PrP^c-Muster wurden unter Verwendung der Antikörper 3B5, SAF32, 8G8, 3F4 und SAF70 untersucht. Wir stellten fest, dass sich das Verhältnis zwischen dem unglykosylierten und dem glykosylierten PrP^c mit einem etwas größeren Anteil (5-10 %) der unglykosylierten PrP^c-Form in den gCJD-Fällen (Abb. 20 A) geringfügig verschob. Dennoch ergaben die statistischen Analysen für alle getesteten Antikörper keine signifikanten Unterschiede zwischen sCJD- und gCJD-Patienten (für alle PrP^c-Isoformen war $P > 0.05$) (Abb. 20 B).

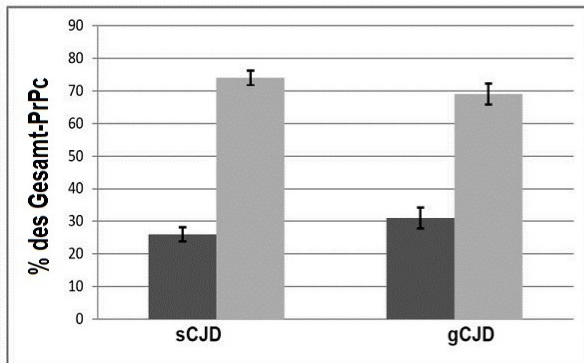
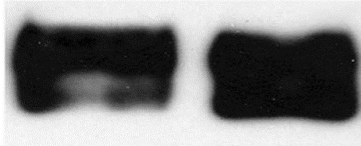
Abschließend untersuchten wir Liquor von drei unterschiedlichen Typen von Prionenerkrankungen, nämlich sCJD, FFI und GSS, unter Verwendung der Antikörper 3B5, 3F4, 12F10 und SAF70. Alle Patienten waren assoziiert mit dem Methionin-homozygoten Genotyp am Codon 129 des PrP^c-Gens. Die Befunde bestätigten, dass der Anteil der PrP^c-Glykoformen und das Auftreten trunkierter PrP^c-Formen von diesen Typen von Prionenerkrankungen nicht beeinflusst werden (Abb. 20 C). Ein statistisch relevanter Unterschied bezüglich der Anteile der PrP^c-Isoformen konnte ebenso wenig beobachtet werden.

Ergebnisse

A

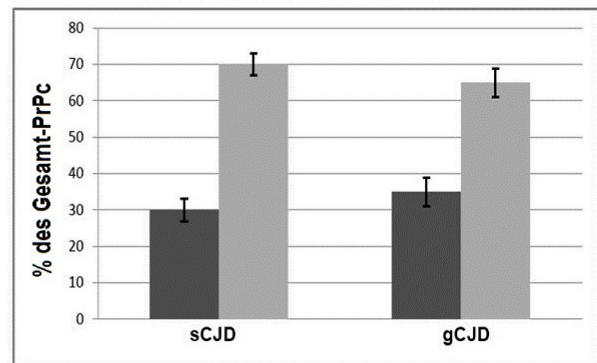
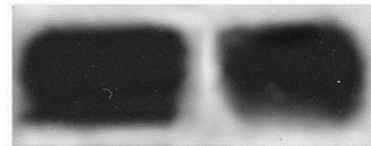
3B5

sCJD gCJD



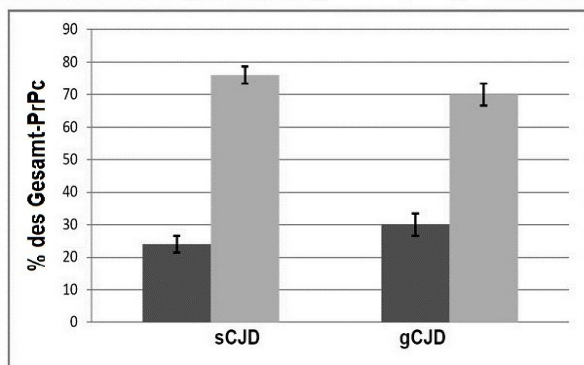
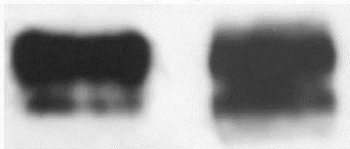
SAF32

sCJD gCJD



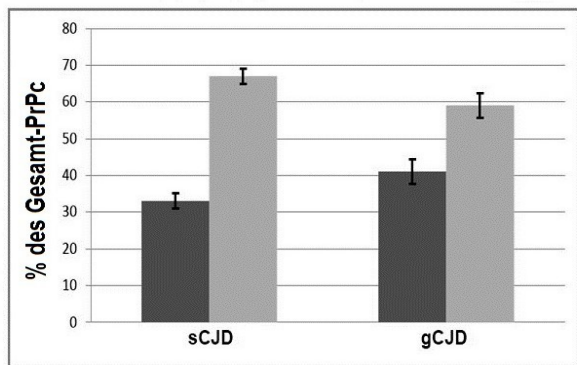
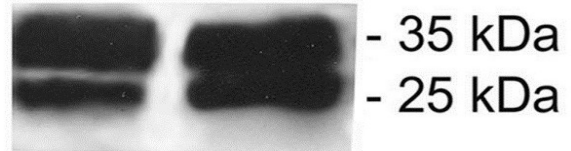
8G8

sCJD gCJD

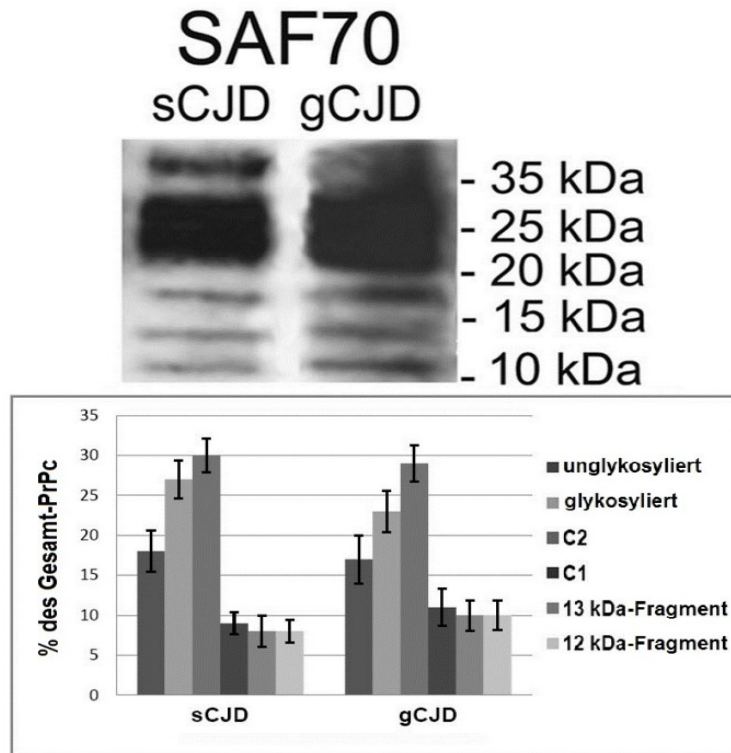


3F4

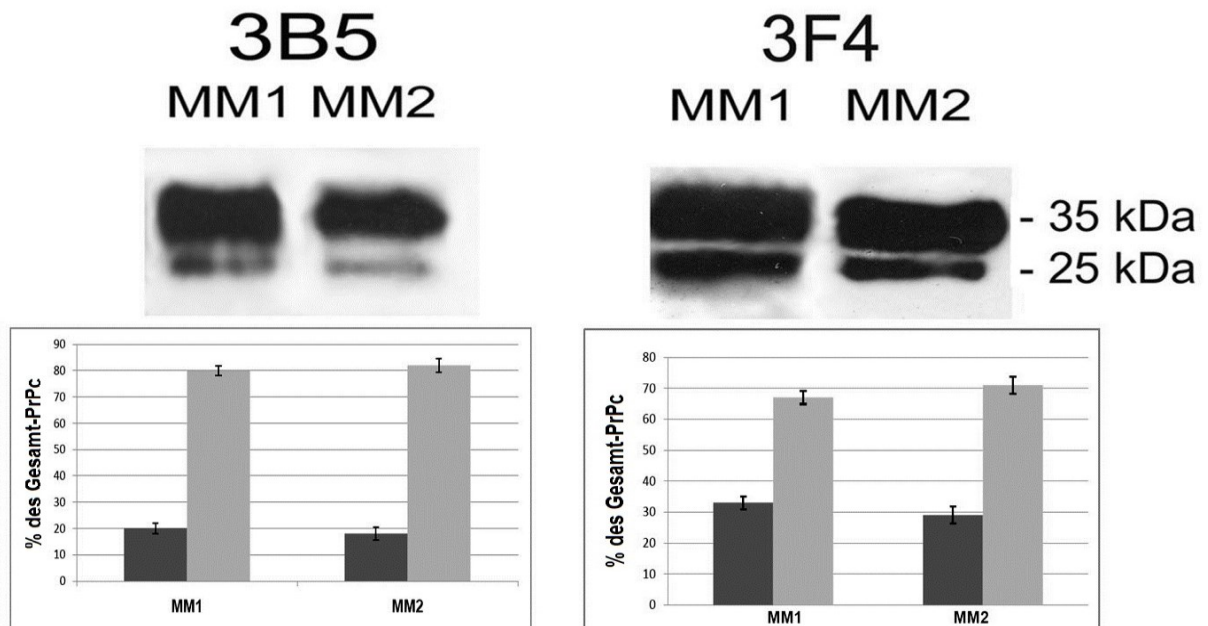
sCJD gCJD



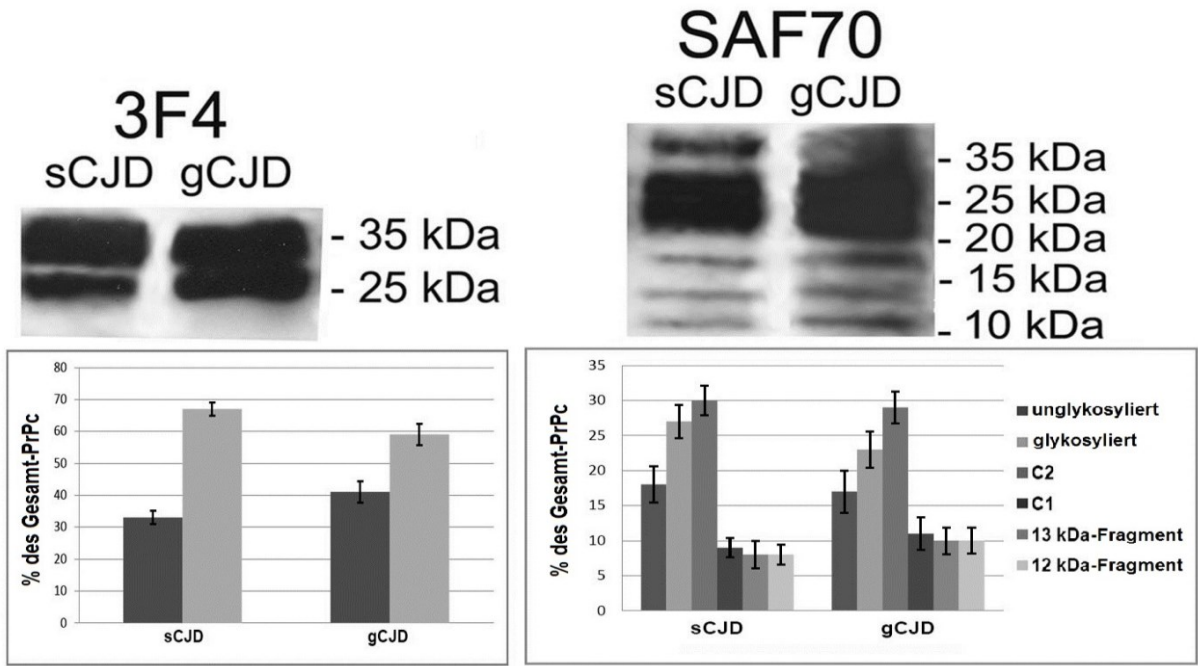
Ergebnisse



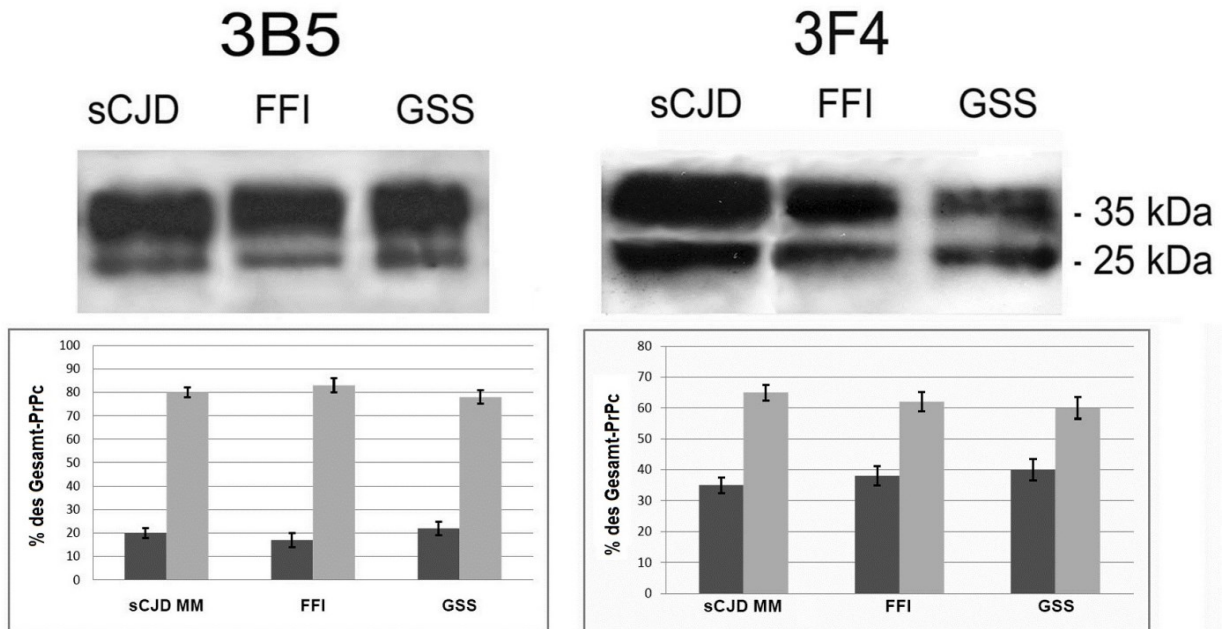
B



Ergebnisse



C



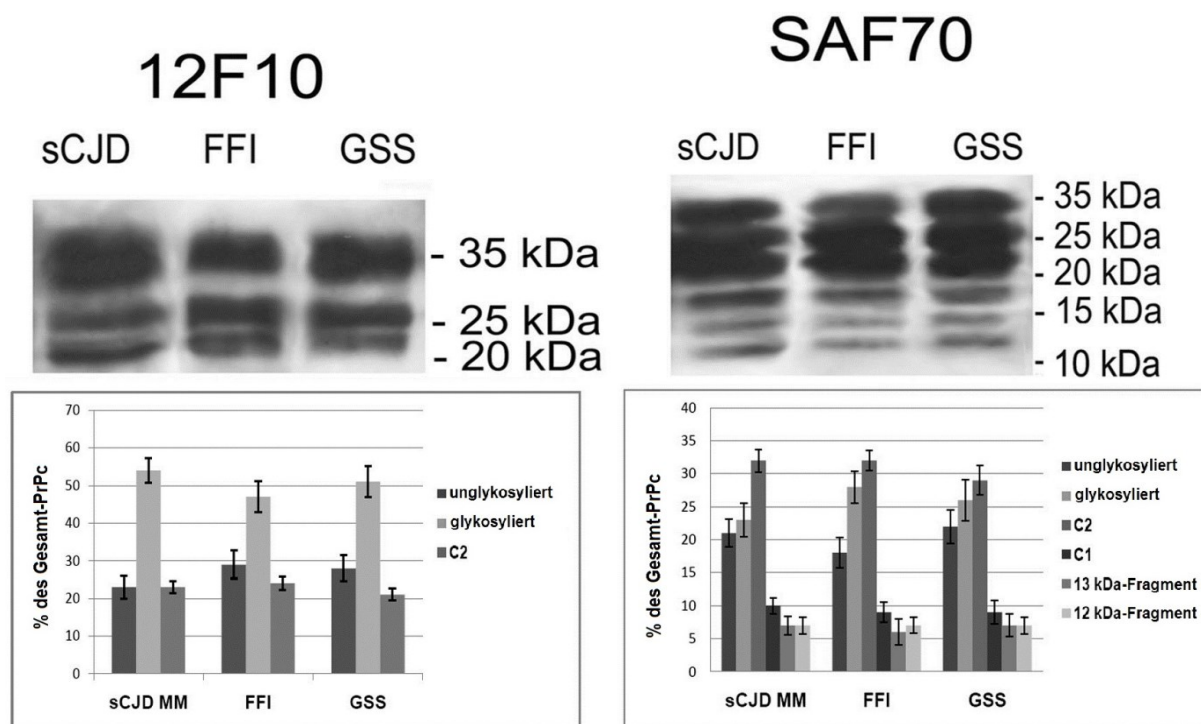


Abbildung 20: Vergleichende Analyse von PrP^c-Isoformen im CSF verschiedener Typen humaner Prionenerkrankungen. A: Detektion von PrP^c-Isoformen im Liquor von Patienten mit sCJD (MM) und gCJD E200K (MM) unter Verwendung der Antikörper 3B5, SAF32, 8G8, 3F4 und SAF70. B: CSF-Proben von sCJD-Patienten mit verschiedenen PrP^{Sc}-Typen MM1 und MM2 ergaben einen gleichen PrP^c-Glykosylierungsstatus. C: Untersuchung von CSF-Proben von Patienten mit FFI und GSS im Vergleich zu sCJD (MM). Unglykosyliertes FL-PrP^c (dunkelgraue Balken), glykosyliertes FL-PrP^c (hellgraue Balken) sowie die PrP^c-Fragmente C2, C1, 13 und 12 kDa sind dargestellt als prozentualer Anteil des Gesamt-PrP^c. Für jeden Antikörper bestätigten wiederholte Gelläufe mit Proben von mindestens vier verschiedenen Patienten (n = 4) pro Gruppe die dargestellten Proportionen. (± SD; für jede Probe, P ≥ 0,05, Wilcoxon-Mann-Whitney Test). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung von vier Individuen (n=4) und wurden für jede PrP-Form als prozentualer Anteil des Gesamt-PrP^c berechnet.

4. Diskussion

4.1 Heterogenität von PrP^c

Sowohl das menschliche Hirngewebe als auch der *Liquor cerebrospinalis* enthalten eine hochkomplexe Mischung von PrP^c-Isoformen. Durch Kombination von zweidimensionalen Immunoblot-Analysen und verschiedenen monoklonalen PrP^c-Antikörpern konnten bereits mehr als 50 unterschiedliche PrP^c-Spezies in humanem Hirngewebe nachgewiesen werden (Castagna et al. 2002; Pan et al. 2002). Vergleicht man die Isoformen-Zusammensetzung in postmortalem menschlichen Gehirngewebe kann die PrP^c-Heterogenität in Bezug auf verschiedene Hirnregionen sehr differieren (Beringue et al. 2003; Kuczius et al. 2007). Diese Tatsache deutet an, dass der PrP^c-Metabolismus von Bedeutung für die Pathophysiologie und die Übertragung von PrP^{Sc} sein könnte. Unsere Studie liefert eine vergleichende Darstellung von PrP^c-Isoformen in humanem CSF von Patienten mit unterschiedlichen sCJD Codon 129-Genotypen, unterschiedlichen PrP^{res}-Typen (typische und atypische CJD), gCJD (E200K) oder anderen genetisch bedingten Prionenerkrankungen (FFI und GSS). Bisher existieren nur sehr wenige Studien über unterschiedliche PrP^c-Isoformen in Liquor- und Blutproben von Patienten mit humanen Prionenerkrankungen, und die Funktion der identifizierten PrP^c-Formen ist noch immer unbekannt (Castagna et al. 2002; Zanusso et al. 2004; Choi et al. 2009). Abweichungen im PrP^c-Metabolismus könnten potentiell mit klinischen Variationen zwischen CJD-Subtypen assoziiert sein, und könnten sich darüber hinaus bei der Suche nach neuen TSE-Biomarkern als hilfreich erweisen. In jedem Fall dürfte ein besseres Wissen über die Funktion und den Metabolismus des PrP^c bei der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze für Prionenerkrankungen von Nutzen sein.

4.2 Nachweis unterschiedlicher PrP^c-Isoformen in humanem Liquor

Das Vorhandensein von PrP^c in menschlichem *Liquor cerebrospinalis* wurde bereits durch Tagliavini et al. (1992) gezeigt, während die Detektion von PrP^{res} im CSF mittels Immunoblotting nicht gelang (Wong et al. 2001). Geringe Mengen pathologischer PrP-Aggregate konnten im Liquor von Patienten mit humanen Prionenerkrankungen nur durch ultrasensitive Fluoreszenz-Korrelationsspektroskopie (FCS) nachgewiesen werden (Bieschke et al. 2000) sowie mittels in vitro Protein-Fehlfaltungs-Assays wie die RT-QuIC nachgewiesen werden (Atarashi et al. 2011; Cramm et al. 2015 und 2016; Schmitz et al. 2016).

Diskussion

Für eine verlässliche Analyse der PrP^c-Glykosylierungsprofile ist es wichtig sich die offensichtlichen Variationen zwischen den antikörperspezifischen Erkennungsmustern des PrP^c vor Augen zu führen (Zanusso et al., 1998). Aus diesem Grund untersuchten wir die Bandenmuster zwölf monoklonaler PrP^c-Antikörper, welche an unterschiedliche Regionen des PrP^c binden. In Abhängigkeit der Epitope der primären Antikörper wichen die PrP^c-Profile voneinander ab. PrP^c-Antikörper deren Epitop in der Amino-terminalen, Octarepeat- sowie Zentralregion lag, detektierten zwei spezifische PrP^c-Banden im Western Blot mit einem molekularen Gewicht von 27 und 35 kDa. Bei der 35 kDa Bande handelte es sich um zweifach-glykosyliertes PrP^c und bei der 27 kDa Bande um unglykosyliertes PrP^c. Mithilfe des Antikörpers 17B4, welcher nur zwei von vier PrP^c-Glykoformen detektiert, welche nicht an Asp 197 glykosyliert sind, konnten wir das Fehlen von an Asp 181 monoglykosyliertem PrP^c im humanen Liquor zeigen.

Als nächstes widmeten wir uns der Analyse der Antikörper-spezifischen PrP^c-Isoform Detektionsmuster (alle Isoformen wurden als 100% definiert). Antikörper mit einem gegen die Amino-terminale, die Octarepeat- oder die Zentralregion von PrP^c gerichteten Epitop zeigten eine höhere Präferenz für glykosyliertes PrP^c (~75% des gesamten PrP^c) und eine geringere Affinität für unglykosyliertes PrP^c (~25%). Im Gegensatz dazu präsentierten Kernregion und Carboxyl-terminal gerichtete Antikörper PrP^c-Bandenmuster, die sich aus etwa 50% glykosyliertem und circa 25% unglykosyliertem FL-PrP^c sowie etwa 25% trunkiertem PrP^c zusammensetzten.

Western Blots unter Verwendung von SAF70 wiesen auf die Existenz von vier PK-sensitiven trunkierten PrP^c-Fragmenten mit einer Größe von 21, 18, 13 und 12 kDa hin. Zwei Fragmente korrespondierten mit dem Molekulargewicht des C2-Fragments (21 kDa) und des C1-Fragments (18 kDa), die bekanntermaßen durch die alpha- und beta-Spaltung von PrP^c am Aminosäurerest 90/91 und 111/112 (Abb. 21) im Gehirn generiert werden (Chen et al. 1995; Jiménez-Huete et al. 1998; Mangé et al. 2004; Cissé et al. 2005). Nach unserem Wissen konnten die PrP^c-Spaltprodukte mit dem Molekulargewicht von 13 und 12 kDa für CSF bisher noch nicht beschrieben werden. Gemäß Literatur wurden lediglich PK-resistente und in Detergentien unlösliche PrP^{Sc}-Fragmente mit dem gleichen Molekulargewicht im Hirngewebe von iatrogenen CJD-Fällen sowie sCJD-Patienten, aber nicht in Kontrollen gefunden (Satoh et al. 2003; Zou et al. 2003; Zanusso et al. 2002 und 2004).

Diskussion

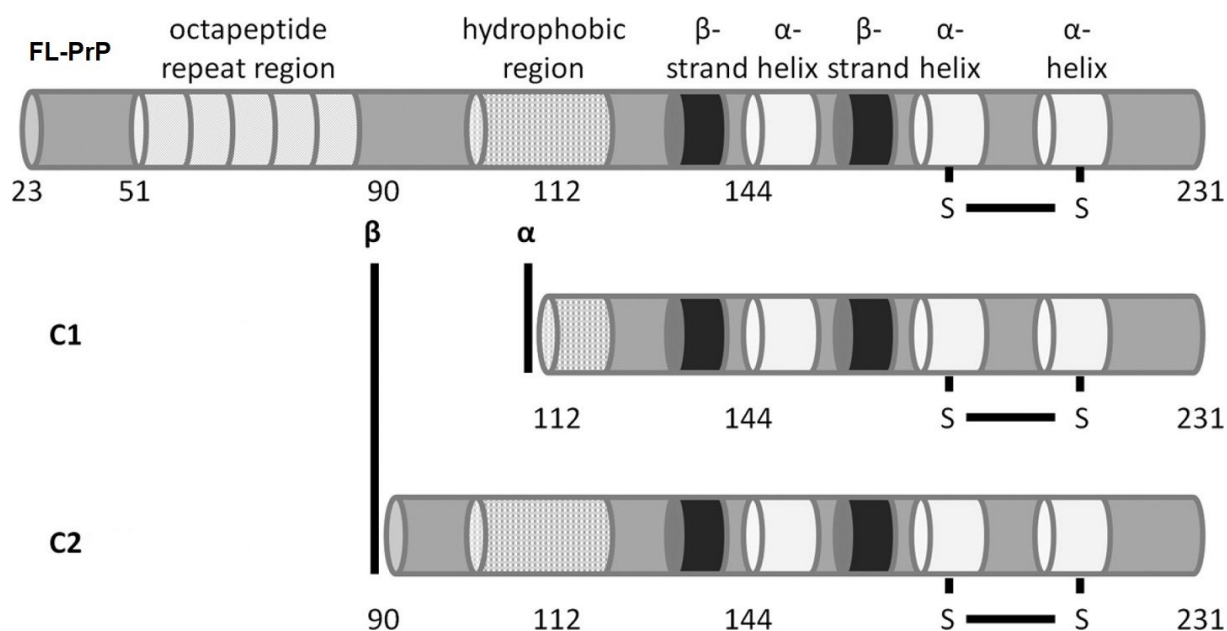


Abbildung 21: Schematische Darstellung der detektierten PrP^c-Spaltprodukte. Oben: FL-PrP^c (AS 23-231). Mitte: C1-Fragment (18 kDa, AS 112-231) nach alpha-Spaltung des PrP^c an AS-Rest 111/112. Unten: C2-Fragment (21 kDa, AS 90-231) nach beta-Spaltung des PrP^c an AS-Rest 90/91. (Quelle: Johanssen et al. 2014)

Mehrere Studien haben gezeigt, dass trunkierte PrP^c-Formen für die physiologische Funktion von PrP^c in der Signaltransduktion von Bedeutung sind (Mouillet-Richard et al. 2000; Chen et al. 2003). Es wurde auch vermutet, dass die Fragmente C1 und C2 eine Rolle bei der Kontrolle von Zellüberleben und -protektion gegenüber oxidativem Stress spielen könnten (Watt et al. 2005; Watt und Hooper 2005; Sunyach et al. 2007). Wir fanden heraus, dass diese PrP^c-Spaltprodukte zu gleichen Mengen im CSF von Kontrollen und CJD-Patienten vorhanden waren, was darauf hindeutete, dass diese Fragmente keine krankheitsspezifischen molekularen Spezies verkörpern.

4.3 Vergleich von PrP^c-Isoformen im Liquor verschiedener Typen humaner Prionenerkrankungen

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass der Polymorphismus an Codon 129 den klinischen und pathologischen Phänotyp der sCJD beeinflussen kann, beispielsweise ist der durchschnittliche Krankheitsverlauf von sCJD-MM1-Patienten kürzer als der von sCJD-VV2-Patienten (Parchi et al. 1999; Collins et al. 2006).

Diskussion

Die Abhängigkeit der PrP^{Sc}-Konformation, der Krankheitsentstehung und der PK-Resistenz pathologischer Prionproteine von den unterschiedlichen Codon-129-Genotypen ist bereits beschrieben worden (Pham et al. 2008; Uro Coste et al. 2008). Eine mögliche Erklärung für diese Befunde könnte die Tatsache sein, dass der Polymorphismus im PRNP womöglich eine Rolle in der Regulation von Expression und Prozessierung des PrP^c spielt. Aus diesem Grund untersuchten wir PrP^c-Profile in verschiedenen sCJD-Codon-129-Genotypen und Kontrollen ohne Prionenerkrankung. Um Variationen von PrP-Typ1 und -Typ2 ausschließen zu können verglichen wir zudem sCJD-MM1- und -MM2-Proben, welche ein beinahe identisches PrP^c-Glykosylierungsmuster zeigten. Unser Fokus war auf die Bestimmung der PrP^c-Isoformenverhältnisse und nicht auf die physiologischen PrP^c-Level gerichtet, die im Liquor von Patienten mit CJD und anderen neurodegenerativen Erkrankungen variieren können und keine ausreichende Biomarker-Spezifität aufweisen (Meyne et al. 2009). Interessanterweise konnte eine große quantitative Immunoblot-Analyse aller PrP^c-Glykoformen keine signifikanten Änderungen in den PrP^c-Expressionsprofilen bei Patienten mit unterschiedlichen PRNP-Codon-129-Genotypen zeigen. Unsere Ergebnisse koinzidieren mit einer Studie über die Expression und Prozessierung von PrP^c in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), die von sCJD-Patienten mit unterschiedlichen PRNP-Codon-129-Genotypen (MM, MV und VV) stammten (Segarra et al. 2009). Diese Studie zeigte, dass PrP^c-Glykoformenverteilungen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) von denen bei sCJD-Patienten mit unterschiedlichen PRNP-Codon-129-Genotypen nicht zu unterscheiden sind, und man schloss außerdem daraus, dass es keinen signifikanten Einfluss des PRNP-Codon-129-Genpolymorphismus der sCJD auf den Glykosylierungszustand des PrP^c gibt. In unserer Studie analysierten wir PrP^c im Liquor, welches bei intakter Blut-Hirnschranke zu ca. 80 % aus dem Gehirn stammt. Insofern erweitern unsere Ergebnisse der Untersuchungen an Material aus dem zentralen Nervensystem die bisherigen Beobachtungen bei PBMCs und legen nahe, dass die normale PrP^c-Prozessierung im Gehirn von Patienten mit humanen Prionenerkrankungen ebenso wenig vom Codon-129-Genotyp beeinflusst wird.

Ein weiterer relevanter Faktor, der bei der Unterscheidung unterschiedlicher CJD-Typen helfen könnte, ist die Herstellung verschiedener PrP-Fragmente. Innerhalb des frontalen Kortex fanden Notari et al. (2008) heraus, dass sich C-terminale PrP^{Sc}-Spaltungsfragmente innerhalb der CJD-Subtypen unterscheiden. Diese Erkenntnis führte uns dahin uns auf potentielle Unterschiede in der PrP^c-Spaltung bei sCJD-Codon-129-Genotypen zu fokussieren. Unsere Daten verdeutlichen, dass das PrP^c *in vivo* verschiedene endoproteolytische Spaltungen erfährt. Allerdings fanden wir keinen Hinweis darauf, dass bestimmte PrP^c-Fragmente mit einzelnen CJD-Codon-129-Genotypen oder PrP^{Sc}-Typen assoziiert sind. Wir konnten beobachten, dass die trunkierten PrP^c-

Diskussion

Formen physiologische Stoffwechselprodukte sind, die in Kontrollen wie auch in CJD-Fällen auftreten. Diese Ergebnisse bestätigen die Studie von Segarra (2009). Er konnte zeigen, dass es innerhalb der Expression der C1- und C2-Fragmente bei verschiedenen sCJD-Codon-129-Genotypen in PBMCs keine signifikanten Unterschiede gab.

Im Falle erblicher Formen der CJD geht man davon aus, dass Mutationen im PrP-Gen (z.B. E200K) die Krankheit durch eine Veränderung des PrP-Stoffwechsels auslösen können, welcher durch eine Zunahme von trunkierten Fragmenten (Capellari et al. 2000) sowie veränderter Glykoformenverhältnisse des PrP^{Sc} im Gehirn (Hill et al. 2006) gekennzeichnet ist. Hierzu analysierten wir den Liquor von sCJD-MM-, gCJD-MM-E200K-, FFI- und GSS-Patienten hinsichtlich möglicher Unterschiede in deren PrP^c-Bandenmustern. Die Ergebnisse korrespondierten mit den oben genannten Befunden bei der sCJD und zeigten erneut, dass das Verhältnis der PrP^c-Glykoformen und das Vorhandensein trunkierter PrP^c-Formen im Liquor keine geeigneten Kriterien zur Differenzierung verschiedener Prionenerkrankungen im eindimensionalen Western Blot sind.

In einer späteren Studie, in der PrP^c-Ladungsisoformen mittels 2-dimensionaler Western Blot Analyse (PrP^c-Isoformen wurden anhand ihres molekularen Gewichtes sowie anhand ihres isoelektrischen Punktes aufgetrennt) untersucht wurden, konnten unsere Beobachtungen im Wesentlichen bestätigt werden. Es wurden lediglich subtile Unterschiede bei der Zusammensetzung einzelner PrP^c-Ladungsisoformen bei sCJD-VV2- und FFI-Patienten im Vergleich zu den übrigen sCJD-Subtypen und gCJD-E200K-Patienten beobachtet, die keine diagnostische Relevanz aufwiesen (Schmitz et al. 2014).

Zusammenfassend verdeutlichen unsere Daten, dass die PrP^c-Populationen signifikante Mengen von trunkierten PrP-Formen zusätzlich zu den FL-PrP-Formen enthalten. Wir konnten verschiedene PrP^c-Fragmente mit Molekulargewichten von 12, 13, 18 und 21 kDa durch SAF70 detektieren. 12 und 13 kDa PrP^c-Formen wurden bisher im CSF nicht beschrieben. Darüber hinaus bestätigten wir ähnliche PrP^c-Expressionsmuster im CSF verschiedener sCJD Codon 129-Genotypen für Prionenerkrankungen wie PrP^{Sc} Typ 1 und Typ 2, gCJD-E200K, FFI, GSS und Kontrollen, was darauf hinweist, dass die PrP^c-Glykosylierung und -Prozessierung keinen nachweisbaren Einfluss auf die klinische Variabilität ausübt, die wir in den unterschiedlichen Typen humaner Prionenerkrankungen beobachten.

5. Zusammenfassung

Das zelluläre Prionprotein ist ein multifunktionales, evolutionär hochgradig konserviertes und ubiquitär exprimiertes Protein. Es durchläuft eine Reihe von Modifikationen während seiner posttranslationalen Prozessierung, wobei verschiedene Glykoformen und trunkierte Fragmente resultieren. Es existieren nur wenige Daten über die Expression und Spaltung des zellulären Prionproteins beim Menschen.

In dieser Studie untersuchten wir die Zusammensetzung von Prionprotein-Isoformen im *Liquor cerebrospinalis* von Patienten mit verschiedenen humanen Prionenerkrankungen. Die erste Gruppe von Patienten war von einer sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit betroffen, bei der verschiedene Codon-129-Genotypen zu finden sind. Die zweite Gruppe umfasste Patienten mit einer genetischen Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, bei denen eine E200K-Mutation vorliegt. Die dritte Gruppe repräsentierte Patienten mit einer letalen familiären Insomnie, und die letzte Gruppe bestand aus Patienten mit einem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom.

Wir untersuchten, ob der Codon-129-Polymorphismus in der sporadischen Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und ebenso der Typ der Prionenerkrankung in Menschen Auswirkungen auf die Glykosylierung und Prozessierung des zellulären Prionproteins hat. Immunoblot-Analysen unter Verwendung verschiedener monoklonaler Prionprotein-Antikörper, die gegen unterschiedliche Epitope des zellulären Prionproteins gerichtet sind, zeigten für alle untersuchten Gruppen von Patienten ein einheitliches Vorherrschen der glykosylierten Prionprotein-Isoformen im Vergleich zur unglykosylierten Form.

Darüber hinaus detektierte der Antikörper SAF70 eine Reihe von Prionprotein-Fragmenten der Größe 21, 18, 13 und 12 kDa. Unsere weiteren experimentellen Funde deuteten darauf hin, dass die Polymorphismen am Codon-129 des Prionprotein-Gens, die E200K-Mutation und die verschiedenen untersuchten Typen humaner transmissibler spongiformer Enzephalopathien keinen messbaren Einfluss auf die Glykosylierung und Prozessierung des zellulären Prionproteins bei humanen Prionenerkrankungen ausüben.

6. Literaturverzeichnis

Acevedo C, Wille H (2014): The structure of human prions: from biology to structural models - considerations and pitfalls. *Viruses* 6, 3875-3892

Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC (1967): Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214, 764-766

Alperovitch A, Zerr I, Pocchiari M, Mitrova E, de Pedro Cuesta J, Hegyi I, Collins S, Kretzschmar H, van Duijn C, Will RG (1999): Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *The Lancet* 353, 1673-1674

Atarashi R, Satoh K, Sano K, Fuse T, Yamaguchi N, Ishibashi D, Matsubara T, Nakagaki T, Yamanaka H, Shirabe S et al. (2011): Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nature Medicine* 17, 175

Beringue V, Mallinson G, Kaiser M, Tayebi M, Sattar Z, Jackson G, Anstee D, Collinge J, Hawke S (2003): Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain* 126, 2065-2073

Bieschke J, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Poser S, Eigen M, Kretzschmar H (2000): Ultrasensitive detection of pathological prion protein aggregates by dual-color scanning for intensely fluorescent targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5468

Billeter M, Riek R, Wider G, Hornemann S, Glockshuber R, Wüthrich K (1997): Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 7281

Brandner S, Raeber A, Sailer A, Blattler T, Fischer M, Weissmann C, Aguzzi A (1996): Normal host prion protein (PrP^C) is required for scrapie spread within the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13148-13151

Brown DR, Besinger A (1998): Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem J* 334, 423-429

Literaturverzeichnis

Büeler HR, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993): Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-1347

Büeler HR, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, de Armond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992): Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-582

Cali I, Castellani R, Yuan J, Al-Shekhlee A, Cohen ML, Xiao X, Moleres FJ, Parchi P, Zou WQ, Gambetti P (2006): Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease revisited. *Brain* 129, 2266-2277

Capellari S, Parchi P, Russo CM, Sanford J, Sy MS, Gambetti P, Petersen RB (2000): Effect of the E200K mutation on prion protein metabolism. *Am J Pathol* 157, 613-622

Castagna A, Campostrini N, Farinazzo A, Zanusso G, Monaco S, Righetti PG (2002): Comparative two-dimensional mapping of prion protein isoforms in human cerebrospinal fluid and central nervous system. *Electrophoresis* 23, 339-346

Caughey B, Raymond GJ (1991): The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J Biol Chem* 266, 18217-18223

Chen SG, Mangé A, Dong L, Lehmann S, Schachner M (2003): Prion protein as trans-interacting partner for neurons is involved in neurite outgrowth and neuronal survival. *Mol Cell Neurosci* 22, 227-233

Chen SG, Teplow DB, Parchi P, Teller JK, Gambetti P, Autilio-Gambetti L (1995): Truncated forms of the human prion protein in normal brain and in prion diseases. *J Biol Chem* 270, 19173-19180

Chesebro B, Trifilo M, Race R, Meade-White K, Teng C, LaCasse R, Raymond L, Favara C, Baron G, Priola S et al. (2005): Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308, 1435-1439

Literaturverzeichnis

Choi EM, Geschwind MD, Deering C, Pomeroy K, Kuo A, Miller BL, Safar JG, Prusiner SB (2009): Prion proteins in subpopulations of white blood cells from patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lab Invest* 89, 624-635

Cissé MA, Sunyach C, Lefranc-Jullien S, Postina R, Vincent B, Checler F (2005): The disintegrin ADAM9 indirectly contributes to the physiological processing of cellular prion by modulating ADAM10 activity. *J Biol Chem* 280, 40624-40631

Colby DW, Wain R, Baskakov IV, Legname G, Palmer CG, Nguyen HOB, Lemus A, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (2010): Protease-sensitive synthetic prions. *PLoS Pathog* 6, e1000736

Collinge J (1999): Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 354, 317-323

Collinge J (2001): Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 24, 519-550

Collinge J, Rossor M (1996): A new variant of prion disease. *Lancet* 347, 916-917

Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG (1994): Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* 370, 295-297

Collins S, Sanchez-Juan P, Masters CL, Klug GM, van Duijn C, Poggi A, Pocchiari M, Almonti S, Cuadrado-Corrales N, de Pedro-Cuesta J et al. (2006): Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 129, 2278-2287

Cramm M, Schmitz M, Karch A, Zafar S, Varges D, Mitrova E, Schroeder B, Raeber A, Kuhn F, Zerr I (2015): Characteristic CSF prion seeding efficiency in humans with prion diseases. *Mol Neurobiol* 51, 396-405

Cramm M, Schmitz M, Karch A, Mitrova E, Kuhn F, Mitrova E, Schroeder B, Raeber A, Varges D, Kim YS et al. (2016): Stability and reproducibility underscore utility of RT-QuIC for diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Mol Neurobiol* 53, 1896-1904

Literaturverzeichnis

Creutzfeldt HG (1920): Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie 57, 1-18

Deslys JP, Jaegly A, d'Aignaux JH, Mouthon F, de Villemeur TB, Dormont D (1998): Genotype at codon 129 and susceptibility to Creutzfeldt-Jakob disease. Lancet 351, 1251

Dodelet VC, Cashman NR (1998): Prion protein expression in human leukocyte differentiation. Blood 91, 1556-1561

Dudhatra G, Avinash K, Modi CM, Awale MM, Patel HB, Mody SK (2012): Transmissible spongiform encephalopathies affecting humans. ISRN Infectious Diseases 2013

Farquhar CF, Somerville RA, Bruce ME (1998): Straining the prion hypothesis. Nature 391, 345-346

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

Fong J, Rojas J, Bang J, Legati A, Rankin KP, Forner S, Miller ZA, Karydas AM, Coppola G, Grouse CK et al. (2017): Genetic prion disease caused by PRNP Q160X mutation presenting with an orbitofrontal syndrome, cyclic diarrhea and peripheral neuropathy. J Alzheimers Dis 55, 249-258

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

Gambetti P, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, Alsheklee A, Castellani R, Cohen M, Barria MA, Gonzalez-Romero D et al. (2008): A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. Ann Neurol. 63, 697-708

Gibbs CJ, Gajdusek D, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB (1968): Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): Transmission to the Chimpanzee. Science 161, 388-389

Literaturverzeichnis

Green A (2019): RT-QuIC: a new test for sporadic CJD. *Pract Neurol* 19, 49-55

Griffith JS (1967): Nature of the scrapie agent: self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043-1044

Groschup M, Harmeyer S, Pfaff E (1997): Antigenic features of prion proteins of sheep and of other mammalian species. *J Immunol Methods* 207, 89-101

Heinemann U, Krasnianski A, Meissner B, Vargas D, Kallenberg K, Schulz-Schaeffer WJ, Steinhoff BJ, Grasbon-Frodl EM, Kretzschmar HA, Zerr I (2007): Creutzfeldt-Jakob disease in Germany: a prospective 12-year surveillance. *Brain* 130, 1350-1359

Hermann P, Laux M, Glatzel M, Matschke J, Knipper T, Goebel S, Treig J, Schulz-Schaeffer W, Cramm M, Schmitz M, Zerr I (2018): Validation and utilization of amended diagnostic criteria in Creutzfeldt-Jakob disease surveillance. *Neurology* 91, e331-e338

Hill AF, Joiner S, Beck JA, Campbell TA, Dickinson A, Poulter M, Wadsworth JD, Collinge J (2006): Distinct glycoform ratios of protease resistant prion protein associated with PRNP point mutations. *Brain* 129, 676-685

Hopt A: Biophysikalische Untersuchungen zur physiologischen Bedeutung des Prionproteins als Metalloprotein. Med. Diss. LMU München 2004

Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, Terwilliger JD, Westaway D, Ott J, Prusiner SB (1989): Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome. *Nature* 338, 342-345

Iremonger K: Role of PrP^C glycosylation in health and disease. Med. Diss. Edinburgh 2013

Jaegly A, Boussin F, Deslys JP, Dormont D (1995): Human growth hormone-related iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: search for a genetic susceptibility by analysis of the PRNP coding region. *Genomics* 27, 382-383

Literaturverzeichnis

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

Johanssen VA, Johanssen T, Masters CL, Hill AF, Barnhem KJ, Collins SJ (2014): C-terminal peptides modelling constitutive PrP^c processing demonstrate ameliorated toxicity predisposition consequent to α -cleavage. *Biochem J* 459, 103-115

Johnston AR, Black C, Fraser J, MacLeod N (1997): Scrapie infection alters the membrane and synaptic properties of mouse hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol (Lond)* 500, 1-15

Kitamoto T, Doh-ura K, Muramoto T, Miyazono M, Tateishi J (1992): The primary structure of the prion protein influences the distribution of abnormal prion protein in the central nervous system. *Am J Pathol* 141, 271-277

Korth C, Streit P, Oesch B (1999): Monoclonal antibodies specific for the native, disease-associated isoform of the prion protein. *Meth Enzymol* 309, 106-122

Kretzschmar H (1998): Transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) - molecular principles and in vitro models. *Wien Med Wochenschr* 148, 67-73

Kuczius T, Koch R, Keyvani K, Karch H, Grassi J, Groschup MH (2007): Regional and phenotype heterogeneity of cellular prion proteins in the human brain: Glycoprotein typing of PrP in human brains. *Eur J Neurosci* 25, 2649-2655

Ladogana AM, Puopolo M, Croes EA, Budka H, Jarius C, Collins S, Klug GM, Sutcliffe T, Giulivi A, Alperovitch A et al. (2005): Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia and Canada. *Neurology* 64, 1586-1591

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

Lasmézas CI, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin JM, Fournier JG, Hauw JJ, Rossier J, Dormont D (1997): Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* 275, 402-405

Legname G, Baskakov IV, Nguyen HOB, Riesner D, Cohen FE, de Armond SJ, Prusiner SB (2004): Synthetic mammalian prions. *Science* 305, 673-676

Macário ME, Moura-Neto V, Vaisman M, Araujo HM, Buescu A, Cordeiro JG, Chagas C (1992): Abnormal proteins in the cerebrospinal fluid of a patient with Creutzfeldt-Jakob disease following administration of human pituitary growth hormone. *Braz J Med Biol Res* 25, 1127-1130

Maibach-Wulf KM: Über die Interaktionen des zellulären Prion-Proteins (PrP^c) mit relevanten Proteinen der Alzheimer Erkrankung. Med. Diss. Göttingen 2014

Mangé A, Béranger F, Peoc'h K, Onodera T, Frobert Y, Lehmann S (2004): Alpha- and beta-cleavages of the amino-terminus of the cellular prion protein. *Biol Cell* 96, 125-132

Manuelidis L, Yu ZX, Barquero N, Mullins B (2007): Cells infected with scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease agents produce intracellular 25-nm virus-like particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 1965-1970

Meyne F, Gloeckner SF, Ciesielczyk B, Heynemann U, Krasnianski A, Meissner B, Zerr I (2009): Total prion protein levels in the cerebrospinal fluid are reduced in patients with various neurological disorders. *J Alzheimers Dis* 17, 863-873

Moudjou M, Treguer E, Rezaei H, Sabuncu E, Neuendorf E, Groschup MH, Grosclaude J, Laude H (2004): Glycan-controlled epitopes of prion protein include a major determinant of susceptibility to sheep scrapie. *J Virol* 78, 11449

Mouillet-Richard S, Ermonval M, Chebassier C, Laplanche JL, Lehmann S, Launay JM, Kellermann O (2000): Signal transduction through prion protein. *Science* 289, 1925-1928

NRZ (Nationales Referenzzentrum) für TSE: Transmissionselektronenmikroskopie der Prionprotein-Akkumulation. Göttingen 2016.

NRZ (Nationales Referenzzentrum) für TSE: Prionprotein-Typisierung nach Proteinase K-Verdau. Göttingen 2010.

Literaturverzeichnis

NRZ (Nationales Referenzzentrum) für TSE: Elektroenzephalographie eines Patienten mit sCJD. Göttingen 2010.

NRZ (Nationales Referenzzentrum) für TSE: Zerebrale MRT-Serien von zwei Patienten mit CJD. Göttingen 2014.

NRZ (Nationales Referenzzentrum) für TSE: Lokalisation und Verankerung des zellulären Prionproteins. Göttingen 2017.

Notari S, Strammiello R, Capellari S, Giese A, Cescatti M, Grassi J, Ghetti B, Langeveld JPM, Zou WQ, Gambetti P et al. (2008): Characterization of truncated forms of abnormal prion protein in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem* 283, 30557-30565

Owen F, Poulter M, Lofthouse R, Collinge J, Crow TJ, Risby D, Baker HF, Ridley RM, Hsiao K, Prusiner SB (1989): Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 1, 51-52

Palmer MS, Dryden AJ, Hughes JT, Collinge J (1991): Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* 352, 340-342

Pan T, Li R, Wong BS, Liu T, Gambetti P, Sy MS (2002): Heterogeneity of normal prion protein in two-dimensional immunoblot: presence of various glycosylated and truncated forms: 2-D gel electrophoresis analysis of normal human PrP. *Journal of Neurochemistry* 81, 1092-1101

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

Parchi P, Castellani R, Capellari S, Ghetti B, Young K, Chen SG, Farlow M, Dickson DW, Sima AA, Trojanowski JQ et al. (1996): Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 39, 767-778

Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P et al. (1999): Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 46, 224-233

Parchi P, Notari S, Weber P, Schimmel H, Budka H, Ferrer I, Haik S, Hauw JJ, Head MW, Ironside JW et al. (2009): Inter-laboratory assessment of PrP^{Sc} typing in Creutzfeldt-Jakob disease: a western blot study within the NeuroPrion Consortium. *Brain Pathol* 19, 384-391

Parchi P, Zou W, Wang W, Brown P, Capellari S, Ghetti B, Kopp N, Schulz-Schaeffer WJ, Kretzschmar HA, Head MW et al. (2000): Genetic influence on the structural variations of the ab-normal prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 10168-10172

Pham N, Yin S, Yu S, Wong P, Kang SC, Li C, Sy MS (2008): Normal cellular prion protein with a methionine at position 129 has a more exposed helix 1 and is more prone to aggregate. *Biochem Biophys Res Commun* 368, 875-881

Ponto C, Zerr I (2013): Prionerkrankungen – welche Rolle spielen sie heute? *Info Neurologie & Psychiatrie* 15, 42-49

Prusiner SB (1982): Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-144

Prusiner SB (1998): Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13363-13383

Prusiner SB, Korth C, Kaneko K (2000): Expression of unglycosylated mutated prion protein facilitates PrP^{Sc} formation in neuroblastoma cells infected with different prion strains. *J Gen Virol* 81, 2555-2563

Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wüthrich K (1996): NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* 382, 180-182

Riesner D (2003): Biochemistry and structure of PrP^C and PrP^{Sc}. *Br Med Bull* 66, 21-33

Safar J, Cohen FE, Prusiner SB (2000): Quantitative traits of prion strains are enciphered in the con-formation of the prion protein. *Arch Virol Suppl* (16), 227-235

Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ (1993): Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Sci* 2, 2206-2216

Literaturverzeichnis

Satoh K, Muramoto T, Tanaka T, Kitamoto N, Ironside JW, Nagashima K, Yamada M, Sato T, Mohri S, Kitamoto T (2003): Association of an 11-12 kDa protease-resistant prion protein fragment with subtypes of dura graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease and other prion diseases. *J Gen Virol* 84, 2885-2893

Schätzl HM, da Costa M, Taylor L, Cohen FE, Prusiner SB (1995): Prion protein gene variation among primates. *J Mol Biol* 245, 362-374

Schmitz M, Cramm M, Llorens F, Müller-Cramm D, Collins S, Atarashi R, Satoh K, Orru CD, Groveman BR, Zafar S et al. (2016): The real-time quaking-induced conversion assay for detection of human prion disease and study of other protein misfolding diseases. *Nat Protoc* 11, 2233-2242

Schmitz M, Dittmar K, Llorens F, Gelpi E, Ferrer I, Schulz-Schaeffer WJ, Zerr I (2017): Hereditary human prion diseases: an update. *Mol Neurobiol* 54, 4138–4149

Schmitz M, Lüllmann K, Zafar S, Ebert E, Wohlhage M, Oikonomou P, Schlomm M, Mitrova E, Beekes M, Zerr I (2014): Association of prion protein genotype and scrapie prion protein type with cellular prion protein charge isoform profiles in cerebrospinal fluid of humans with sporadic or familial prion diseases. *Neurobiol Aging* 35, 1177-1188

Schulz-Schaeffer WJ, Giese A, Windl O, Kretzschmar HA (1996): Polymorphism at codon 129 of the prion protein gene determines cerebellar pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Neuropathol* 15, 353-357

Segarra C, Lehmann S, Coste J (2009): Prion protein expression and processing in human mononuclear cells: the impact of the codon 129 prion gene polymorphism. *PLoS ONE* 4, e5796

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB (1987): Scrapie prion protein contains a phosphatidyl-inositol glycolipid. *Cell* 51, 229-240

Stöckel J, Safar J, Wallace AC, Cohen FE, Prusiner SB (1998): Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry* 37, 7185-7193

Literaturverzeichnis

Sunyach C, Cisse MA, da Costa CA, Vincent B, Checler F (2007): The C-terminal products of cellular prion protein processing, C1 and C2, exert distinct influence on p53-dependent staurosporine-induced caspase-3 activation. *J Biol Chem* 282, 1956-1963

Tagliavini F, Prelli F, Porro M, Salmona M, Bugiani O, Frangione B (1992): A soluble form of prion protein in human cerebrospinal fluid: implications for prion-related encephalopathies. *Biochem Biophys Res Commun* 184, 1398-1404

Tzaban S, Friedlander G, Schonberger O, Horonchik L, Yedidia Y, Shaked G, Gabizon R, Taraboulos A (2002): Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes. *Biochemistry* 41, 12868-12875

Uro-Coste E, Cassard H, Simon S, Lugan S, Bilheude JM, Perret-Liaudet A, Ironside JW, Haik S, Basset-Leobon C, Lacroux C et al. (2008): Beyond PrP res type 1/type 2 dichotomy in Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS Pathog* 4, e1000029

Watt NT, Hooper NM (2005): Reactive oxygen species (ROS)-mediated beta-cleavage of the prion protein in the mechanism of the cellular response to oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 33, 1123-1125

Watt NT, Taylor DR, Gillott A, Thomas DA, Perera WSS, Hooper NM (2005): Reactive oxygen species-mediated beta-cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *J Biol Chem* 280, 35914-35921

Weissmann C (1994): Molecular biology of prion diseases. *Trends Cell Biol* 4, 10-4

Whittington M, Sidle K, Gowland I, Meads J, Hill AF, Palmer MS, Jefferys JG, Collinge J (1995): Rescue of neurophysiological phenotype seen in PrP null mice by transgene encoding human prion protein. *Nat Genet* 2, 197-201

WHO (1998): Human transmissible spongiform encephalopathies. *Wkly Epidemiol Rec* 73, 361-365

Literaturverzeichnis

Windl O, Giese A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Skworc K, Arendt S, Oberdieck C, Bodemer M, Poser S, Kretzschmar HA (1999): Molecular genetics of human prion diseases in Germany. *Hum Genet* 105, 244-252

Wong BS, Green AJ, Li R, Xie Z, Pan T, Liu T, Chen SG, Gambetti P, Sy MS (2001): Absence of protease-resistant prion protein in the cerebrospinal fluid of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Pathol* 194, 9-14

Wopfner F, Weidenhöfer G, Schneider R, von Brunn A, Gilch S, Schwarz TF, Werner T, Schatzl HM (1999): Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol* 289, 1163-1178

Zanusso G, Farinazzo A, Prelli F, Fiorini M, Gelati M, Ferrari S, Righetti PG, Rizzuto N, Frangione B, Monaco S (2004): Identification of distinct N-terminal truncated forms of prion protein in different Creutzfeldt-Jakob disease subtypes. *J Biol Chem* 279, 38936-38942

Zanusso G, Liu D, Ferrari S, Hegyi I, Yin X, Aguzzi A, Hornemann S, Liemann S, Glockshuber R, Manson JC et al. (1998): Prion protein expression in different species: analysis with a panel of new mAbs. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 8812-8816

Zanusso G, Righetti PG, Ferrari S, Terrin L, Farinazzo A, Cardone F, Pocchiari M, Rizzuto N, Monaco S (2002): Two-dimensional mapping of three phenotype-associated isoforms of the prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Electro-phoresis* 23, 347-355

Zerr I, Kallenberg K, Summers DM, Romero C, Taratuto A, Heinemann U, Breithaupt M, Vargas D, Meissner B, Ladogana A et al. (2009): Updated clinical diagnostic criteria for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain* 132, 2659-2668

Zerr I, Pocchiari M, Collins S, Brandel JP, de Pedro Cuesta J, Knight RSG, Bernheimer H, Cardone F, Delasnerie-Laupretre N, Cuadrado-Corrales N et al. (2000): Analysis of EEG and CSF 14-3-3 proteins as aids to the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 55, 811-815

Zerr I, Poser S (2002): Clinical diagnosis and differential diagnosis of CJD and vCJD. With special emphasis on laboratory tests. *APMIS* 110, 88-98

Literaturverzeichnis

Ziegler J, Sticht H, Marx UC, Müller W, Rösch P, Stephan Schwarzinger S (2003): CD and NMR studies of prion protein (PrP) helix 1. Novel implications for its role in the PrP^c to PrP^{Sc} conversion process. *J Biol Chem* 278, 50175-81

Zou WQ, Capellari S, Parchi P, Sy MS, Gambetti P, Chen SG (2003): Identification of novel proteinase K-resistant C-terminal fragments of PrP in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem* 278, 40429-40436

Lebenslauf

Curriculum vitae

Am 05.11.1975 wurde ich als viertes von fünf Kindern in Werl/Westfalen geboren. Nach Besuch der Walburgis-Grundschule in Werl von 1982 bis 1986 setzte ich auf dem Privaten Ursulinengymnasium Werl meine schulische Laufbahn fort und schloss diese 1995 mit dem Abitur ab.

Nach einem Jahr Wehrdienst verlagerte ich meinen Lebensmittelpunkt nach Göttingen, wo ich von 1996 bis 2001 mein Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen mit dem Abschluss Diplom-Biologe absolvierte. Parallel zu meiner wissenschaftlichen Tätigkeit im III. Zoologischen Institut - Entwicklungsbiologie, Abteilung Wirbeltierembryologie, begann ich an der Georg-August-Universität Göttingen 2002 mein Studium der Humanmedizin. 2006 promovierte ich an der Fakultät für Biologie und Psychologie der Georg-August-Universität Göttingen zum Doktor der Naturwissenschaften. Im Anschluss begann ich eine wissenschaftliche Mitarbeit in der Neurologischen Klinik - Prionenforschungsgruppe des Nationalen Referenzzentrums für TSE Surveillance der Georg-August-Universität Göttingen.

Nach meinem Praktischen Jahr mit Tätigkeiten in der Neurochirurgischen Klinik des Universitätshospitals von Mendoza, Argentinien, in der Neurologischen Klinik des Universitätshospitals von Montevideo, Uruguay, sowie in der Angiologisch-Gefäßchirurgischen Poliklinik des Inselpitals Bern, Schweiz, schloss ich 2008 mein Studium der Humanmedizin mit dem Abschluss Staatsexamen und der Approbation als Arzt ab. In der Folge nahm ich von 2008 bis 2012 eine Assistenzarztstätigkeit zunächst in der Universitätsklinik für Angiologie, anschließend als internistischer Assistenzarzt in der Universitätsklinik für Herz- und Gefäßchirurgie des Inselpitals Bern, Schweiz, und schließlich in der Neurologischen Klinik des Kantonsspitals Aarau, Schweiz, wahr.

Mit dem Ziel der Weiterbildung zum Facharzt für Neurologie kehrte ich 2013 nach Deutschland zurück und absolvierte nach einjähriger Tätigkeit als Assistenzarzt in der Neurologischen Klinik der Elbland Rehabilitationsklinik Großenhain 2014 mein kurrikuläres Psychatriejahr als Assistenzarzt in der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie des Krankenhauses Dresden-Friedrichstadt. Im gleichen Jahr wurde mein erster Sohn geboren, und ein Jahr nach meiner Eheschließung 2015 kam mein zweiter Sohn 2016 zur Welt.

Lebenslauf

Beruflich kehrte ich 2015 als Funktionsoberarzt in die Neurologische Klinik der Elbland Rehabilitationsklinik Großenhain zurück und begann im gleichen Jahr meine Facharzt-Weiterbildung im Bereich Sozialmedizin. Nach meiner Anerkennung zum Facharzt für Neurologie 2016 war ich bis Ende 2018 als Leitender Oberarzt und Stellvertretender Chefarzt der Elbland Rehabilitationsklinik Großenhain tätig. 2017 erfolgte meine Anerkennung zum Führen der Zusatzbezeichnung Sozialmedizin.

Ende 2018 verlagerten wir als Familie unseren Lebensmittelpunkt nach Baden-Württemberg, wo ich seit Oktober 2018 als Chefarzt der Neurologischen Rehabilitationsklinik Bad Wurzach tätig bin. Parallel schloss ich meine wissenschaftliche Tätigkeit in der Neurologischen Klinik - Prionenforschungsgruppe des Nationalen Referenzzentrums für TSE Surveillance der Georg-August-Universität Göttingen mit der Fertigstellung dieser Dissertation ab.