

Aus der Klinik für Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Die Prion-Protein-Isoformen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Katharina Lüllmann

aus Lüneburg

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatterin: Prof. Dr. I. Zerr

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. H. Dihazi

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 27.09.2016

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

M. Schmitz, K. Lullmann, S. Zafar, E. Ebert, M. Wohlhage, P. Oikonomou, M. Schlomm, E. Mitrova, M. Beekes and I. Zerr (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**(5): 1177-1188.

Kongress Triest, Poster Präsentation Mai 2014:

Assoziation of prion protein geno- and PrPSc type with PrPC charge isoform profiles in cerebrospinal fluid of humans with sporadic Creutzfeldt-Jakob diseases

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
CJK	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DWI	<i>diffusion weighted imaging</i>
EEG	Elektroenzephalopathie
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
fCJK	familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
FFI	<i>fatal familial insomnia</i>
FL	<i>full-length</i>
FLAIR	<i>fluid attenuated inversion recovery</i>
GPI-Anker	Glykophosphatidylinositol-Anker
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
iCJK	iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
kDa	Kilodalton
μA	Mikroampere
M/M	Methionin/Methionin
MRT	Magnetresonanztomographie
M/V	Methionin/Valin
N-Terminus	Amino-Terminus
ORF	<i>open reading frame</i>
PNGase F	N-Glykosidase F
PRNP	Prion-Protein-Gen
PrP	Prion-Protein
PrPC	zelluläres Prion-Protein
PrPres	protease-resistant PrP
PrPSc	infektiöses Prion-Protein
PSWC	<i>periodic sharp wave complexes</i>
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid

p-Wert	Signifikanz-Wert
RNS	Ribonukleinsäure
RT-QuIC	<i>real-time quaking induced conversion</i>
sCJK	sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard deviation of the mean</i>
sPrPSc	<i>soluble infectious prion-protein</i>
TSE	<i>transmissible spongiform encephalopathy</i>
V	Volt
vCJK	<i>new variant Creutzfeldt-Jakob-disease</i>
VPSPr	<i>variably protease-sensitive prionopathy</i>
vv	Volumen/ Volumen
V/V	Valin/Valin
2D-Gelelektrophorese	zweidimensionale Gelelektrophorese

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen.....	
1 Einleitung.....	3
1.1 Prionerkrankungen.....	3
1.1.1 Humane spongiforme Enzephalopathien	3
1.1.2 Ätiologie.....	4
1.1.3 Klinik und Pathologie.....	4
1.2 Das Prion-Protein	8
1.2.1 Das Prion-Protein-Gen (PRNP).....	8
1.2.2 Molekulare Grundlagen der klinischen Heterogenität	9
1.2.3 Struktur und Funktion des zellulären Prion-Proteins (PrPC)	11
1.2.4 Das pathogene Prion-Protein Scrapie (PrPSc).....	14
1.2.5 Aufgabenstellung.....	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Material.....	17
2.1.1 Liquorproben.....	17
2.1.2 Chemikalien.....	18
2.1.3 Antikörper.....	19
2.1.4 Isofokussierung.....	19
2.1.5 Gelelektrophorese.....	19
2.1.6 Semi-Dry Blot.....	20
2.1.7 Apparaturen	20
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Bestimmung der PrP-Konzentration	21
2.2.2 2D-Gelelektrophorese	21
2.2.3 Statistische Analyse der Signalintensität.....	24
3 Ergebnisse.....	25
3.1 Proteinase-K-Resistenz von PrPC in Liquorproben von CJK und Kontroll- Patienten	25
3.2 Detektion von verschiedenen PrPC-Ladungs-Isoformen in der 2D-Gelelektrophorese mittels unterschiedlicher PrP-spezifischer Antikörper.....	26
3.2.1 Ladungs-Isoform-Profil von PrP-Antikörpern mit einem Bindungs-Epitop innerhalb der Octarepeat-Region von PrPC	27

3.2.2	Ladungs-Isoform-Profil von PrP-Antikörpern mit einem Bindungs-Epitop innerhalb der Zentral-Region von PrPC.....	27
3.2.3	Ladungs-Isoform-Profil von PrP-Antikörpern mit einem Bindungs-Epitop innerhalb der Kern-Region von PrPC.....	28
3.3	Einfluss des Geschlechts und des Alters von Patienten auf die Expression von PrPC-Isoformen.....	31
3.4	Einfluss des Codon-129-Polymorphismus auf die Expression von PrPC-Ladungs-Isoformen im Liquor von sCJK und Kontroll-Patienten	32
3.5	Einfluss von Prion-Protein Scrapie Typ 1 und 2 auf die PrPC-Isoform-Expression im Liquor von CJK-Patienten.....	42
3.6	Einfluss der Art der Prionerkrankung auf die Expression von PrPC-Ladungs-Isoformen im Liquor.....	44
3.7	Phosphorylierung von PrPC an Serin 43 in Liquorproben von CJK-Patienten.....	48
4	Diskussion.....	50
4.1	Darstellung von PrPC-Isoformen im Liquor von CJK-Patienten mittels 2D-Western Blot.....	51
4.2	Vergleich von PrPC-Isoformen in der 2D-Gelelektrophorese unter Berücksichtigung des Codon-129-Polymorphismus, des Prion-Protein-Typs 1 und 2 sowie der PRNP-Mutationen (E200K, FFI).....	53
4.3	Zunahme von P-PrP Ser43 im Liquor von CJK-Patienten	55
5	Zusammenfassung.....	57
6	Abbildungsverzeichnis.....	58
7	Tabellenverzeichnis.....	60
8	Literaturverzeichnis	61

1 Einleitung

1.1 Prionerkrankungen

Übertragbare spongiforme Enzephalopathien, *transmissible spongiform encephalopathy*, gehören zu den Prionerkrankungen bei Mensch und Tier, welche durch spongiforme Veränderungen im zentralen Nervensystem und einen progredienten Verlauf gekennzeichnet sind. Sie sind bedingt durch die pathogene Form des zellulären Prion-Proteins Pr^{PC}, das durch Fehlfaltung entsteht. Das infektiöse Prion Pr^{PSc} (abgeleitet von „PrP Scrapie“) entsteht dabei durch eine Konformationsänderung der Proteinstruktur, wobei die α -helixreiche zur β -Faltblatt-Struktur umgewandelt wird und die Pathogenität der Prionerkrankungen erzeugt (Pan et al. 1993). Im Jahre 1982 wurde der Begriff „Prion“ *proteinaceous infectious particle*, von Stanley B. Prusiner erstmals als Bezeichnung für den Erreger der Scrapie eingeführt. Er diente der Beschreibung des infektiös proteinartigen Erregers, der sich durch seine spezifischen Eigenschaften wie der Widerstandsfähigkeit gegenüber ionisierender Strahlung oder UV-Licht und dem Fehlen von eigenem genetischen Material von anderen Erregern unterscheidet (Alper et al. 1967; Griffith 1967; Prusiner 1982). Neben den humanen Prionerkrankungen existieren im Tierreich weitere, zu denen unter anderem die „bovine spongiforme Enzephalopathie“ (BSE) bei Rindern, Scrapie bei Schafen und die *chronic wasting disease* bei Hirschen zählen.

1.1.1 Humane spongiforme Enzephalopathien

Anfang der 1920er Jahre wurden erstmals Formen von humanen spongiformen Enzephalopathien durch H. G. Creutzfeldt und A. Jakob beschrieben (Creutzfeldt 1920, Jakob 1921). Zu diesen Erkrankungen gehören die Creutzfeldt-Jakob Krankheit (CJK), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS), die letale familiäre Insomnie, *fatal familial insomnia*, FFI sowie Kuru (Collins et al. 2001; De Michele et al. 2003; Gambetti et al. 2003; Medori et al. 1992). Ihnen ist die Degeneration des zentralen Nervensystems gemeinsam, die chronisch verläuft und stets letal endet.

1.1.2 Ätiologie

Bei der CJK gibt es drei Formen: sporadisch, iatrogen und genetisch. 85% der CJK-Erkrankungen werden als sporadische CJK bezeichnet (Colby & Prusiner 2011), ihre Inzidenz liegt weltweit zwischen ein und zwei Fällen pro eine Million Einwohner (Ladogana et al. 2005). 10 – 15% sind familiären CJK-Erkrankungsformen zuzuschreiben, bedingt durch Genmutationen des Prion-Protein-Gens (PRNP): die familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJK), GSS und FFI. 2010 wurde zudem erstmals die sogenannte Protease-sensitive CJK (VPSPr) (Zou et al. 2010) beschrieben. Zu den erworbenen Formen zählen die iatrogene CJK (iCJK) und die *new variant* CJK (vCJK). Die iCJK wird durch ärztliche Eingriffe wie zum Beispiel Korneatransplantationen oder die Gabe von humanem Wachstumshormon (Koch et al. 1985) übertragen. Kuru ist eine TSE, welche in Verbindung mit rituellem Kannibalismus eines Stammes in Neu-Guinea auftritt (Gajdusek et al. 1977; Glasse 1967). Seit den 1990er Jahren ist zudem die vCJK bekannt, eine Form von Prionerkrankung des Menschen, welche durch den Verzehr von BSE-infiziertem Rindfleisch verursacht wird, was eine Vielzahl epidemiologischer und experimenteller Studien bestätigen (Chazot et al. 1996; Cousens et al. 1997; Will et al. 1996).

Die Inkubationszeit der CJK ist vom Übertragungsmodus und der Eintrittspforte abhängig und kann zwischen einigen Monaten und mehreren Jahren variieren (Anderson et al. 1996; Brown et al. 2012; Collinge et al. 2006).

1.1.3 Klinik und Pathologie

Die klinische Symptomatik aller CJK-Formen wird durch neurologische, vegetative und psychiatrische Funktionsstörungen bestimmt. Die Erkrankung verläuft chronisch progressiv und ist stets letal. Das durchschnittliche Erkrankungsalter für die sCJK liegt im siebten Lebensjahrzehnt (Will et al. 1998). Klinisch führend ist meist eine rasch fortschreitende Demenz. Begleitet wird diese von einer zunehmenden Ataxie mit weiteren extrapyramidalen Störungen oder einem Myoklonus. Im Endstadium tritt typischerweise ein akinetischer Mutismus auf (Poser et al. 1997). Eine Übersicht über Unterschiede im Krankheitsverlauf der einzelnen CJK-Erkrankungen bietet Tabelle 1, diagnostische Kriterien und die Klassifikation der CJK werden in Tabelle 2 zusammengefasst.

Makropathologisch besteht eine Hirnatrophie. Histologisch zeigen sich spongiöse Veränderungen mit Hohlrumbildungen im Neuropil durch Neuronenverlust, eine reaktive astrozytäre Gliose und PrPSc-Ablagerungen bis zu amyloiden Plaques (Colby & Prusiner 2011). Der „Status spongiosus“ beschreibt den histopathologischen Endzustand, der mit fast vollständigem Nervenzellverlust, Spongiosis und massiver astrozytärer Gliose einhergeht. Immunhistochemisch lässt sich PrPSc nach Denaturierung des Gewebes mithilfe von Antikörpern in den oben genannten Ablagerungen nachweisen (Kitamoto et al. 1987). Obwohl allen CJK-Formen die progrediente Demenz und eine neurologische Symptomatik gemein sind, weisen der klinische Verlauf und die pathologischen Korrelate aufgrund molekularbiologischer Unterschiede einige Variabilitäten auf (Parchi et al. 1999).

Erkrankung	Erkrankungsalter	Symptomatik		Mediane Überlebenszeit
		früh	spät	
sCJK	7. Lebensjahrzehnt	Abgeschlagenheit, Schwindel, Gewichtsverlust, Schwitzen	progrediente Demenz, Myoklonien, akinetischer Mutismus	wenige Monate
fCJK	3. – 5. Lebensjahrzehnt	psychiatrische Symptome, Demenz	Ataxie, Dysarthrie, Myoklonus	3-7 Jahre
GSS	4. – 6. Lebensjahrzehnt	zerebelläre Symptomatik	Bradyphrenie, Extrapyramidal- symptomatik	3-7 Jahre
FFI	4. Lebensjahrzehnt	progrediente Insomnie, vegetative Dysfunktionen	kognitive Dysfunktion, neurologische Symptomatik	3-7 Jahre
vCJK	30 Jahre	psychiatrische Symptomatik, Dysästhesien	Demenz, neurologische Symptomatik	14 Monate

Tabelle 1: Übersicht über Erkrankungsalter, einzelne neurologische Symptome und mediane Überlebenszeit bei sporadischer, familiärer und new variant CJK

Diagnosekriterien der sCJK	
rapide progressive Demenz und:	
klinische Zeichen	Myoklonien visuelle oder zerebelläre Symptome pyramidale und/ oder extrapyramidale Symptomatik akinetischer Mutismus
Untersuchungen	EEG: PSWC (periodic sharp and slow wave complexes) Liquor: Nachweis von 14-3-3 (Krankheitsdauer < 2 Jahren) MRT (DWI/ FLAIR): Signalsteigerung im Nucleus caudatus und Putamen oder in 2 kortikalen Regionen

Klassifikation	Klinik	Diagnostik	Neuropathologie
mögliche CJK	Demenz + zwei der vier Symptome mit < 2 Jahren Dauer	-	-
wahrscheinliche CJK	Demenz + zwei der vier Symptome	mindestens eine Untersuchung positiv	-
gesicherte CJK	-	-	neuropathologisch und/ oder immunhistochemisch bestätigt und/ oder PrPSc im Western Blot nachweisbar

Tabelle 2: Klinische und apparative Diagnosekriterien und Leitfaden zur Klassifizierung einer sCJK (verändert nach (Zerr et al. 2009))

1.2 Das Prion-Protein

1.2.1 Das Prion-Protein-Gen (PRNP)

Die Sequenzierung des humanen PRNP gelang erstmals im Jahre 1986 (Kretzschmar et al. 1986b; Liao et al. 1986). Das PRNP ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 20 lokalisiert und besteht aus zwei Exons, welche durch ein Intron getrennt sind, wobei sich der Protein-kodierende Anteil, *open reading frame*, komplett auf dem zweiten Exon befindet (Gabriel et al. 1992; Puckett et al. 1991).

Die Gensequenz des Prion-Proteins ist ubiquitär in der Tierwelt hoch konserviert, so dass man davon ausgeht, dass PrPC eine relevante physiologische Funktion im einzelnen Organismus besitzt. Bei der Übertragbarkeit von Prionerkrankungen zwischen einzelnen Tierarten besteht allerdings die sogenannte Speziesbarriere, welche sich experimentell in Unterschieden in der Übertragbarkeit und der Inkubationszeit von TSE zwischen tierischen Rassen zeigte (Tateishi et al. 1996; Telling et al. 1995).

Mutationen innerhalb des ORF führen zu verschiedenen familiären Prionerkrankungen (Goldgaber et al. 1989; Kretzschmar et al. 1991; Mastrianni 2010). Insgesamt wurden bisher über dreißig Mutationen entdeckt (Zerr 2012). Einige treten regional gehäuft auf. Beispielsweise wird die Substitution von Glutamin zu Lysin am Codon 200 mit E200K bezeichnet und ist eine häufige Mutation bei libyschen Juden (Hsiao et al. 1991). Punktmutationen kommen gehäuft im Carboxy-Terminus (C-Terminus) des PRNP vor, in der Oktarepeat-Region des Amino-Terminus (N-Terminus) lassen sich hingegen öfter Insertionen finden (Poser & Zerr 2002). FFI ist durch die Mutation D178N auf Chromosom 20 bei gleichzeitiger Homozygotie für Methionin am Codon-129-Polymorphismus definiert (Lugaresi et al. 1986; Medori et al. 1992). Der Genotyp des Polymorphismus beeinflusst offenbar die phänotypischen Ausprägungen der Erkrankung (Montagna et al. 1998). Bei gleicher PRNP-Mutation und Valin an Codon-129 des mutierten Allels entsteht das Krankheitsbild der fCJK (Goldfarb et al. 1992). Bei GSS findet eine Punktmutation an Codon-102 mit Substitution von Prolin für Leucin statt (Hsiao et al. 1989). Familiäre Prionerkrankungen werden autosomal-dominant vererbt und besitzen eine sehr hohe Penetranz von fast 100% (Zerr 2012).

1.2.2 Molekulare Grundlagen der klinischen Heterogenität

PrPSc-Typ

Es existieren verschiedene PrPC-Isoformen, die bei gleicher Primärstruktur verschiedene posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierungen, Glykosylierungen etc.) aufweisen. Unterscheiden lassen sie sich aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte, anhand ihres Glykosylierungsmusters im Western Blot oder anhand ihrer Ladung, aus der verschiedene isoelektrische Punkte resultieren. Neben den PrPC-Isoformen existieren unterschiedliche pathologische PrPSc-Typen (Basler et al. 1986; Bessen & Marsh 1994; Colby et al. 2009; Collinge et al. 1996; Safar et al. 1998; Somerville et al. 1997; Telling et al. 1996). 1996 konnten Parchi et al. zwei distinkte unglykosylierte PrP-Formen nach Proteinase-K-Verdau im Western Blot identifizieren: PrPSc-Typ 1 nach Spaltung an Stelle 82 mit einer relativen Molekulargröße von etwa 21 kDa und PrPSc-Typ 2 nach Spaltung an Stelle 97 mit einer relativen Molekulargröße von etwa 19 kDa (Parchi et al. 1996; Parchi et al. 1997) (siehe auch Abbildung 1).

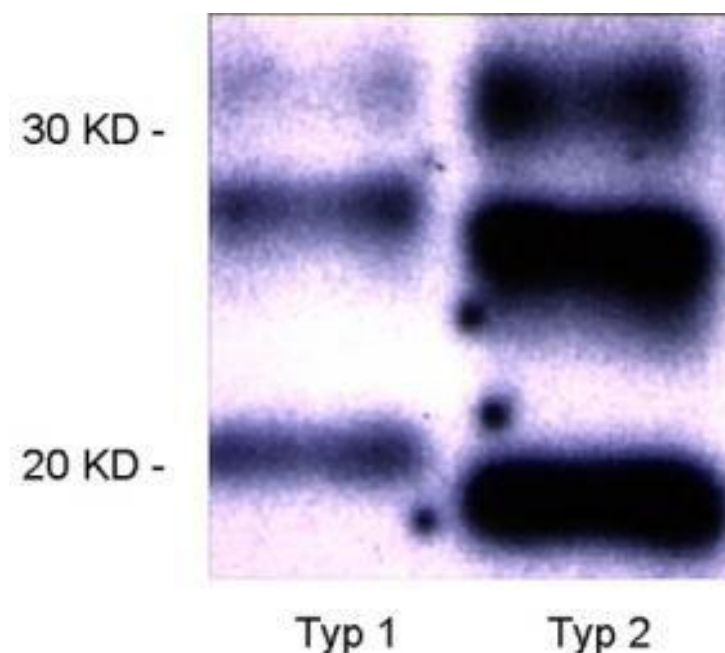


Abbildung 1: PrP-Typisierung nach Proteinase-K-Verdau im Western

Blot. Banden des Proteinase-K-resistenten PrPres. Typ 1 mit 20,5 kDa; Typ 2 mit 18,7 kDa.

Aus:

<http://www.prionforschung.de/html/archiv.php?eof=0&aob=1&id=ii195&hidden=0&refid=61&refsub=1&refsel=2>
(24.08.2015)

Man nimmt an, dass die Spaltungsstelle durch die Konformation des fehlgefalteten PrPSc beeinflusst wird (Parchi et al. 2000). Daneben spielt der Codon-129-Polymorphismus auf dem PRNP eine entscheidende Rolle, da er Einfluss auf den klinischen Krankheitsverlauf der CJK und pathologische Korrelate (Parchi et al. 1999; Parchi et al. 2011) besitzt. Allerdings zeigen Studien, dass in bis zu 35% beide PrPSc-Typen gleichzeitig vorkommen (Parchi et al. 2009b), oder dass einige Prionenstämme unter den gleichen Umständen vollständig proteolysiert werden (Colby et al. 2010; Gambetti et al. 2008), wobei das entstandene lösliche PrPCs, *soluble infectious PrPSc* (sPrPSc), ebenfalls Pathogenitätsfaktor besitzt.

Codon-129-Polymorphismus

Der Codon-129-Polymorphismus beschreibt die Variabilität der Aminosäuren Methionin und Valin an Codon 129 des Prion-Protein-Gens PRNP. Es können insgesamt drei verschiedene sCJK-Genotypen unterschieden werden: Methionin/Methionin (MM), Valin/Valin (VV) oder Methionin/Valin (MV). Zusammen mit den oben beschriebenen Prion-Typ 1 und Prion-Typ 2 ergeben sich so insgesamt sechs verschiedene sCJK-Subtypen: MM1, MM2, MV1, MV2, VV1 und VV2. Der Codon-129-Polymorphismus beeinflusst entscheidend die Erkrankungswahrscheinlichkeit, den Krankheitsverlauf und die Überlebenszeit bei CJK-Erkrankten (Cali et al. 2006; Collins et al. 2006; Krasnianski et al. 2006; Parchi et al. 1996; Schulz-Schaeffer et al. 1996). Eine Homozygotie an Codon-129 mit entweder MM oder VV führt zur erhöhten Krankheitshäufigkeit für eine sCJK (Heinemann et al. 2007). Eine Übersicht über die Verteilung der Genotypen bei sCJK und der Normalbevölkerung zeigen Tabellen 3 und 4. Im Vergleich findet sich eine Überrepräsentierung der MM-Homozygotie bei sCJK-Erkrankten.

Codon-129-Polymorphismus bei sCJK-Erkrankungen	
MM	67%
MV	16%
VV	17%

Tabelle 3: Verteilung des Genotyps an Codon 129 bei sCJK (Ladogana et al. 2005)

Codon-129-Polymorphismus bei der Normalbevölkerung	
MM	39%
MV	50%
VV	11%

Tabelle 4: Verteilung des Genotyps an Codon-129 in der Normalbevölkerung (Alperovitch et al. 1999)

Bei der sCJK findet sich besonders häufig der Typ MM1 mit klinisch klassischem Verlauf mit progredienter Demenz, pyramidaler und extrapyramidaler Symptomatik und intermittierenden Myoklonien (Parchi et al. 1999), ähnlich beim MV1 Typ. Der Erkrankungsgipfel liegt hier in der siebten Lebensdekade, die Betroffenen versterben im Mittel bereits nach fünf Monaten. Im Gegensatz dazu kommt es bei sCJK-Typ VV2 zu einem früheren Krankheitsausbruch häufig mit einer Ataxie als erstes Symptom, die erst im Verlauf von einer progressiven Demenz begleitet wird (Parchi et al. 1996; Zerr & Poser 2002).

Einen Einfluss auf die Inkubationszeit durch den Codon-129-Polymorphismus konnte bei der iatrogenen CJK gezeigt werden. Diese ist bei Homozygotie kürzer als bei Heterozygotie (Deslys et al. 1998; Jaegly et al. 1995). Bei der vCJK sind fast alle Erkrankungen homozygot für Methionin an Codon-129 (Collinge & Rossor 1996), 2009 wurde erstmals über einen heterozygoten Polymorphismus bei vCJK berichtet (Kaski et al. 2009). Molekularbiologisch zeigt der Codon-129-Polymorphismus Auswirkung auf die Konformation von PrPC und die Proteinase-K-Resistenz der pathogenen Form des PrPSc (Pham et al. 2008; Uro-Coste et al. 2008).

1.2.3 Struktur und Funktion des zellulären Prion-Proteins (PrPC)

Das zelluläre Prion-Protein PrPC ist ein membranständiges Glykoprotein, welches vorwiegend im neuronalen, aber auch im lymphatischen Gewebe, im Herz, in der Skelettmuskulatur (Bosque et al. 2002), im Darmgewebe (Morel et al. 2004)), im Uterus und den Testes exprimiert wird (Herms et al. 1999; Kretzschmar et al. 1986a; Moser et al. 1995; Tanji et al. 1995). Die Homologie des PrPC ist unter verschiedenen Spezies relativ hoch. Vergleicht man beispielsweise das humane PrPC mit dem Rinder- oder Maus-PrPC, stimmt die DNA-Sequenz in großen Teilen überein (Parchi et al. 2011).

PrPC besteht aus 253 Aminosäuren (Kretzschmar et al. 1986b). Es besitzt eine flexible N-terminale Domäne, eine zentrale globuläre Domäne und eine kurze C-terminale Domäne. Untersuchungen mittels Kernspinresonanzspektroskopie ergaben, dass sich in der globulären Region drei α -Helices und zwei antiparallele β -Faltblatt-Strukturen befinden. Am C-Terminus befindet sich ein Glykophosphatidylinositol-(GPI)-Anker zur Zellverankerung. Einen schematischen Aufbau des Prions zeigt Abbildung 2.

Der N-Terminus besitzt eine funktionelle Oktarepeat-Region, welche als Bindungsglied für Kupfer(III)-Ionen dienen soll (Brown et al. 1997; Hornshaw et al. 1995; Viles et al. 1999) und möglicherweise neuroprotektiv wirkt (Mitteregger et al. 2007). Zudem besitzt sie einen flexiblen Anteil, welcher Einfluss auf den Konversionsprozess von PrPC zu PrPSc haben könnte (Donne et al. 1997; Riek et al. 1996; Sonati et al. 2013; Zahn et al. 2000).

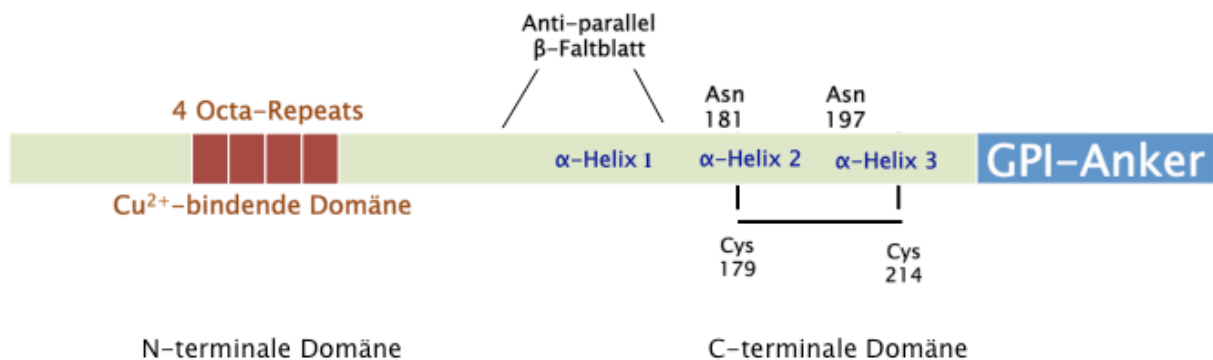


Abbildung 2: Schematische Struktur des Prion-Proteins. Aufbau der einzelnen Regionen mit den wichtigsten Strukturen.

Die posttranslationale Modifizierung ist beim Prion von besonderer Bedeutung. Primär erfolgt der Transport in das endoplasmatische Retikulum. Dort erfolgt die Abspaltung einer Aminosäuresequenz von 22 Aminosäuren am N-Terminus, die Bildung einer Disulfid-Brücke und eine weitere Spaltung von 23 Aminosäuren am Carboxy-Terminus. Zudem erfolgt die Verankerung mit der Plasmamembran über den GPI-Anker an Serin 231 (Stahl et al. 1987).

PrPC besitzt zwei N-Glykosylierungsstellen an den Aminosäureresten 181 und 197 in seiner Proteinstruktur, wo verschiedene Oligosaccharide angehängt werden können (Haraguchi et al. 1989; Lawson et al. 2005). Im Golgi-Apparat werden diese

N-Oligosaccharide weiter zu komplexen Zuckerstrukturen umgewandelt. Durch die angehängten Zuckerketten an Stelle 181 und 197 ergeben sich folgende drei Möglichkeiten der PrPC-Isoformen: diglykosyliertes PrPC (36kDa), monoglykosyliertes PrPC (33kDa) und unglykosyliertes PrPC (27kDa) (Beringue et al. 2003; Zou et al. 2003). Die einzelnen Isoformen können mittels Western Blot differenziert werden. Durch die Behandlung mit N-Glykosidase F (PNGase F) können Asparaginase-assoziierte Zuckermoleküle abgespalten werden, wodurch sich die relative molekulare Masse des Prions vermindert (Haraguchi et al. 1989). Der Vergleich von N-Glykosylierungen bei PrPC und PrPSc zeigte eine unterschiedliche Zusammensetzung der Zuckerketten (Rudd et al. 1999). PrPC wird hauptsächlich an der Zelloberfläche exprimiert (Harris 2003). Es steht dort in Verbindung mit cholesterinreichen Mikrodomänen, den sogenannten *Lipid Rafts*. Ein Teil des PrPC wird allerdings durch Endozytose erneut internalisiert (Shyng et al. 1993; Walmsley et al. 2009). Es kommt zur Spaltung an den Aminosäuren 110/111 und 90/91 mit den daraus resultierenden Fragmenten: das 18 kDa große carboxyl-terminale C-Fragment C1, C2 mit 21 kDa, ein N-terminales N1-Fragment mit 9 kDa und ein 7 kDa großes N2-Fragment (Harris et al. 1993; Sunyach et al. 2007). Die Frage nach einer möglichen Bedeutung der PrPC-Spaltfragmente in der Pathogenese der TSE ist noch offen.

Die verschiedenen physiologischen Funktionen des PrPC sind bis heute noch nicht komplett geklärt. Experimente mit PRNP-knock-out-Mäusen zeigten initial keine Änderung der Gehirnfunktion oder deren Entwicklung (Bueler et al. 1992). Spätere Studien ergaben aber doch Hinweise auf eine erhöhte Anfälligkeit für neuronale Schädigungen (Kuwahara et al. 1999; McLennan et al. 2004; Sakaguchi et al. 1996). Verschiedene Forschungsarbeiten deuten vor allem auf regulatorische Funktionen von PrPC hin sowie auf die Möglichkeit der Kupferbindung und damit auf die Einhaltung der Kupfer-Homöostase (Brown et al. 1997; Kramer et al. 2001; Sakaguchi et al. 1996). Des Weiteren ist PrPC an Signaltransduktionsprozessen (Peters et al. 2003) und Zell-Zell-Adhäsion (Schmitt-Ulms et al. 2001) beteiligt und besitzt neuroprotektive Eigenschaften bei oxidativem oder ischämisch induziertem Stress (Brown et al. 1997; Martins & Brentani 2002; Vassallo & Herms 2003; Weise et al. 2006) durch anti-apoptotische Aktivität (Bounhar et al. 2001). Zudem wird dem Prion eine Bedeutung in der Langzeit-Gedächtnis Bildung zugeschrieben (Shorter & Lindquist 2005).

1.2.4 Das pathogene Prion-Protein Scrapie (PrPSc)

Prionerkrankungen entstehen, wie oben bereits beschrieben, durch die Umwandlung des zellulären PrPC zur pathogenen Form PrPSc mit deren Replikation und Ablagerung. Dies geschieht laut der „Prion-Hypothese“ von S. Prusiner im Gegensatz zu anderen Erregern wie Bakterien oder Viren alleine durch eine Konformationsänderung der Proteine (Bueler et al. 1993; Prusiner 1982). Die genauen Mechanismen hierfür sind noch nicht komplett geklärt. Polyanionen könnten dafür bedeutend sein (Deleault et al. 2007; Wang et al. 2011). Der Codon-129-Polymorphismus scheint eine Rolle in der molekularen Konformation und Neigung zur Aggregation des PrPC zu spielen (Pham et al. 2008), ebenso wie posttranslationale Prozesse wie Phosphorylierungen. So zeigte die Phosphorylierung an Serin 43 *in vitro* eine Änderung der Proteinkonformation, welche zur Pathogenität des Proteins beitragen könnte (Giannopoulos et al. 2009). Infektiöses PrPSc unterscheidet sich vom physiologischen PrPC in der Sekundär- und Tertiärstruktur; die Primärstruktur ist bei beiden identisch (Borchelt et al. 1990; Stahl et al. 1993). PrPC besitzt vor allem α -helikale Strukturen, wogegen PrPSc überwiegend eine β -Faltblattstruktur aufweist (Wille et al. 2002) (siehe auch Abbildung 3). Bedingt durch diese Konformationsänderung bestehen Unterschiede zwischen PrPC und PrPSc hinsichtlich biochemischer und physikalischer Eigenschaften. So ist PrPSc gegenüber Radiation und Nukleasen weitestgehend resistent (Alper et al. 1967) und besitzt die Fähigkeit Amyloidablagerungen zu bilden (Colby et al. 2007). Zuletzt wurden allerdings auch Protease-sensible pathogene Formen des Prions beschrieben (Gambetti et al. 2008; Polymenidou et al. 2011).

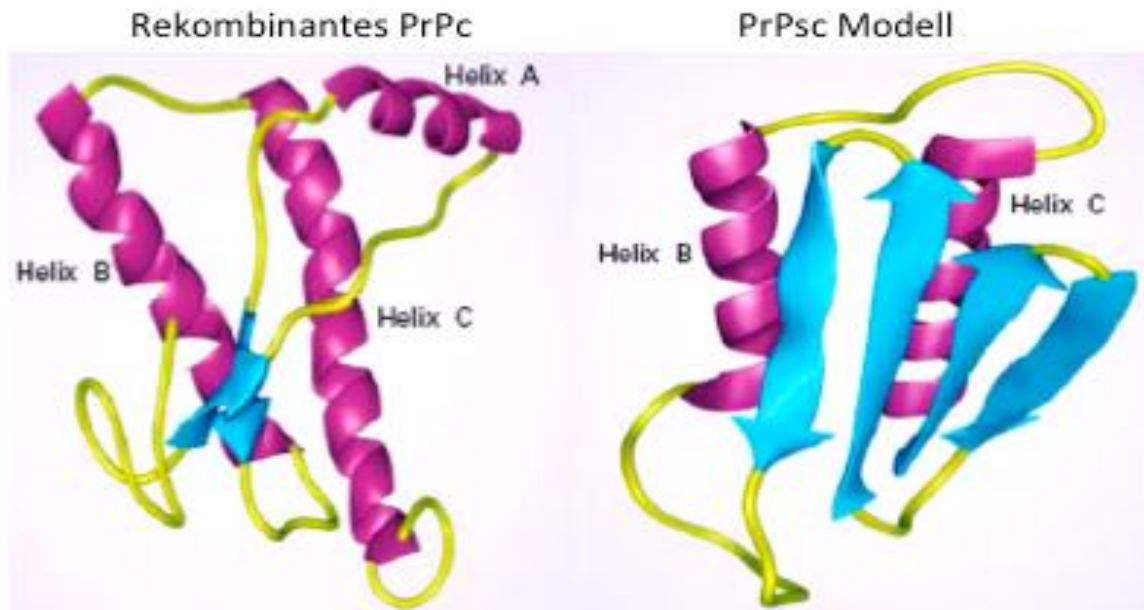


Abbildung 3: Umwandlung des Prions von einer α -Helix-Konformation beim PrPC zur β -Faltblattstruktur beim PrPSc. Abbildung modifiziert nach <http://wikis.lib.ncsu.edu/images/a/ac/PrionProtein.jpg>

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal findet sich im Abbau durch Proteasen. PrPSc bildet dabei das Protease-resistente 27-30 kDa Kernfragment, *protease-resistant PrP* (PrPres), welches aggregiert und amyloide Ablagerungen bildet (McKinley et al. 1983; Prusiner et al. 1983), im Gegensatz zur vollständigen Proteolyse bei PrPC.

Es existieren mehrere Modelle zur Erklärung der Replikation von PrPSc: Prusiner beschrieb die sogenannte Heterodimer-Hypothese, nach der ein PrPC Molekül mithilfe einer hohen Aktivierungsenergie in PrPSc umgewandelt wird und anschließend mit einem anderen PrPC Molekül einen Komplex bildet, so dass sich weitere PrPC Moleküle ebenfalls in PrPSc umwandeln (Prusiner 1991; 1994). Weiter beschreibt Lansbury das sogenannte „*nucleation*“ Modell, wonach PrPC und PrPSc sich in einem Gleichgewichtszustand befinden, wobei die Mehrheit als PrPC vorliegt. Bei Vorhandensein eines PrPSc-Aggregats kommt es zur Anlagerung von PrPC an das Aggregat mit Umwandlung im Sinne einer Polymerisation in PrPSc, so dass sich das anfangs vorliegende Gleichgewicht von PrPC immer mehr zu PrPSc verschiebt und es zu Ablagerungen von fehlgefaltetem PrPSc im Gehirn kommt (Lansbury & Caughey 1995).

1.2.5 Aufgabenstellung

Eine Studie aus dem Jahre 2010 untersuchte bereits unterschiedliche Glykoformen und Fragmente im Liquor von CJK-Patienten mit definiertem Codon-129-Polymorphismus und E200K Mutation mittels 1D-Western Blot (Schmitz et al. 2010). Allerdings ließen sich hierbei keine signifikanten Unterschiede bei der Zusammensetzung der einzelnen PrP-Isoformen bei den untersuchten Gruppen darstellen, was auf die methodische Limitierung des 1D-Western Blots zurückgeführt werden kann.

Da sich Proteine neben ihrem Molekulargewicht auch anhand ihres isoelektrischen Punktes auftrennen lassen, was zu einer genaueren Charakterisierung der Isoformen führt und bereits in zurückliegenden Studien anhand von CJK-Gehirn- und Liquorproben praktiziert worden ist (Castagna et al. 2002; Zanusso et al. 2002), hatte die vorliegende Arbeit die Abbildung von PrPC-Isoformen im Liquor von CJK-Patienten mittels 2D-Western Blot zum Ziel. Die PrPC-Ladungsisoform Zusammensetzung der jeweiligen Gruppen wurde zudem mithilfe einer 2D-Graphiksoftware quantifiziert. Dabei sollten folgende Fragen genauer untersucht werden:

1. Wie lassen sich die PrPC-Isoformen mit den zur Verfügung stehenden Antikörpern darstellen?
2. Wie ist das Bindungsverhalten einzelner Antikörpergruppen zueinander (Epitop gegen die Octarepeat-Region, Zentral-Region und N-terminale-Region) zu charakterisieren?
3. Hat der PRNP-Codon-129-Polymorphismus, der CJK-Subtyp oder die Art der Prionerkrankung (sCJK vs. gCJK, FFI) einen signifikanten Einfluss auf die PrPC-Ladungsisoform Zusammensetzung?
4. Gibt es eine spezifische PrPC-Isoform oder ein spezifisches PrPC-Fragment welches mit der Art der Prionerkrankung oder den CJK-Subtypen korreliert?
5. Spielt die Phosphorylierung von PrP eine Rolle bei CJK-Patienten? Hierfür sollte die Phosphorylierung an Ser43 mithilfe eines Western Blots semiquantitativ bei sCJK-Patienten und Kontrollen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Liquorproben

Die untersuchten Liquorproben stammten aus einem Kollektiv von insgesamt 46 sCJK, 16 fCJK- (E200K Mutation) und 12 FFI-Patienten. Von den 46 sCJK-Patienten waren 26 weiblich, 20 männlich, im Alter zwischen 23 und 85 Jahre bei Diagnosestellung (mittleres Alter $65 \pm 1,5$ Jahre), jeweils mit bekanntem Codon-129-Polymorphismus (16 MM, 15 MV, 15 VV). Von den 16 fCJK-Erkrankten mit E200K-Mutation waren 10 weiblich, 6 männlich, im Alter zwischen 52 und 73 Jahren bei Diagnosestellung (mittleres Alter $57 \pm 1,4$ Jahre) mit bekanntem Codon-129-Polymorphismus (9 MM, 7 MV). Von den 12 FFI-Patienten waren 3 weiblich und 9 männlich, im Alter zwischen 55 und 85 Jahren bei Diagnosestellung mit bekanntem Codon-129-Polymorphismus (9 MM, 3 MV).

Alle CJK-Patienten wurden anhand der Diagnosekriterien als wahrscheinlich oder morphologisch gesichert klassifiziert (Zerr et al. 2009).

Die Liquorproben der Kontrollgruppe stammten von Patienten mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen, welche ebenfalls anhand von klinischen oder pathologischen Kriterien diagnostiziert wurden.

Alle Proben, wenn nicht anders genannt, entstammen aus dem Bestand des Nationalen Referenzzentrums für Prionerkrankungen der neurologischen Abteilung der Georg-August-Universität Göttingen. Die Proben mit E200K-Mutation wurden uns freundlicherweise vom Department für Prionerkrankungen der Slowakischen Medizinischen Universität, Bratislava, Slowakei, zur Verfügung gestellt.

Die zu untersuchenden Liquorproben wurden nach Eingang zentrifugiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Wiederholtes Auftauen und Einfrieren wurde soweit möglich vermieden. Der Codon-129-Polymorphismus wurde aus isolierter DNS von Blutproben der dazugehörigen CJK-Patienten nach der standardisierten Methodik analysiert (Windl et al. 1999).

Die Studie wurde nach den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen laut der Deklaration von Helsinki mit der Zustimmung aller Probanden durchgeführt. Das Votum der Ethikkommission lag vor (Nr. 30/01/05).

2.1.2 Chemikalien

Puffer und Lösungen für die 2D-Gelelektrophorese

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Äquilibrierungspuffer I:	6 M Urea, 2% SDS, 30% Glycerin, 150 mM Tris pH 8,8, Aqua bidest., 2% DTT
Äquilibrierungspuffer II:	6 M Urea, 2% SDS, 30% Glycerin, 150 mM Tris pH 8,8, Aqua bidest., 2,5% Iodacetamid, Bromphenolblau
Rehydrationspuffer:	7 M Urea, 2,5 M Thiourea, 0,4% CHAPS, 65 mM Dithiothreitol (DTT), 35 mM Tris, 0,2% Bio-Lyte
Polyacrylamidgel (12%ig):	Aqua bidest. 4,4 ml, 1,5 M Tris pH 8,8 2,6 ml, 10% SDS 105 µl, Acrylamid (38 + 2%) 3,3 ml, 10% APS 52,5 µl, TEMED 7,5 µl
Laufpuffer:	Glycin, Tris, 10% SDS, Aqua bidest.
Transferpuffer:	48 mM Tris, 39 mM Glycin, 10% SDS
PBS-T:	PBS, 0,2% Tween, Aqua bidest.
BLOTTO:	5% Trockenmilch, PBS-T
OKANO + BSA:	3 mM Tris pH 8, 2 mM NaCl, 0,05% Triton X 100, Aqua bidest., 0,1 mM EDTA, 0,002% SDS, 0,1% BSA, 20% Methanol
Entwicklungslösung I:	250 mM Luminol, 90 mM p-Coumarsäure, 1 M Tris HCl pH 8,5, Aqua bidest.
Entwicklungslösung II:	30% H ₂ O ₂ , 1 M Tris HCl pH 8,5, Aqua bidest.

2.1.3 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper sind alle PrP- spezifisch und gegen unterschiedliche Regionen des Prion-Proteins gerichtet.

1. Antikörper:

Beschreibung	Epitop	Region	Verdünnung	Hersteller
3B5	51 – 89	Octarepeat	1: 1000	Walter Bodemer, Göttingen, Deutschland
SAF32	59 – 89	Octarepeat	1: 1000	SPI-Bio, Paris, Frankreich
3F4	109 – 112	Zentral	1: 1000	RKI, Berlin, Deutschland
12F10	142 – 160	Kern	1: 1000	SPI-Bio, Paris, Frankreich
SAF70	142 – 160	Kern	1: 200	SPI-Bio, Paris, Frankreich
pPrPS43	Phosphoryliertes Serin 43	unbekannt	1:500	SPI-Bio, Paris, Frankreich

Tabelle 5: Übersicht über die benutzten PrP-spezifischen Antikörper

2. Antikörper:

Beschreibung	Hersteller
Anti-mouse, Peroxidase-konjugiert	Jackson Immunosearch

2.1.4 Isofokussierung

IPG-Strips	ReadyStrip IPG-Strip; pH 3 – 10 non-linear (NL) bzw. linear, BIO-Rad
Einsatz	PROTEAN IEF Fokussierungseinsatz, BIO-Rad
Filterpapier	PROTEAN IEF Elektrodenpapier, BIO-Rad
Mineralöl	Mineralöl, BIO-Rad
Isofokussierung	Protean IEF Cell, BIO-Rad

2.1.5 Gelelektrophorese

Gestelle	BIO-Rad
Gelkammern	Mini Protean, BIO-Rad

Glasplatten	BIO-Rad
Marker	Precision Plus Protein Standarts; Dual Color, BIO-Rad
Filterpapier	PROTEAIN IEF Elektrodenpapier, BIO-Rad

2.1.6 Semi-Dry Blot

Membranen	Polyvinyliden Difluorid (PVDF) Hydrobond-P Membran, Amersham
-----------	--

2.1.7 Apparaturen

Gebrauch	Modell	Hersteller
Vortexer	Vortex Mixer SAB	Stuart
Gel-Kammern	Mini Protean 3 System	BIO-Rad
Glasplatten	Mini Protean 3 System	BIO-Rad
Spacer Plates 1,5 cm	Mini Protean 3 System	BIO-Rad
Short Plates	Mini Protean 3 System	BIO-Rad
Zentrifuge	F45-30-11	Eppendorf
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge	Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Isofokussierung	PROTEAN IEF Cell	BIO-Rad
Gelelektrophorese	Power-Pac 3000	BIO-Rad
Semi-Dry Western-Blot	Power-Pac 200	BIO-Rad
Transfer-Blot	Semi-dry Transfer Cell	BIO-Rad
Western-Blot	Biolane TM HTM Machine	Biolane
Schüttler	IKA-Laborschüttler MTS2	IKA Labortechnik
	IKA KS 501 digital	IKA Labortechnik
Rotator	Test-Tube Rotator 34528	Snijders
Entwicklung	Molecular Imager, ChemiDoc XRS+	BIO-Rad

2.2 Methoden

2.2.1 Bestimmung der PrP-Konzentration

Die Bestimmung der PrP-Konzentration in den einzelnen Proben wurde mithilfe eines BSE-ELISA-Tests (AJ Roboscreen, Leipzig, Deutschland) durchgeführt, um die Gesamtmenge an PrP zu messen. Normalerweise wird der Test zur Bestimmung von PrPres bei BSE an Hirnproben von Rindern und Schafen durchgeführt. Auf den Proteinase-K-Verdau wurde bei unseren Messungen verzichtet. In Liquorproben findet sich nur ein äußerst kleiner Anteil an fehlgefaltetem Prion-Protein (Meyne et al. 2009), so dass die bei uns gemessene PrP-Gesamtmenge der PrPC-Konzentration im Liquor entspricht.

2.2.2 2D-Gelelektrophorese

Probenvorbereitung

Zur Vorbereitung der Liquorproben für die 2D-Gelelektrophorese wurden die entnommenen Liquormengen im Verhältnis 1:3 mit Aceton:Methanol (1:9 vv) gemischt und anschließend bei -20° C über Nacht gelagert. Nachfolgend erfolgte eine Zentrifugierung über 30 Minuten bei 14000 rpm. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet bei Raumtemperatur für etwa fünf Minuten getrocknet, anschließend in 150 µl Rehydrationspuffer gelöst und nochmals für zweieinhalb Minuten bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Drähte der Isokussierungseinsätze wurden mit Filterpapier abgedeckt, um einen Kontakt zu den *immobilized pH gradient*-Strips (IPG-Strips) zu vermeiden. 150 µl des Probenmaterials wurden in den Isokussierungseinsatz pipettiert (40-50 µg Gesamtprotein/ < 15 ng PrPC/ Strip) und die IPS-Strips (pH 3- 10 non-linear, für SAF70 teils linear) mit der Gelseite nach unten abgesetzt. Die IPG-Strips wurden mit Paraffin abgedeckt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit etwa 2 ml Mineralöl zum Schutz vor Austrocknung beschichtet.

Isokussierung

Die Isokussierung wurde konstant bei 20° C durchgeführt. Zuerst erfolgte eine Rehydration bei 50 µA über zehn Stunden. Die Isokussierung wurde anschließend eine

Stunde mit 200 V initiiert und nachfolgend stufenweise auf höhere Volt gestellt, bis insgesamt 50.000 Voltstunden erreicht wurden, wie in Tabelle 6 dargestellt.

50 μ A	Rehydratation über 10 h bei 20° C
200 V	für 60 Minuten
500 V	für 60 Minuten
1000 V	für 90 Minuten
5000 V	bis zum Erreichen von 50.000 Vh

Tabelle 6: Zeitlicher Ablauf der Isoklassifizierung

Äquibrierung

Nach der Isoklassifizierung wurden die IPG-Strips zur Reduktion der Proteine für zwanzig Minuten im Äquibrierungspuffer I mit 2%igem DTT bei Raumtemperatur inkubiert. Um folgend eine Reoxidation zu verhindern, erfolgte im zweiten Schritt eine Inkubation mit dem Äquibrierungspuffer II mit 2,5%igem Iodacetamid. So kommt es zu einer Alkylierung der vorher entstandenen SH-Gruppen.

Im gleichen Schritt wurden die Proteine mit Sodiumdodecylsulfat (SDS) beladen. SDS bindet proportional zum Molekulargewicht (1 g Protein binden 1,4 g SDS). Durch die gegenseitige Abstoßung der negativen Ladung wird die Tertiär- und die Sekundärstruktur des Proteins zerstört, so dass dieses nun linear vorliegt. Die Eigenladung ist zu vernachlässigen. In der folgenden zweiten Dimension der 2D-Gelelektrophorese werden die Proteine alleine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Um die Lauffront der Proteine in der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, wurde der Farbstoff Bromphenolblau hinzugesetzt.

Sodiumdodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden 12%ige Polyacrylamid-Gele angesetzt. Für die Gele mit einer Größe von 8,4 x 6,5 cm wurden Gläser mit einem Abstand von 1,5 mm verwendet. Anschließend polymerisierten die Gele über 20 Minuten bei Raumtemperatur. Da die Proteine bereits in dem Gel der IPG-Strips gebunden waren,

wurden die IPG-Strips direkt auf die Polyacrylamidgele aufgelegt. Ein Marker zur Anzeige bestimmter Molekulargewichte lief an einer Seite eines Gels bei jeder Gelelektrophorese mit.

Eine Spannung von 100 – 120 V wurde angelegt und die Proteine gemäß ihrer Molekulargröße aufgetrennt.

Semi-Dry Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels eines Semi-Dry Blot Systems aus den Gelen auf Polyvinyliden-Difluorid (PVDF)-Hydrobond-P-Membranen übertragen. Dieser Vorgang erfolgte bei 12 V konstant über 70 Minuten.

Immunoblot

Für den Immunoblot wurden folgende PrP-spezifischen Antikörper benutzt: 3B5 (Verdünnung 1:300 - 1:500), SAF32 (Verdünnung 1:300 – 1:500), 3F4 (Verdünnung 1:1000), 12F10 (Verdünnung 1:300 – 1:500), SAF70 (Verdünnung 1:300 – 1:500) und pPrPS43 (Verdünnung 1:300 – 1:500). Nachdem die Proteine durch den Semidry-Blot auf die Nitrozellulose-Membranen übertragen worden waren, wurden sie bei Raumtemperatur für eine Stunde in 5%iges Milchpulver (BLOTTTO) gelegt, um freie Bindungsstellen auf den Membranen zu blockieren. Dann erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper bei 4° C über Nacht oder für eine Stunde bei Raumtemperatur. Es folgten Waschschrte mit PBS-T. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem passenden Meerrettichperoxidase-konjugierten zweiten Antikörper (Verdünnung 1:10.000) über 60 Minuten. Die Membranen wurden erneut mit PBS-T gewaschen und für fünf Minuten mit OKANO-Puffer inkubiert. Danach erfolgten erneut drei Waschschrte von jeweils fünf Minuten in PBS-T. Vor der Entwicklung erfolgte ein letzter Waschgang. Der Ablauf des Immunoblots ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

Lösungen:	Inkubationszeit:
BLOTTO	60 Minuten
1. Antikörper	13 Stunden bei 4°C
PBS-T	2 x 5 Minuten
PBS-T	15 Minuten
2. Antikörper	60 Minuten
PBS-T	2 x 5 Minuten
PBS-T	2 x 15 Minuten
OKANO + BSA	5 Minuten
PBS-T	2 x 5 Minuten

Tabelle 7: Zeitlicher Ablauf des Immunoblots

Entwicklung

Durch die Kopplung des zweiten Antikörpers an das Enzym Meerrettich-Peroxidase wird durch Luminol eine Oxidation katalysiert, so dass anschließend das Luminol durch Belichtung sichtbar gemacht werden kann. Dazu wurde die Membran zuerst für genau eine Minute in die Entwicklungslösung I und dann für genau eine Minute in die Entwicklungslösung II gelegt, um anschließend mithilfe der Chemilumineszenz Lösung sichtbar gemacht zu werden.

2.2.3 Statistische Analyse der Signalintensität

Für die quantitative Auswertung der abgebildeten Isoformen in der 2D-Gelelektrophorese wurde das Software-Programm „Total Lab Quant“ verwendet. Die Gesamtheit aller untersuchten abgebildeten PrPC-Isoform-Signale wurde als 100% definiert, so dass sich anschließend für jedes einzelne Signal ein prozentualer Anteil am gesamten PrPC errechnen ließ. Für die statistische Auswertung einzelner Patientengruppen wurde das Programm „GraphPad Prism“ verwendet und die Signalintensitäten mithilfe des „Wilcoxon-Mann-Whitney Test“ hinsichtlich signifikanter Unterschiede getestet. P-Werte unter 0,05 wurden dabei als signifikant gewertet. Die mittlere Standard-Abweichung, *standard deviation of the mean*, wurde für die untersuchten Gele einer Gruppe mit angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Proteinase-K-Resistenz von PrPC in Liquorproben von CJK und Kontroll-Patienten

Liquorproben von sCJK- und Kontroll-Patienten wurden nach limitiertem Proteinase-K-Verdau und anschließendem Immunoblot mit dem PrP-spezifischen Antikörper 3F4 miteinander verglichen. Die Resistenz von PrPC in den untersuchten Proben gegenüber Proteinase-K war mit etwa 3 µg Proteinase K/ ml annähernd gleich in Kontroll- und sCJK-Proben. Es besteht somit eine ähnliche Sensitivität des PrP gegenüber der Proteinase-K in beiden untersuchten Gruppen, wie in Abbildung 4 ersichtlich. Unlösliches PrPSc konnte in keiner der untersuchten Proben gefunden werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Liquorproben im zweidimensionalen Immunoblot sehr wahrscheinlich überwiegend lediglich PrPC enthalten, beziehungsweise die Menge an PrPSc und an möglichen Zwischenformen unterhalb der Detektionsgrenze im Western-Blot liegt.

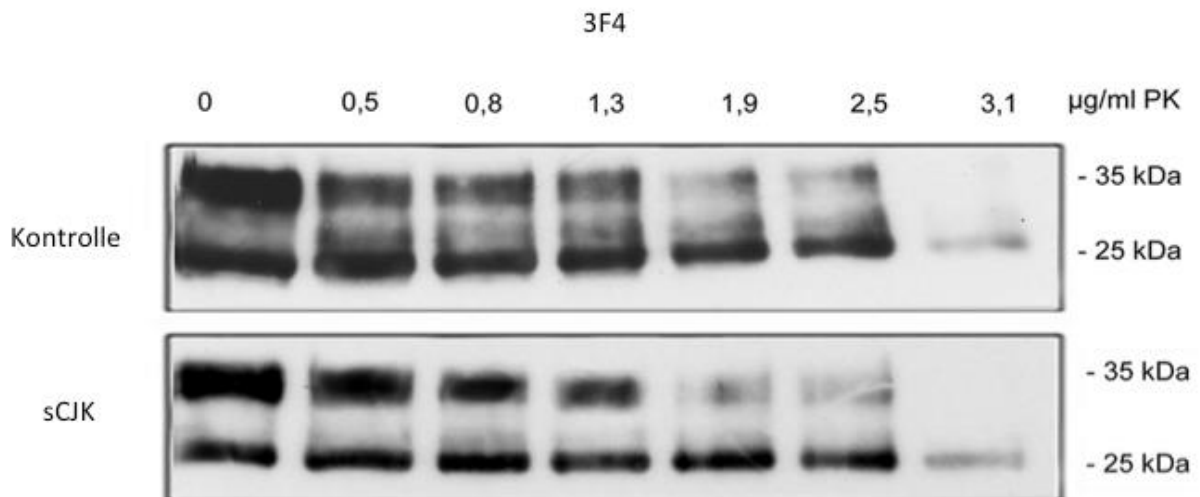


Abbildung 4: Limitierter Proteinase-K-Verdau mit anschließendem Western-Blot von sCJK- und Kontrollproben. Bei unterschiedlicher Konzentration der Protease zeigte sich eine ähnliche Sensitivität des PrP gegenüber Proteinase-K bei sCJK und Kontrollproben. Die Toleranzgrenze gegenüber dem Abbau lag dabei bei etwa 3 µg PK/ ml. Proteinase-K resistentes PrPSc konnte mit dieser Methode nicht detektiert werden.

3.2 Detektion von verschiedenen PrPC-Ladungs-Isoformen in der 2D-Gelelektrophorese mittels unterschiedlicher PrP-spezifischer Antikörper

PrPC lässt sich in fünf unterschiedliche Regionen unterteilen. Das Glykosylierungsmuster von PrP im Western-Blot unterscheidet sich aufgrund unterschiedlicher Bindungsaffinitäten der Antikörper, welche vom jeweiligen Bindungs epitop abhängen, teilweise beträchtlich (Zanusso et al. 2002).

In dieser Arbeit wurden Liquorproben von einem sCJK-Patienten mithilfe von fünf PrP-spezifischen Antikörpern analysiert. Diese richten sich gegen unterschiedliche Epitope und unterscheiden sich im jeweiligen Bindungsverhalten an PrP. 3B5 und SAF32 binden an die *Octarepeat*-Region, 3F4 an die Zentral-Region und 12F10 und SAF70 an die Kern-Region von PrP (siehe auch Abbildung 5).

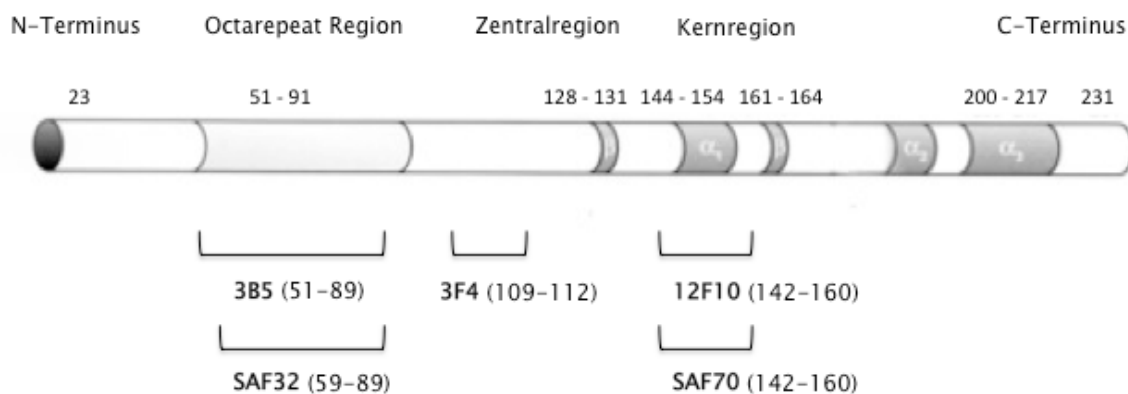


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prion-Proteins mit Bindungsstellen PrP-spezifischer Antikörper. In der *Octarepeat*-Region bindet 3B5 an die Aminosäuren 51 – 89 und SAF32 an die Aminosäuren 59 – 89. 3F4 bindet in der Zentralregion an die Aminosäuren 109 – 112. In der Kernregion binden jeweils 12F10 und SAF70 an die Aminosäuren 142 – 160.

3.2.1 Ladungs-Isoform-Profil von PrP-Antikörpern mit einem Bindungs-Epitop innerhalb der Octarepeat-Region von PrPC

Die Bindungs-Epitope der beiden PrP-spezifischen Antikörper 3B5 und SAF32 liegen innerhalb der *Octarepeat*-Region. Die sauberste Auftrennung der einzelnen Isoformen nach ihrem jeweiligen isoelektrischen Punkt zeigte sich bei der Verwendung von nicht-linearen IPG-Strips mit einem pH-Bereich von 3 bis 10.

Beide Antikörper zeigten ein nahezu übereinstimmendes Bindungs-Muster von mehreren unfragmentierten PrPC-Ladungs-Isoformen mit einem Molekulargewicht zwischen 27 und 35 kDa. Die Ausdehnung des pH-Spektrums der einzelnen isoelektrischen Punkte lag dabei zwischen pH 4,0 und 8,5 (siehe Abbildung 6).

Zur besseren Analyse der einzelnen Isoformen wurden die zwölf signalstärksten von „1 bis 12“ markiert. Als Anhaltspunkt zur Benennung der einzelnen Formen diene uns Isoform 10, welche ein charakteristisches Muster aus drei Spots aufwies.

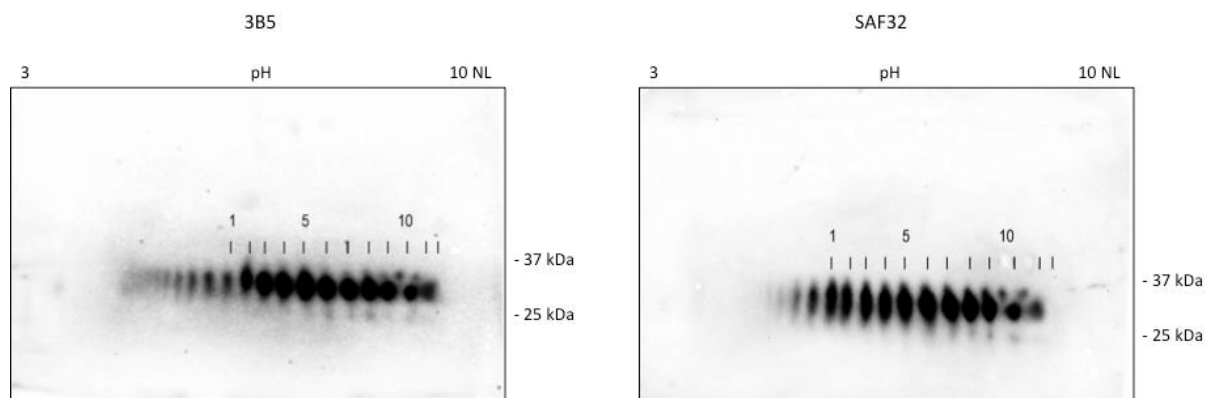


Abbildung 6: 2D-Western-Blot-Analyse mit den an die *Octarepeat*-Region bindenden spezifischen PrP-Antikörpern 3B5 und SAF32. Die Isoklassifizierung erfolgte mit nicht-linearen IPG-Strips, die einen pH-Bereich zwischen 3-10 aufwiesen. Die abgebildeten Isoform Muster zeigten PrPC-Isoformen, deren isoelektrische Punkte in einem Bereich zwischen pH < 4 und 8,5 lagen. Das Molekulargewicht lag dabei zwischen 27 und 35 kDa.

3.2.2 Ladungs-Isoform-Profil von PrP-Antikörpern mit einem Bindungs-Epitop innerhalb der Zentral-Region von PrPC

Der PrP-spezifische Antikörper 3F4 ist gegen den zentralen Teil des PrP gerichtet. Die Isoformen von PrPC mit dem Antikörper 3F4 in unseren Versuchen entsprachen in etwa dem der Antikörper SAF32 und 3B5. Diese wiesen erneut ein Molekulargewicht

zwischen 27 und 35 kDa auf, mit isoelektrischen Punkten im Bereich von pH 4,0 bis 8,5 (siehe Abbildung 7).

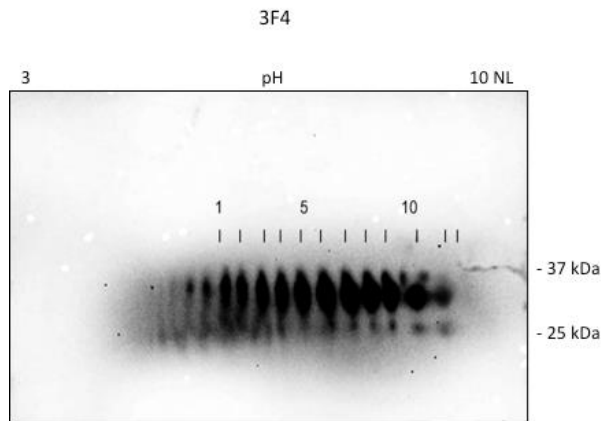


Abbildung 7: 2D-Western-Blot-Analyse mit dem an die Zentral-Region bindenden PrP-spezifischen Antikörper 3F4. Die Isofokussierung erfolgte mit nicht-linearen IPG-Streifen, deren pH-Bereich zwischen 3 und 10 lag. Die abgebildeten PrPC-Ladungs-Isoformen erstreckten sich auf einen pH-Bereich, der etwa zwischen pH 4,0 bis 8,5 lag. Das jeweilige Molekulargewicht variierte zwischen 27 und 35 kDa.

3.2.3 Ladungs-Isoform-Profil von PrP-Antikörpern mit einem Bindungs-Epitop innerhalb der Kern-Region von PrPC

Die PrP-spezifischen Antikörper SAF70 und 12F10 richten sich gegen Epitope innerhalb der Kern-Region von PrPC. Im Gegensatz zu 3B5, SAF32 und 3F4 erkennen sie zusätzlich PrPC-Fragmente, so dass sich in unseren Versuchen im Liquor von CJK-Patienten Muster mit bis zu 20 verschiedenen PrPC-Formen zeigten. Neben den unfragmentierten PrPC- Isoformen mit einem Molekulargewicht von 35 und 27 kDa konnten weitere PrPC-spezifische Spots mit einem Molekulargewicht von 19 und 21 kDa mit isoelektrischen Punkten zwischen pH 4 und 6 abgebildet werden. Zudem zeigten sich einige einzelne Isoformen bei 12 bis 15 kDa in einem pH-Bereich von etwa 4,5 bis 6 (siehe Abbildung 8).

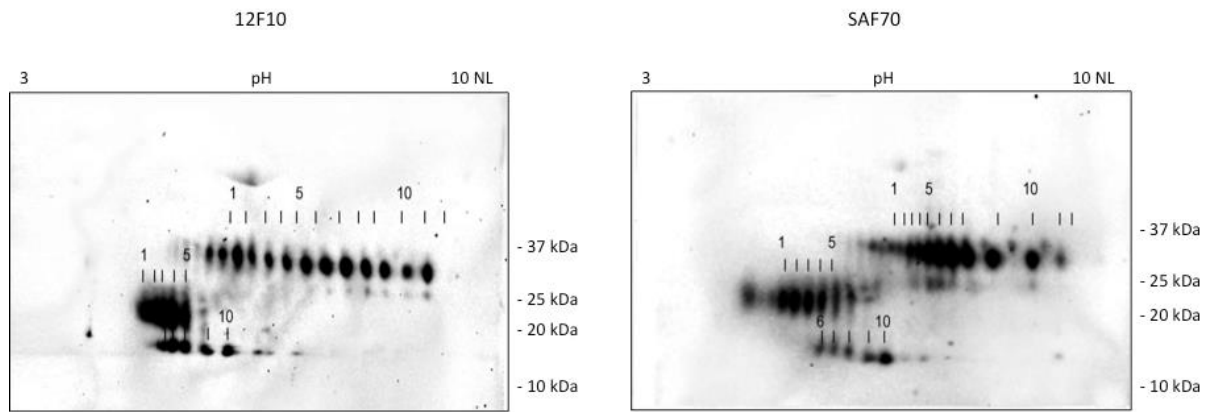


Abbildung 8: 2D-Western-Blot-Analyse von PrPC-Isoformen mit den, gegen die Kern-Region gerichteten, PrP-spezifischen Antikörpern 12F10 und SAF70. Die Isokussierung wurde bei SAF70 mit linearen IPG-Streifen (pH 3-10) und bei 12F10 mit nicht-linearen IPG-Streifen (pH 3-10) durchgeführt. Die abgebildeten PrPC-Ladungs-Isoformen lagen in einem pH-Bereich zwischen 4 bis 8,5. Neben den Isoformen mit einer Größe zwischen 27 und 35 kDa konnten weitere fragmentierte PrPC-Formen im Größenbereich von 18 bis 20 kDa sowie 12 und 15 kDa detektiert werden.

Insgesamt konnten bis zu 10 PrPC-Fragmente zwischen 22 kDa und 12 kDa bei den Antikörpern der Kern-Region im Liquor von CJK-Patienten detektiert werden. Die gleichen Fragmente ließen sich ebenso bei Kontroll-Patienten bei Anwendung des Antikörpers 12F10 nachweisen (Abbildung 9). Ein signifikanter Intensitätsunterschied der 10 fragmentierten PrPC-Isoformen zwischen CJK und Kontroll-Patienten konnte nicht gefunden werden (siehe Abbildung 10).

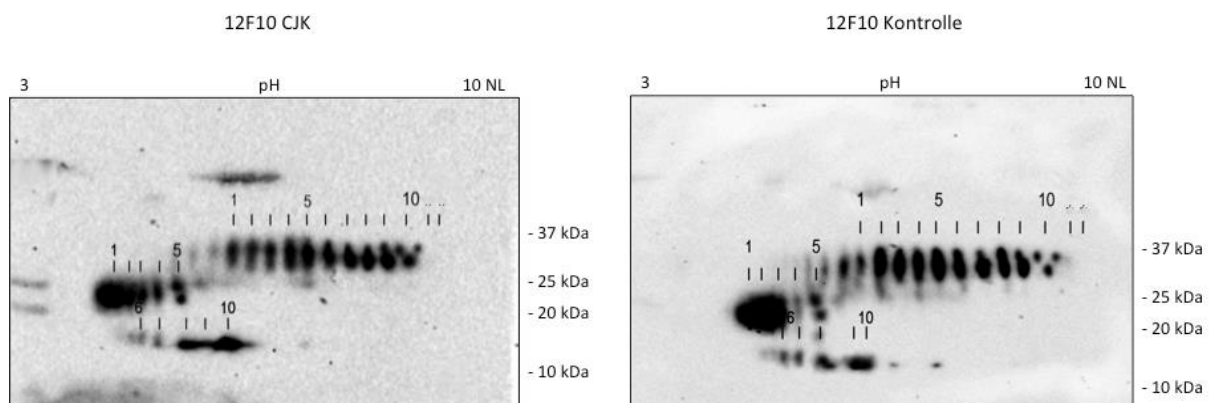


Abbildung 9: Zusätzliche fragmentierte PrP-Isoformen in Liquorproben von Patienten mit sCJK und Kontrollen im 2D-Western-Blot mit dem PrP-spezifischen Antikörper 12F10. Die zehn signalstärksten PrPC-Isoformen wurden nummeriert, ebenso wie die zehn signalstärksten fragmentierten PrPC-Isoformen.

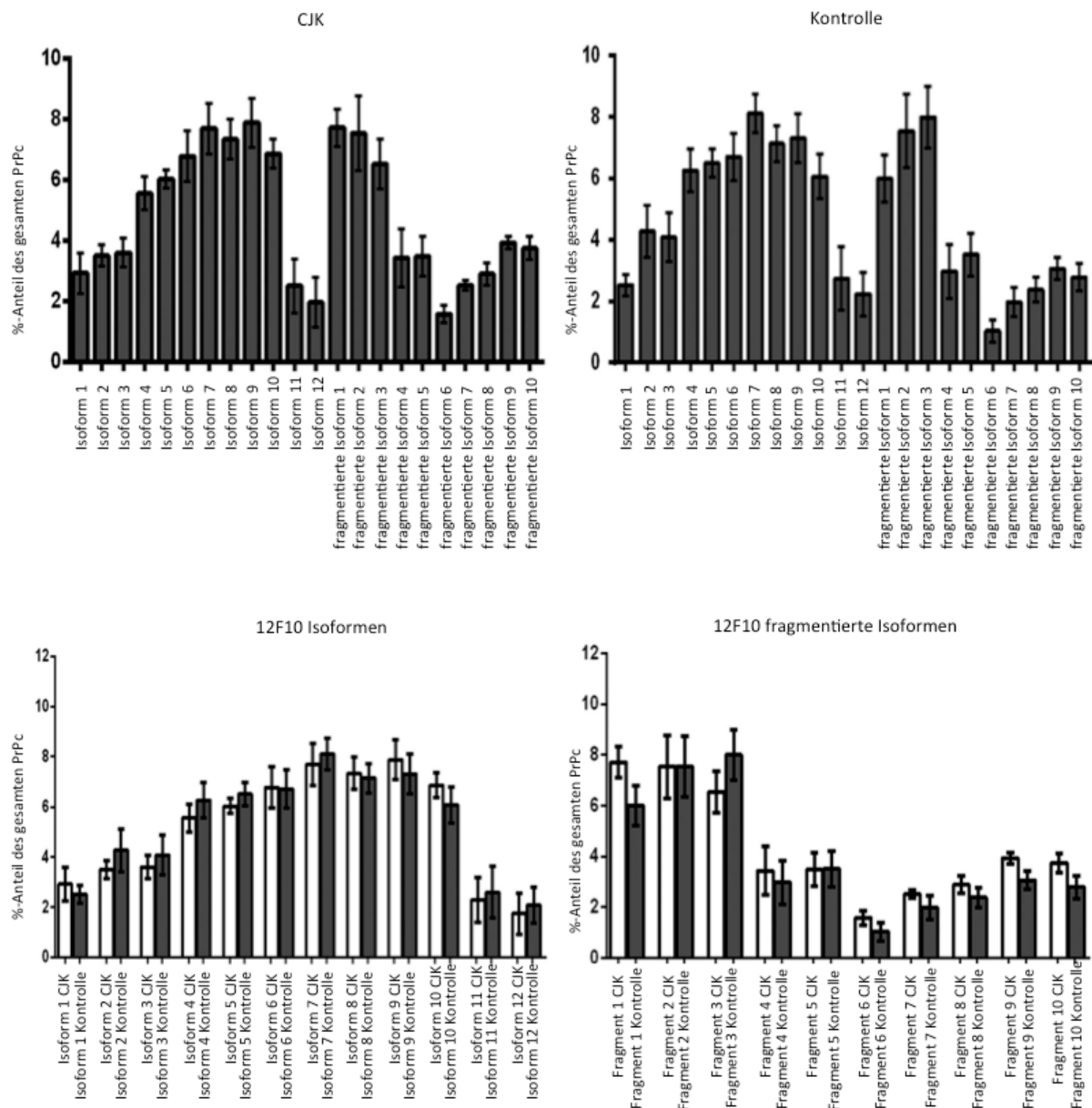


Abbildung 10: Statistische Auswertung der unfragmentierten und fragmentierten PrPC-Isoformen in der 2D-Gelelektrophorese mit dem PrP-spezifischen Antikörper 12F10 bei insgesamt vier CJK und Kontroll-Patienten (4x MM). Für die jeweils 10 stärksten Signale der unfragmentierten und fragmentierten PrPC-Isoformen wurde jeweils der prozentuale Anteil am Gesamt-PrPC mithilfe von „TotalLab Quant“ berechnet. Es zeigten sich dabei keine Unterschiede in der Intensität der Isoformen zwischen CJK und Kontroll-Patienten. Zur statistischen Analyse wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standard-Abweichung (SEM) an.

3.3 Einfluss des Geschlechts und des Alters von Patienten auf die Expression von PrPC-Isoformen

In einem Kontrollexperiment wurde überprüft, ob das Geschlecht oder das Alter der CJK-Patienten Einfluss auf die PrPC-Isoform Komposition hat. Dazu wurden Proben einer Gruppe (6 männlich, 6 weiblich, 6 < 60 Jahre, 6 > 80 Jahre) miteinander verglichen und die Expression der zwölf signalstärksten Isoformen bestimmt. Als Bezugspunkt diente das charakteristische Muster der Isoform zehn. Anschließend wurde der jeweilige prozentuale Anteil eines Signals am Gesamt-PrPC berechnet. Vergleicht man die Expression der einzelnen Isoformen, konnte kein signifikanter geschlechtsbezogener oder altersbezogener Unterschied gefunden werden, wie in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt.

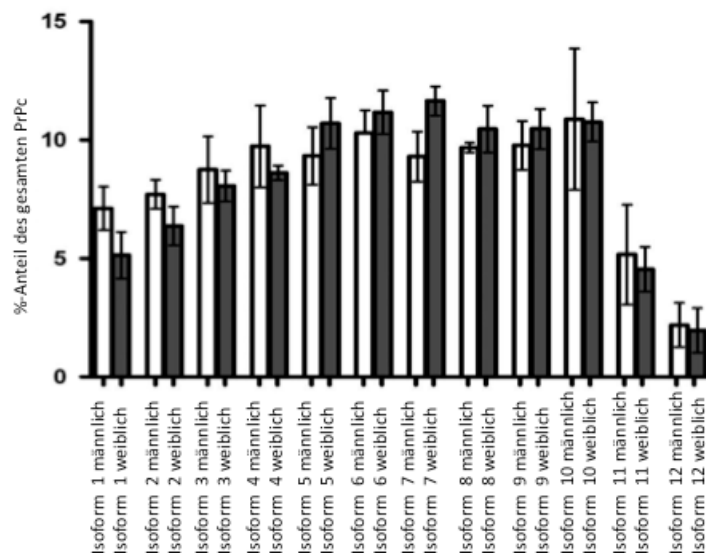


Abbildung 11: Einfluss des Geschlechts bei CJK-Patienten auf die prozentuale Zusammensetzung einzelner PrPC-Isoformen. Die Expression der 12 intensivitätsstärksten PrPC-Ladungs-Isoformen der Proben (n= 6 weiblich, n= 6 männlich, jeweils 2x MM, 2x MV, 2x VV) wurden miteinander verglichen. Dabei wurde der prozentuale Anteil jeder einzelnen Isoform im Verhältnis zum gesamten PrPC (= 100%) berechnet. Ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Intensitätsstärke einzelner Isoformen konnte nicht festgestellt werden. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standardabweichung (SEM). Die statistische Analyse wurde mithilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests durchgeführt.

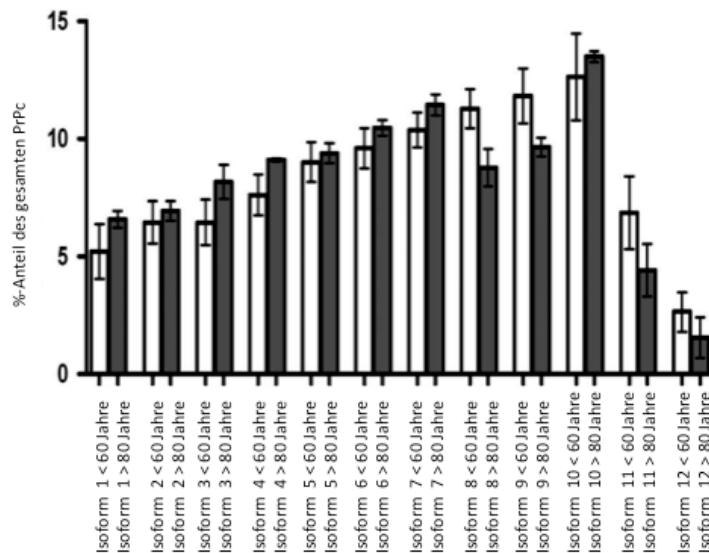


Abbildung 12: Einfluss des Patientenalters auf prozentuale Anteile einzelner PrPC-Isoformen. Die 12 intensivitätsstärksten Isoformen der Proben einer Altersklasse < 60 Jahre oder > 80 Jahre (n= 6; 2x MM, 2x MV, 2x VV an Codon-129) wurden miteinander verglichen. Dabei wurde der prozentuale Anteil jeder einzelnen Isoform im Verhältnis zum gesamten PrPC (= 100%) berechnet. Ein signifikanter Einfluss des Alters auf die Isoform Komposition konnte nicht festgestellt werden. Die Fehler-Balken geben die mittlere Standard-Abweichung an (SEM). Die statistische Analyse wurde anhand des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests durchgeführt.

3.4 Einfluss des Codon-129-Polymorphismus auf die Expression von PrPC-Ladungs-Isoformen im Liquor von sCJK und Kontroll-Patienten

Mittels 2D-Gelelektrophorese wurden von sCJK-Patienten mit definiertem PNRP Genotyp (MM, MV oder VV an Codon-129) Liquorproben untersucht, um den möglichen Einfluss des Polymorphismus auf die PrPC-Isoform Zusammensetzung im Liquor zu untersuchen. Im 2D-Western Blot wurde dafür der PrP-spezifische Antikörper SAF32 benutzt.

Die zwölf signalstärksten Isoformen wurden markiert und densitometrisch mithilfe des Software Programms „TotalLab Quant“ quantifiziert. Als Bezugspunkt diente erneut Isoform 10 aufgrund ihres charakteristischen Musters. Insgesamt wurden jeweils mindestens acht verschiedene Liquorproben mit bekanntem PNRP-Genotyp (MM, MV, VV) untersucht.

Anschließend wurde die Expression der einzelnen PrPC-Isoformen prozentual im Verhältnis zum Gesamt-PrPC berechnet. Die untersuchten Isoformen 1 bis 12 zeigten

eine teils unterschiedliche Intensitätsstärke. Im Vergleich der einzelnen Proben untereinander zeigten sich jedoch insgesamt bei den Isoformen 1 bis 11 keine signifikanten Intensitätsunterschiede. Isoform 12 hingegen zeigte eine wesentliche Verminderung der Signalintensität in VV-Proben im Vergleich zu MM und MV (siehe Abbildung 13 und 14).

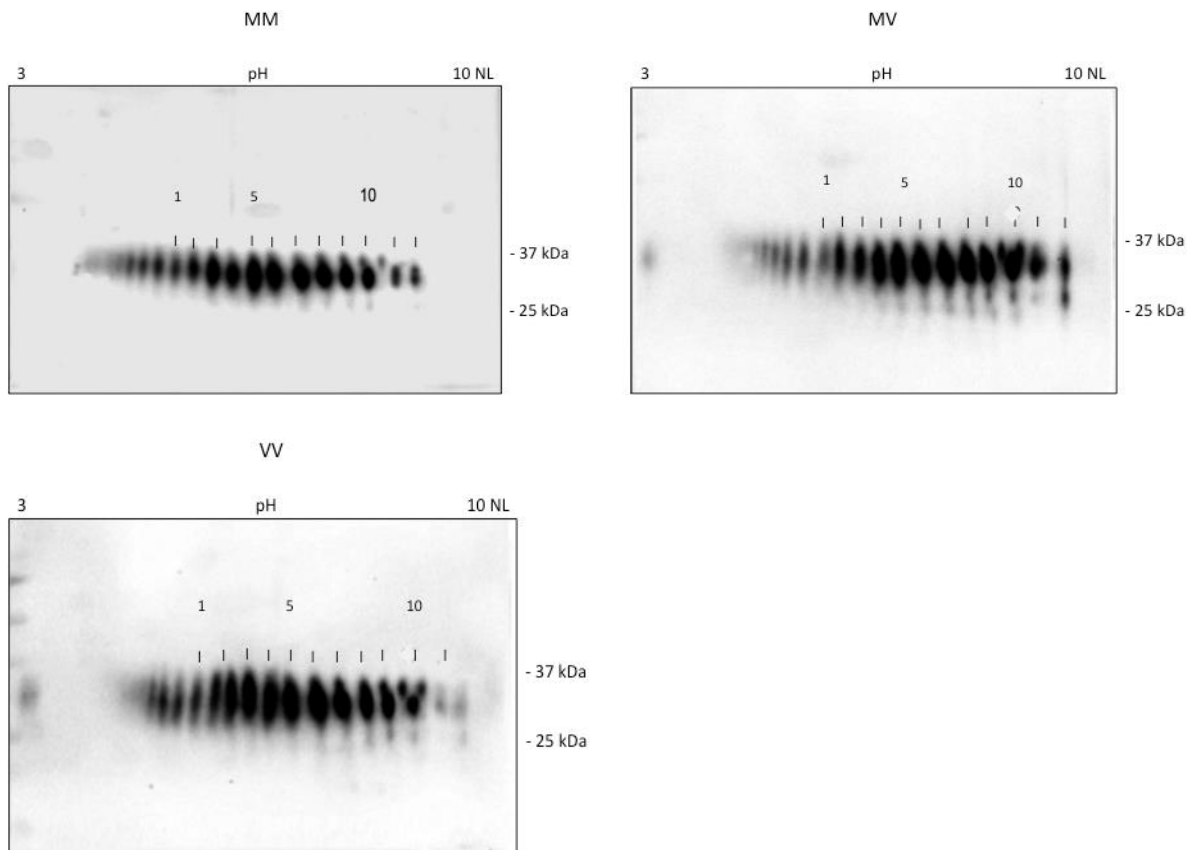
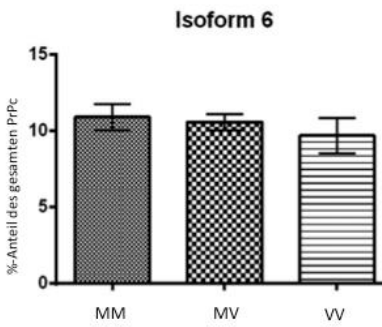
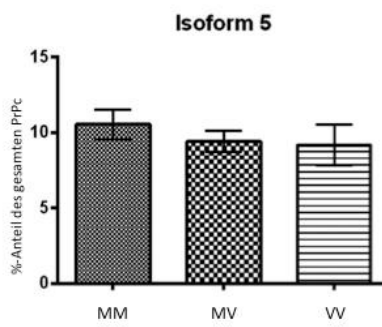
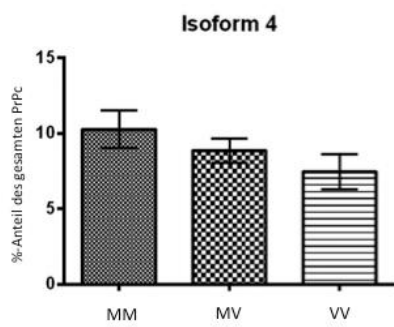
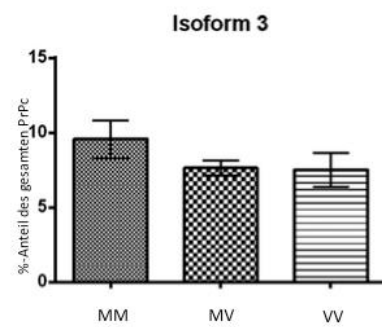
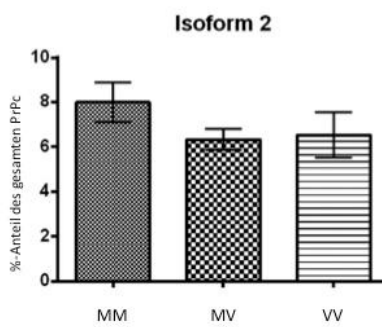
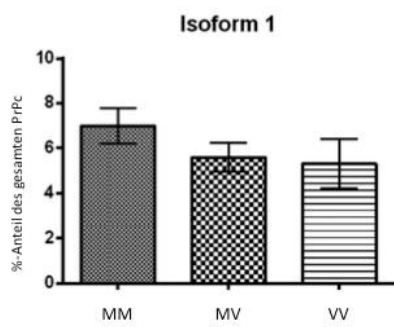
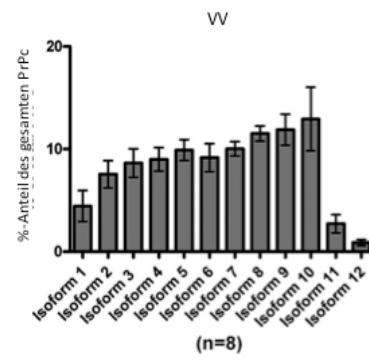
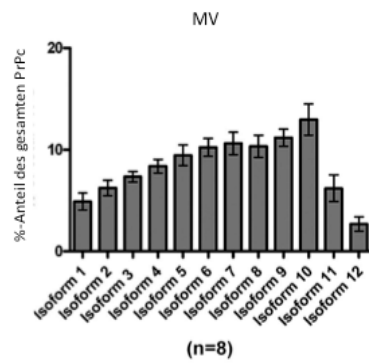
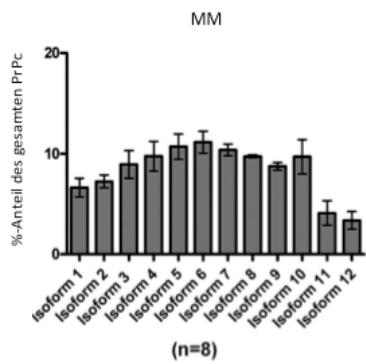


Abbildung 13: Vergleich der Isoform Zusammensetzung aus Liquorproben von Patienten mit unterschiedlichem Codon-129-Genotyp (MM, MV, VV) mittels des PrP-spezifischen Antikörpers SAF32. Die als Bezugspunkt ausgesuchte wiederkehrend charakteristische Isoform wurde als Isoform 10 bezeichnet und andere Isoformen dementsprechend nummeriert.



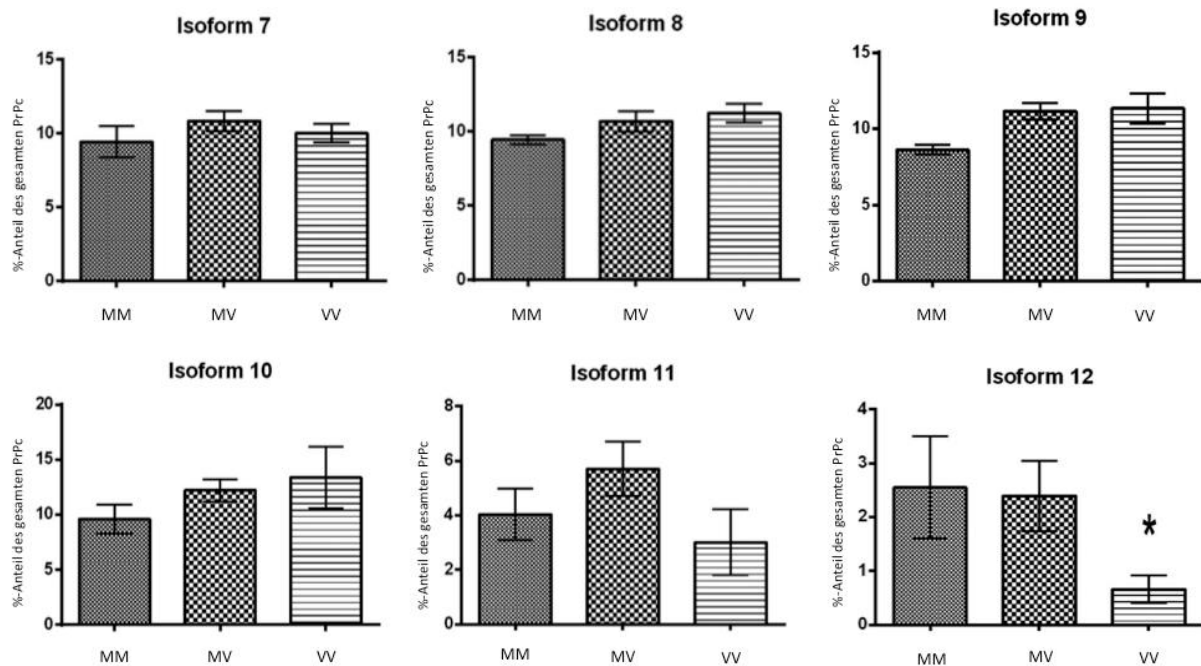


Abbildung 14: Statistische Auswertung der einzelnen PrPC-Isoformen im Liquor bei verschiedenen sCJK-Genotypen. Die Detektion der Isoformen im 2D-Western-Blot erfolgte mithilfe des Antikörpers SAF32. Für die zwölf intensivstärksten Signale wurde jeweils der prozentuale Anteil am Gesamt - PrPC (alle Isoformen = 100%) mithilfe der Software „TotalLab Quant“ angegeben. Die Expression der Isoform zwölf war bei sCJK-Patienten mit VV Genotyp an Codon-129 signifikant geringer (mit * gekennzeichnet, $p < 0,05$) als bei CJK-Patienten mit MM oder MV Genotyp. Zur statistischen Analyse wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standard-Abweichung (SEM).

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse inkubierten wir Liquorproben mit bekanntem PRNP-Genotyp zusätzlich mit dem PrP-spezifischen Antikörper 3F4. Auch hier zeigte sich, bei insgesamt ähnlichem Isoform Muster, eine signifikante Minderung der Signalintensität von Isoform 12 bei Proben des VV Genotyps (siehe Abbildungen 15 und 16).

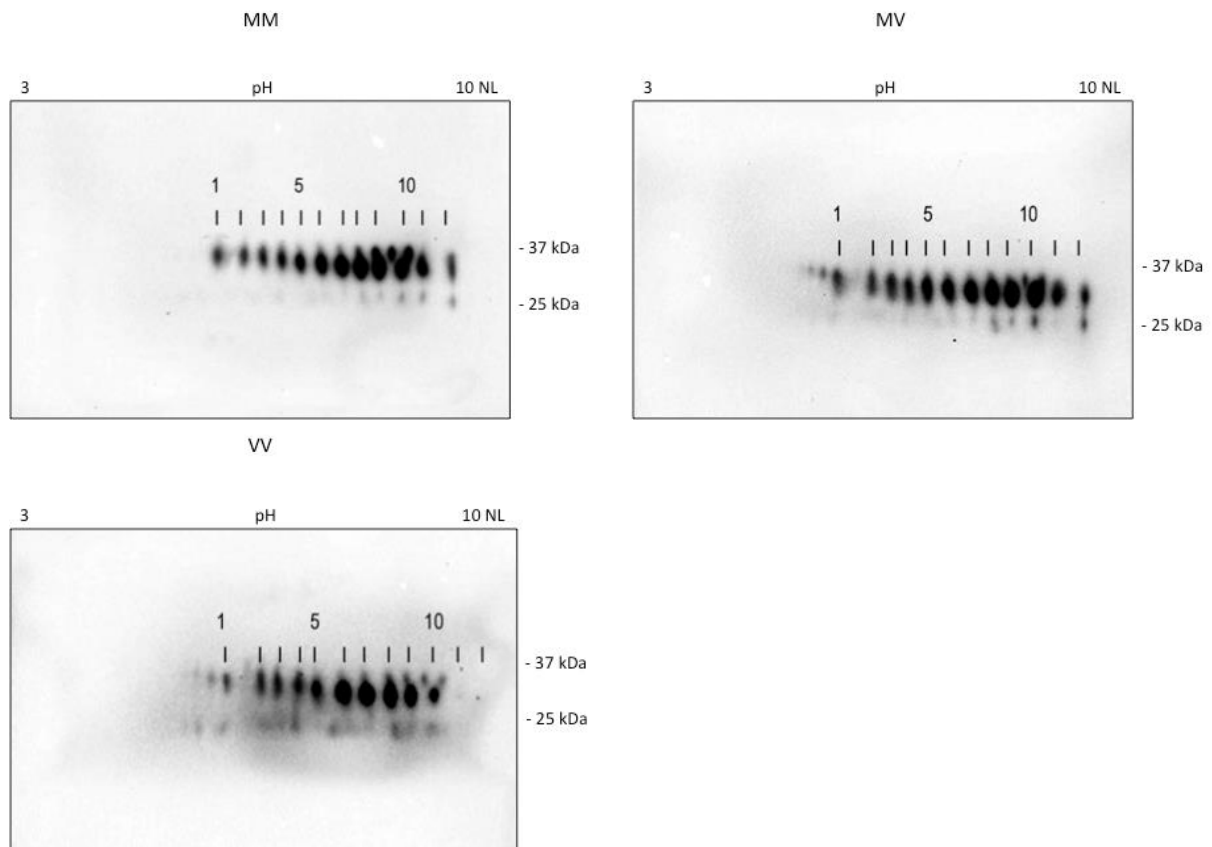
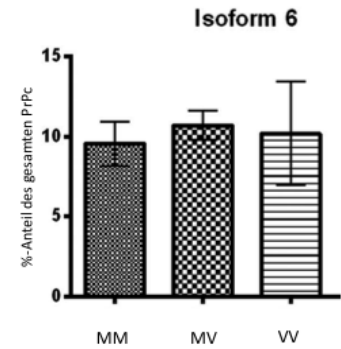
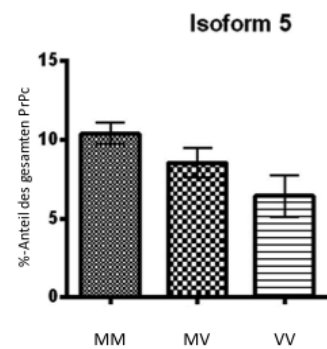
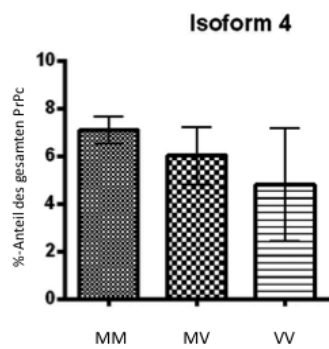
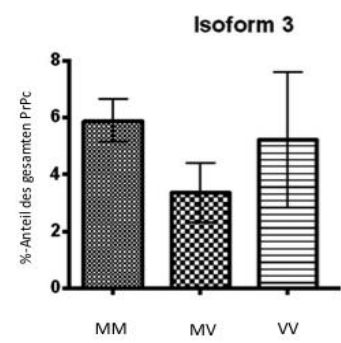
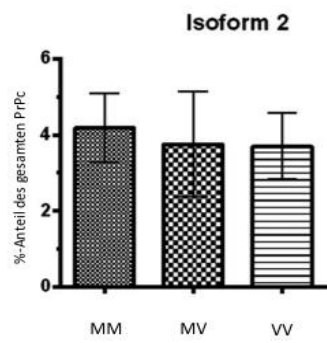
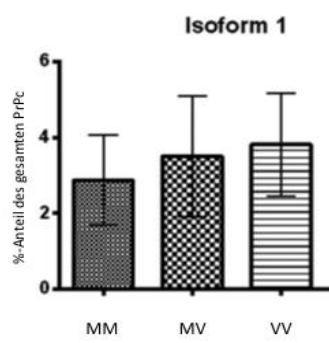
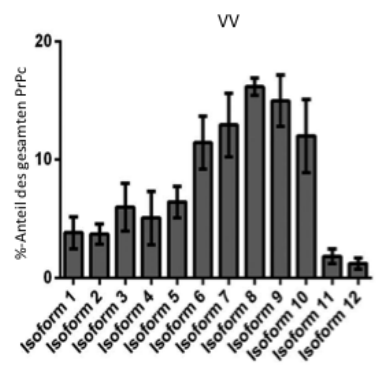
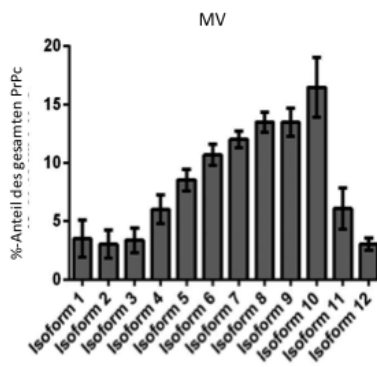
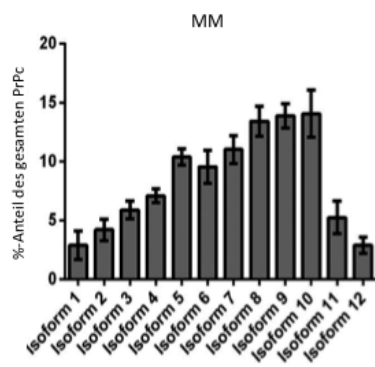


Abbildung 15: Vergleich der Isoform Zusammensetzung von Patienten mit bekanntem PRNP-Genotyp (MM, MV, VV an Codon-129) in der 2D-Gelelektrophorese mit dem PrP-spezifischen Antikörper 3F4. Die Isoformen wurden, bezogen auf die zuvor als wiederkehrend charakteristisch definierte Isoform 10, nummeriert und gekennzeichnet.



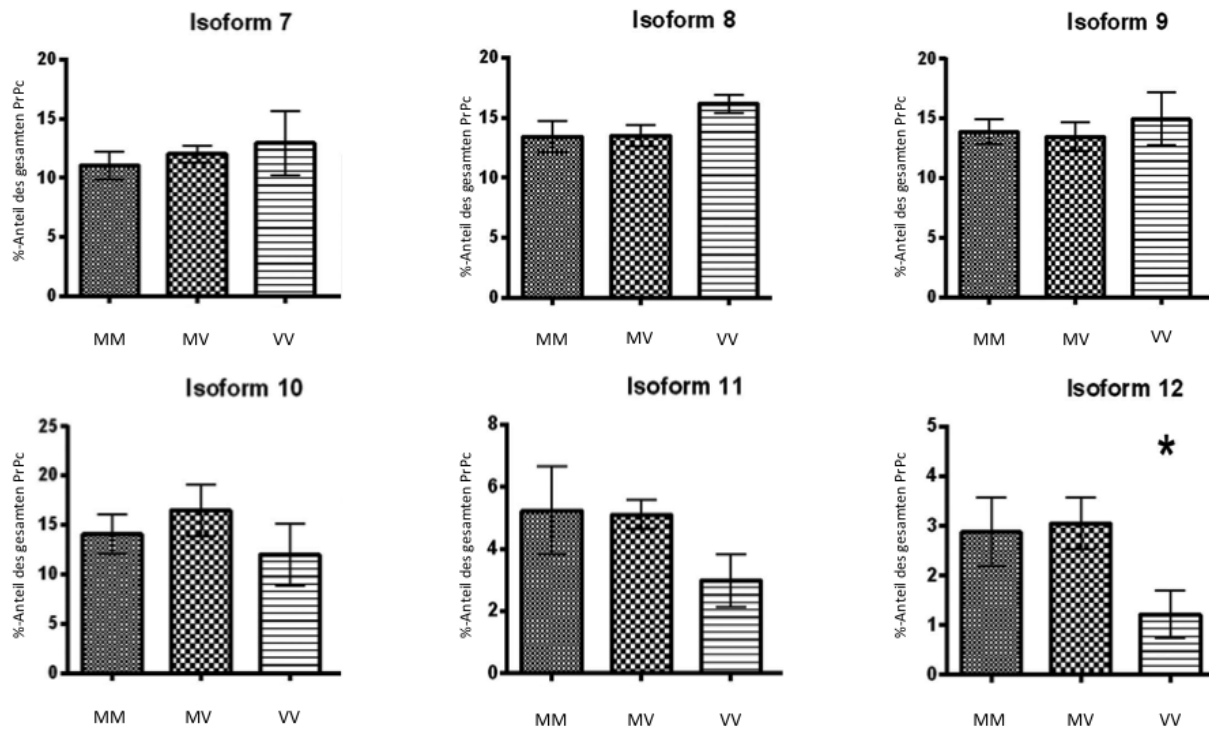


Abbildung 16: Statistische Auswertung einzelner PrPC-Isoformen bei bekanntem PRNP-Genotyp (MM, MV oder VV) nach 2D-Western-Blot mit dem PrP-spezifischen Antikörper 3F4. Insgesamt wurden Liquorproben von 15 CJK-Patienten (5x MM, 5x MV, 5x VV) untersucht. Für die zwölf intensivstärksten Signale wurde jeweils der prozentuale Anteil am Gesamt-PrPC mithilfe der Software „TotalLab Quant“ ausgerechnet. Die Signalstärke der Isoform 12 zeigte sich im Vergleich bei CJK-Patienten mit VV an Codon-129 signifikant geringer (mit * gekennzeichnet, $p < 0,05$) als bei CJK-Patienten mit MM oder MV Genotyp. Zur statistischen Analyse wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standard-Abweichung (SEM).

Im weiteren Schritt untersuchten wir, ob Liquorproben von Kontroll-Patienten ebenfalls Signalunterschiede im Isoform Muster von PrPC bei festgelegten PRNP-Genotypen zeigen würden. Im Gegensatz zu den untersuchten sCJK-Proben zeigten sich im Liquor von Kontroll-Patienten mit bekanntem PRNP-Genotyp (MM, MV, VV an Codon-129) keine signifikanten Unterschiede in der PrPC-Isoform Zusammensetzung (siehe Abbildungen 17 und 18).

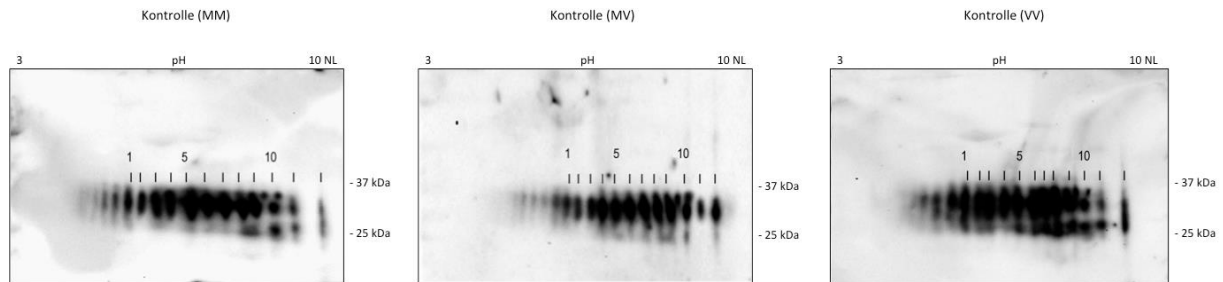
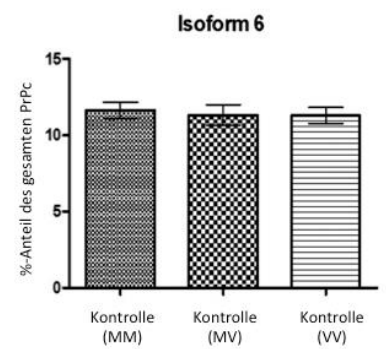
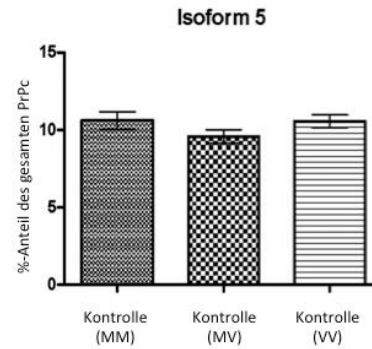
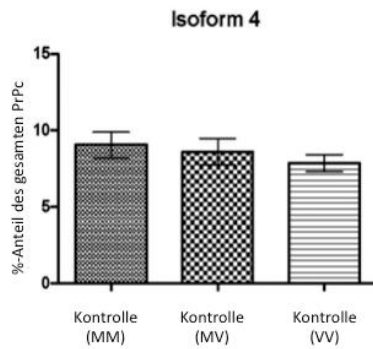
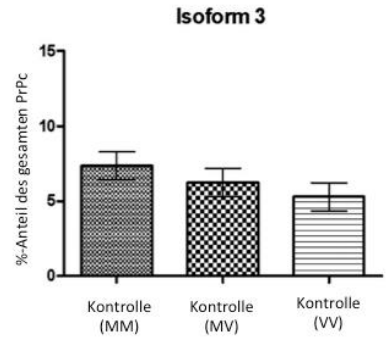
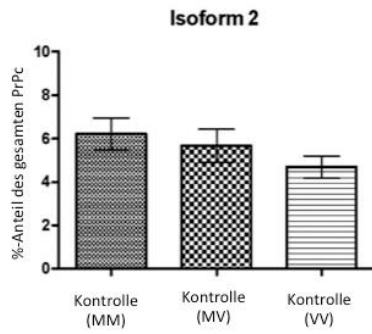
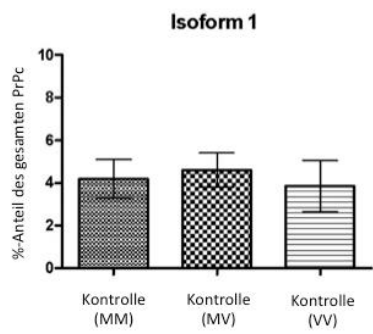
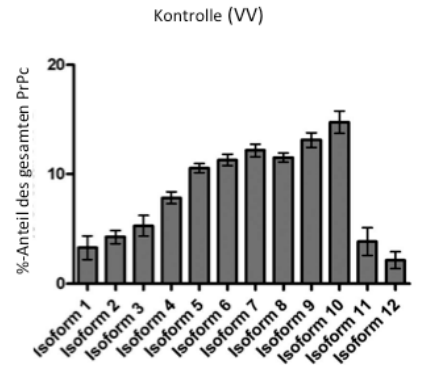
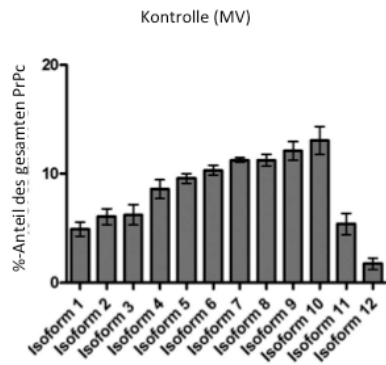
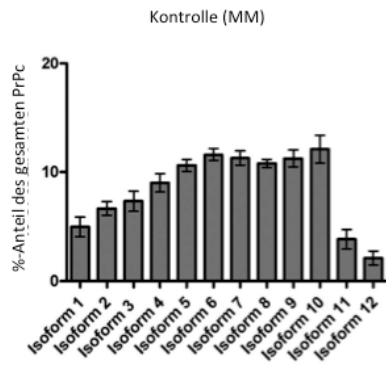


Abbildung 17: Vergleich von PrPC-Isoformen aus Liquorproben von Kontroll-Patienten mit definiertem PRNP-Genotyp (MM, MV, VV an Codon-129) in der 2D-Gelelektrophorese mit dem PrP-spezifischen Antikörper SAF32. Die Nummerierung der Isoformen erfolgte bezogen auf die zuvor definierte Isoform 10.



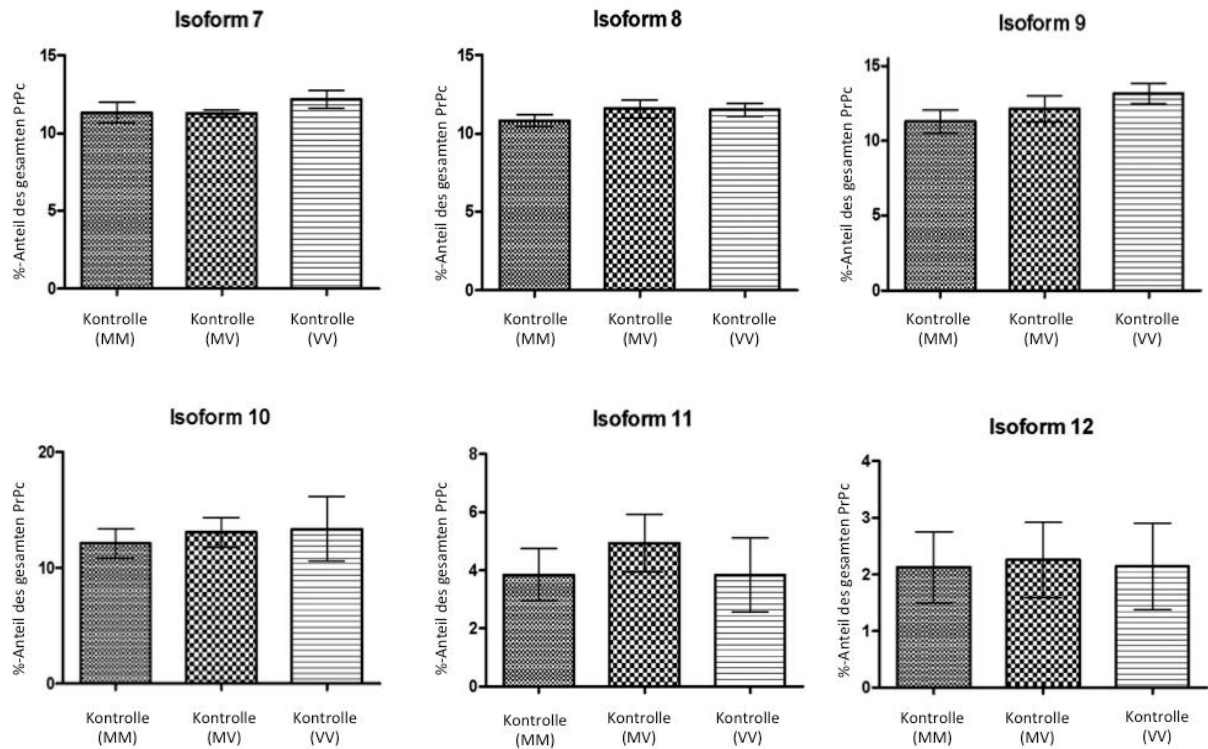


Abbildung 18: Statistische Auswertung der 2D-Gelelektrophorese von Kontroll-Patienten mit definiertem Genotyp an Codon-129. Die Quantifizierung der zwölf signalstärksten Isoformen erfolgte mittels „Total Lab Quant“ mit Darstellung der prozentualen Anteile der jeweiligen Isoform bezogen auf das abgebildete Gesamt-PrPC. Insgesamt wurden mindestens vier Patienten eines jeden definierten Codon-129 (MM, MV, VV) untersucht. Zwischen den Kontroll-Proben zeigten sich keine relevanten Unterschiede in der PrPC-Isoform Zusammensetzung. Zur statistischen Analyse wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standard-Abweichung (SEM).

3.5 Einfluss von Prion-Protein Scrapie Typ 1 und 2 auf die PrPC-Isoform-Expression im Liquor von CJK-Patienten

Um den Einfluss der PrPSc-Typen auf die Expression der PrPC-Isoformen im Liquor von sCJK-Patienten zu untersuchen, wurden Proben mit Prion Typen 1 und 2, ungeachtet des PRNP-Genotyps an Codon-129 mittels 2D-Western Blot und dem PrP-spezifischen Antikörper SAF32 untersucht und miteinander verglichen (Abbildung 19). Erneut wurden die zwölf intensivitätsstärksten PrPC-Isoformen densitometrisch durch das Software Programm „Total Lab Quant“ analysiert und einzelne Isoformen prozentual zum Gesamt-PrP gesetzt. Bei den Isoformen 1 bis 11 zeigten sich dabei keine wesentlichen Unterschiede. Isoform 12 zeigte insgesamt eine signifikante Intensitätsminderung in den Liquorproben von CJK-Patienten mit Prion-Protein Typ 2 (siehe Abbildungen 19 und 20).

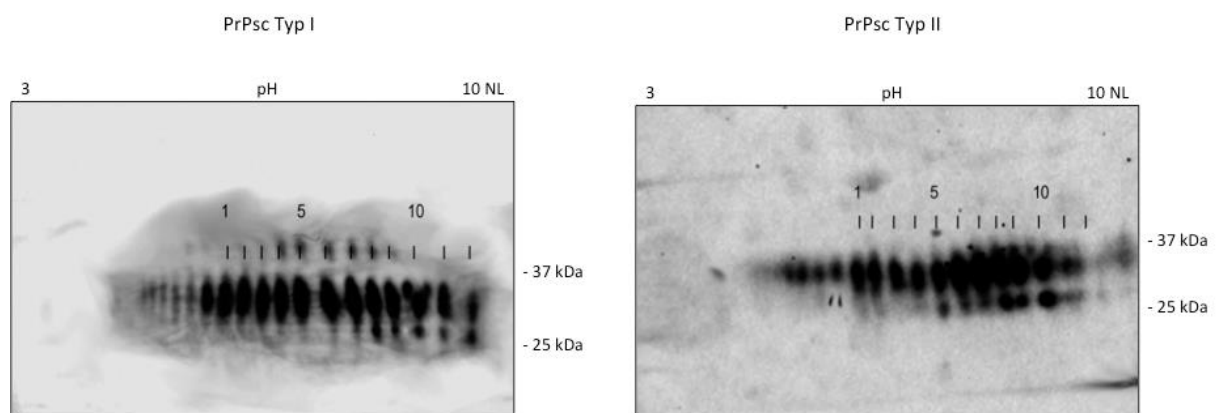


Abbildung 19: Vergleich der Isoform-Zusammensetzung zwischen PrPSc-Typ 1 und PrPSc-Typ 2 in der 2D-Gelelektrophorese mit dem PrP-spezifischen Antikörper SAF32. Die Nummerierung der einzelnen Isoformen erfolgte bezogen auf die zuvor definierte Isoform zehn.

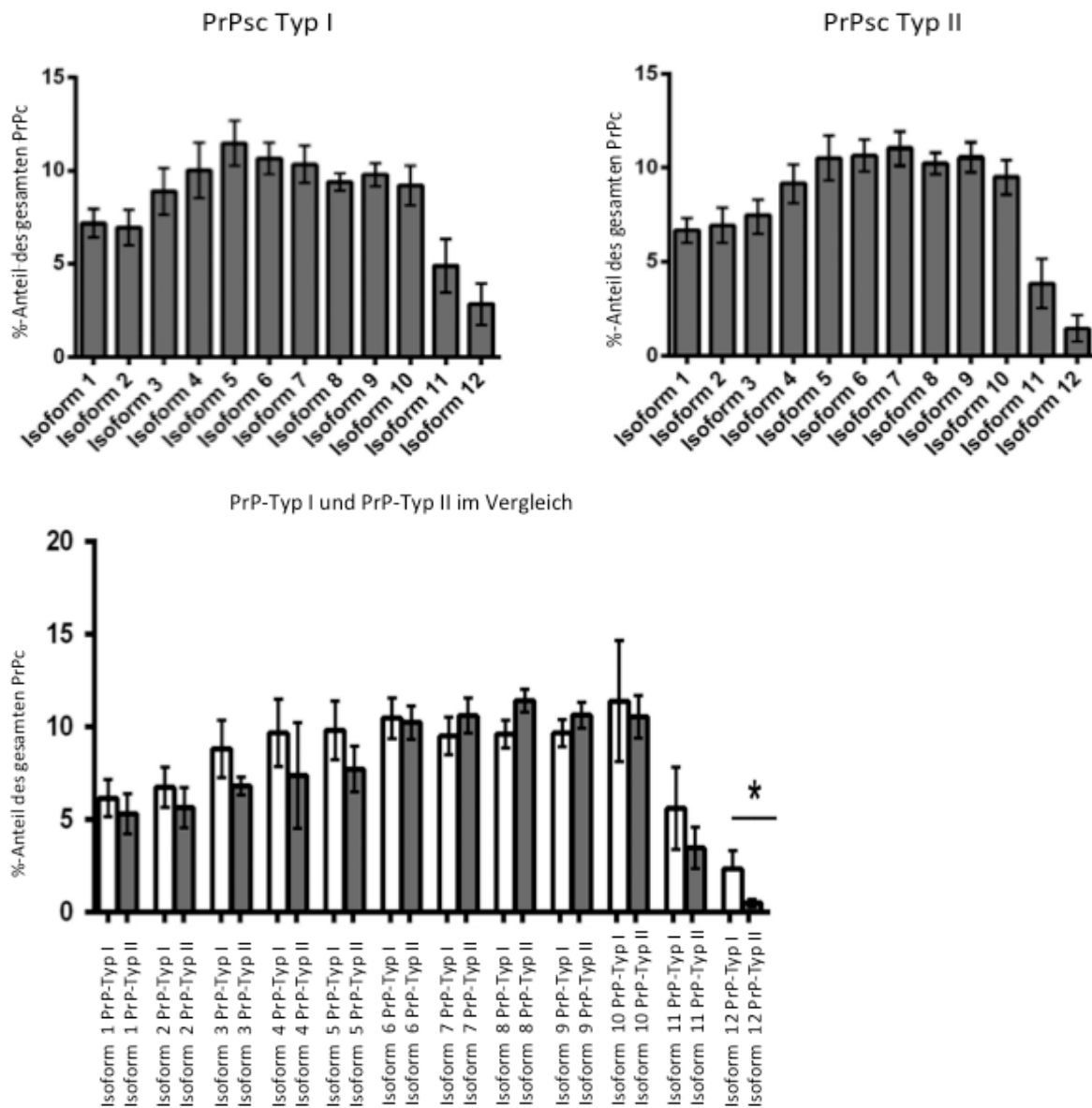


Abbildung 20: Statistische Auswertung der einzelnen PrP-Isoformen bei PrP-Typ 1 und PrP-Typ 2 im 2D-Western Blot. Insgesamt wurden jeweils acht Proben eines Prion-Typs untersucht (Typ 1: 3x MM 1, 3x MV 1, 2x VV 1; Typ 2: 4x MV 2, 4x VV 2). Die zwölf intensivstärksten Signale wurden mithilfe „Total Lab Quant“ quantifiziert und als prozentualer Anteil am Gesamt-PrP angegeben. Die Signalstärke der Isoform zwölf zeigte sich im Vergleich beim PrPsc-Typ 2 signifikant geringer (mit * gekennzeichnet, $p < 0,05$) als beim PrPsc-Typ 1. Zur statistischen Analyse wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standard-Abweichung (SEM).

Rein deskriptiv bei fehlender statistischer Auswertung wurde zudem das Ladungs-Isoform-Profil jeweils eines Gels mit VV1 und mit VV2 in der 2D-Gelelektrophorese miteinander verglichen (siehe Abbildung 21). Exemplarisch ist bei VV1 die Isoform 12 intensivstärker im Vergleich zu VV2 abgebildet. Dieses Ergebnis konnte aufgrund einer zu geringen Probenanzahl (1x VV1, 1x VV2) statistisch

nicht belegt werden, aber ist übereinstimmend mit den anderen Vergleichen von Prion-Protein Typ 1 und 2 Proben.

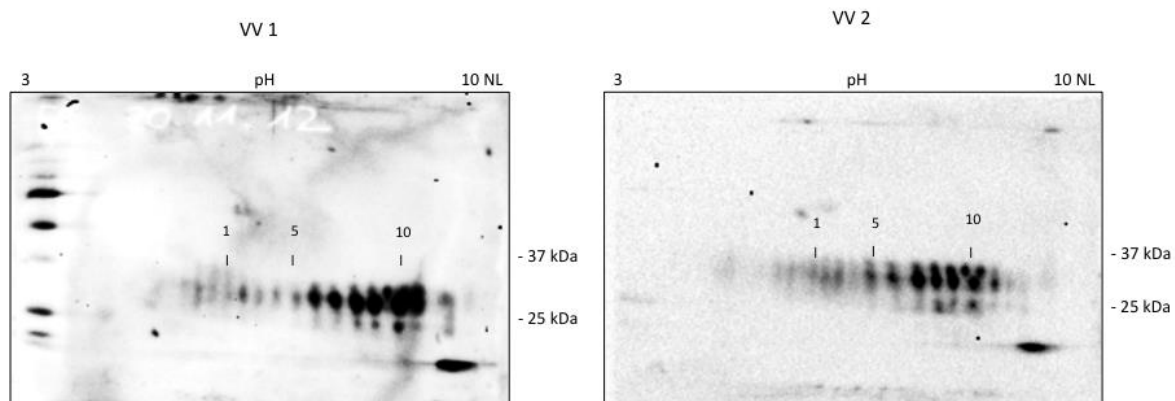


Abbildung 21: Vergleich des Ladungs-Isoform-Profiles von VV1 und VV2 in der 2D-Gelelektrophorese mittels des PrP-spezifischen Antikörpers SAF32. Insgesamt wurde jeweils eine Liquorprobe (1x VV1, 1x VV2) deskriptiv ausgewertet. Es zeigten sich mehrere intensitätsstarke Signale im Bereich zwischen 27 und 35 kDa im pH Spektrum von 4,5 bis 8,5. Anhand des charakteristisch aussehenden Signals, als Isoform 10 gekennzeichnet, wurden die einzelnen Isoformen durchnummeriert.

3.6 Einfluss der Art der Prionerkrankung auf die Expression von PrPC-Ladungs-Isoformen im Liquor

Auch die Art der Prionerkrankung (familiäre CJK versus sCJK) sollte auf die Auswirkungen auf die Isoform Zusammensetzung von PrPC im 2D-Western Blot untersucht werden. Dafür wurden Liquorproben von Patienten mit sCJK, fCJK (mit E200K Mutation) und FFI untersucht (siehe Abbildung 22). Die Quantifizierung der PrPC-Isoform-Muster zeigte, dass die Expression der Isoformen 1 bis 11 bei den einzelnen Prionerkrankungen nicht signifikant unterschiedlich reguliert war. Allerdings zeigte sich im Vergleich zu den anderen Gruppen eine schwächere Intensität der Isoform 12 bei FFI-Patienten (Abbildung 23).

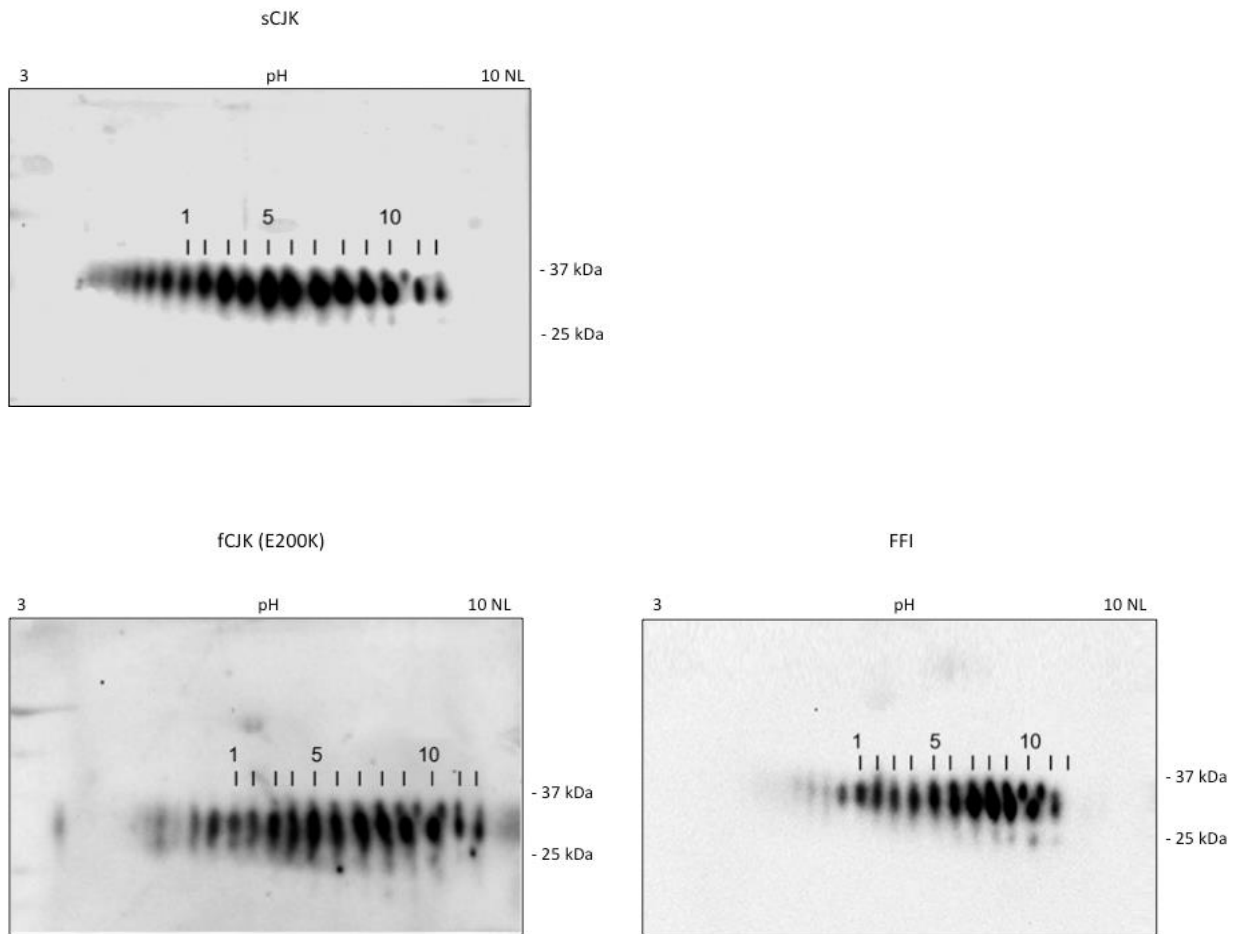
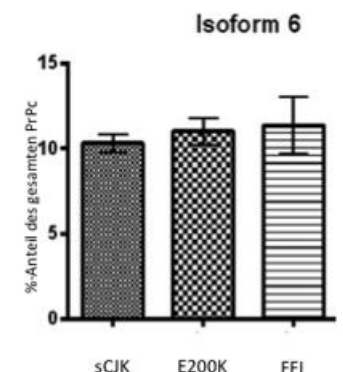
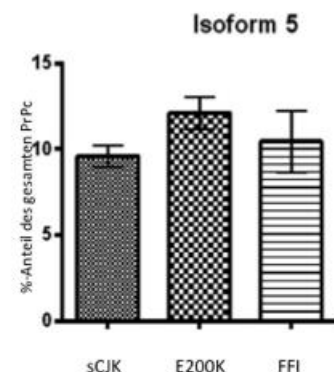
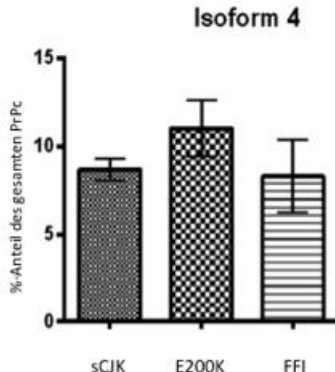
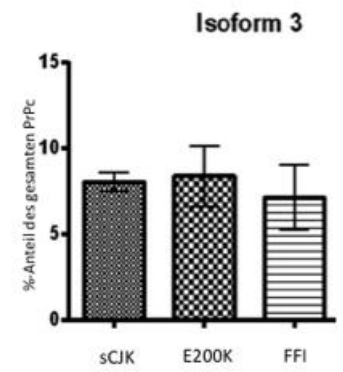
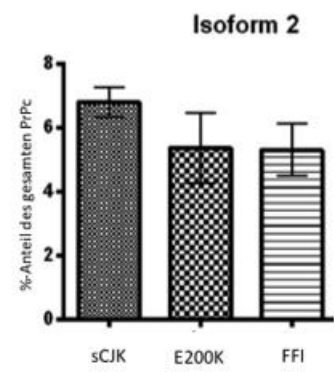
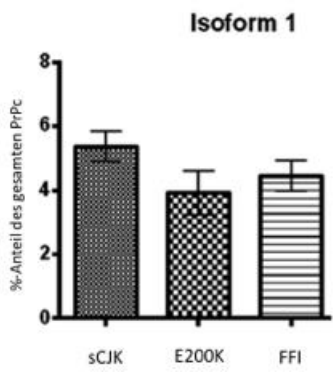
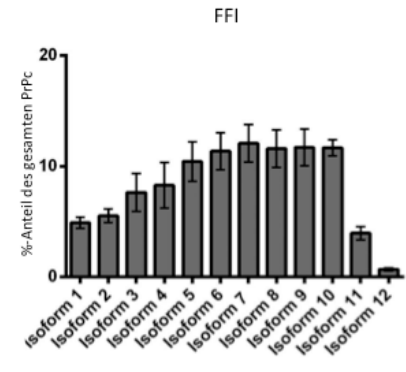
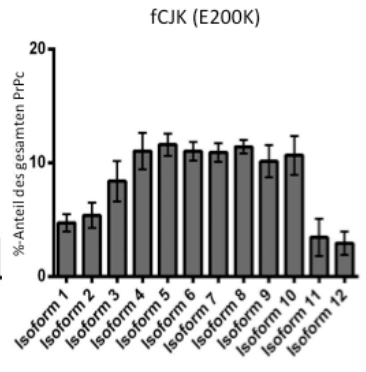
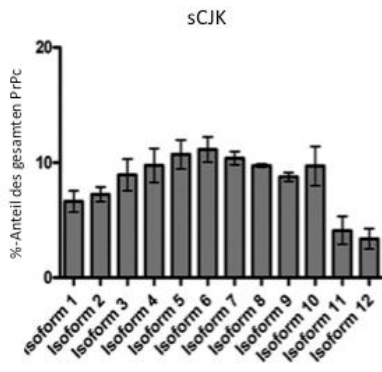


Abbildung 22: Vergleich der PrPC-Isoform-Zusammensetzung im Liquor von Patienten mit sCJK, fCJK (E200K Mutation), und FFI mittels SAF32. Die Nummerierung der 12 intensivstärksten Isoformen erfolgte nach Identifizierung der als Isoform 10 bezeichneten, charakteristischen Punktstruktur.



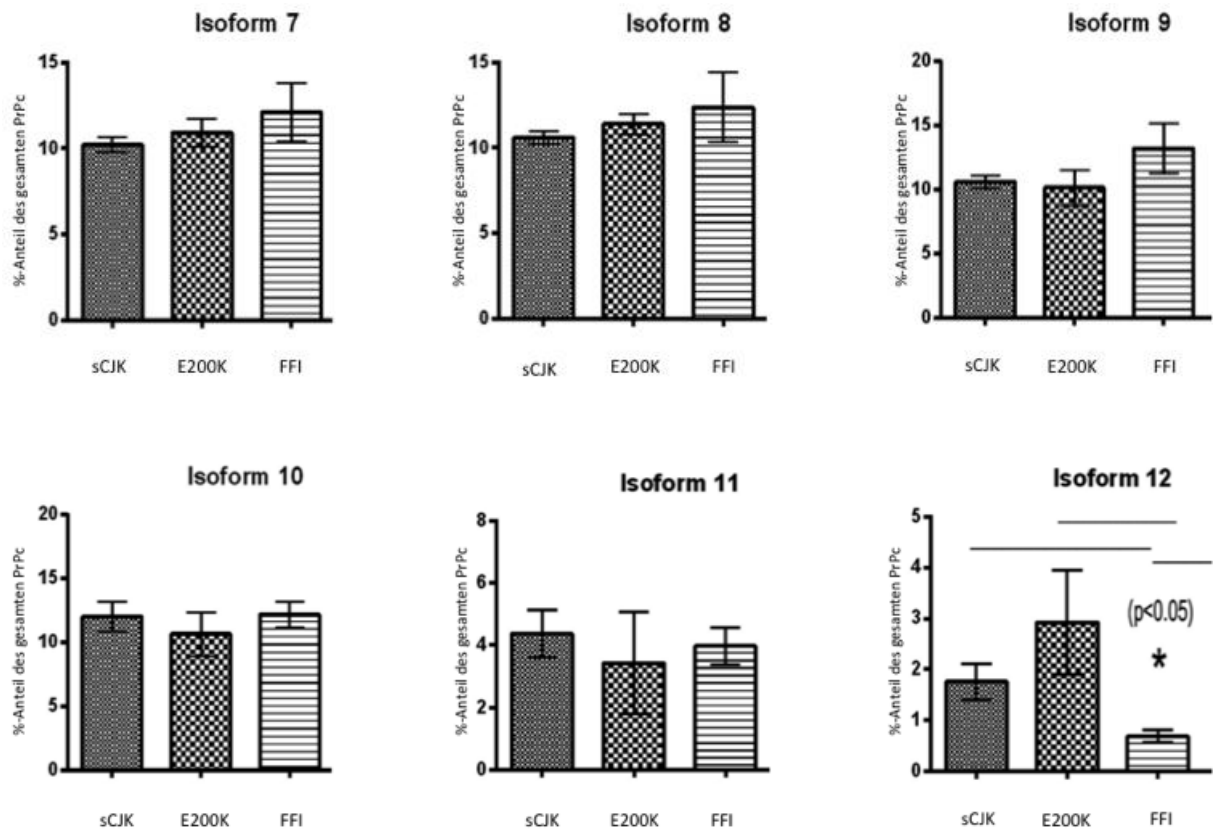


Abbildung 23: Statistische Auswertung der 2D-Western Blot-Analyse bei sCJK, fCJK und FFI-Patienten. Für die Auswertung wurden jeweils mindestens 6 Proben verwendet (sCJK: 6x MM, 2x MV, fCJK: 4x MM, 2x MV, FFI: 6x MM,). Die 12 intensivstärksten Signale wurden mithilfe „TotalLab Quant“ quantifiziert und als prozentualer Anteil am Gesamt-PrP angegeben. Die Signalstärke der Isoform 12 zeigte sich insgesamt im Vergleich bei FFI-Patienten signifikant geringer (mit * gekennzeichnet, $p < 0,05$). Zur statistischen Analyse wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standard-Abweichung (SEM).

3.7 Phosphorylierung von PrPC an Serin 43 in Liquorproben von CJK-Patienten

Zusätzlich zur Isoform-Expression im Liquor von CJK-Patienten in der 2D-Gelelektrophorese war von Interesse, wie sich das Isoform-Muster eines PrP-spezifischen Antikörpers der an phosphoryliertes PrP bindet, darstellen lässt.

Die Phosphorylierung von Proteinen scheint in der molekularen Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen eine entscheidende Rolle zu spielen. In vitro führt eine Cyclin-abhängige-Kinase-5-Phosphorylierung von rekombinatem PrP zu einer Bildung von PrPres (Giannopoulos et al. 2009). Insbesondere interessierte das Bindungsverhalten des PrP-spezifischen Antikörpers Ser43 P-PrP, der an phosphoryliertes PrP bindet, im Vergleich zwischen CJK und Kontroll-Patienten im Liquor. Hierfür wurden Proben beider Patientengruppen im Immunoblot (siehe Abbildung 24 und 25) und 2D-Western Blot untersucht. (siehe Abbildung 26).

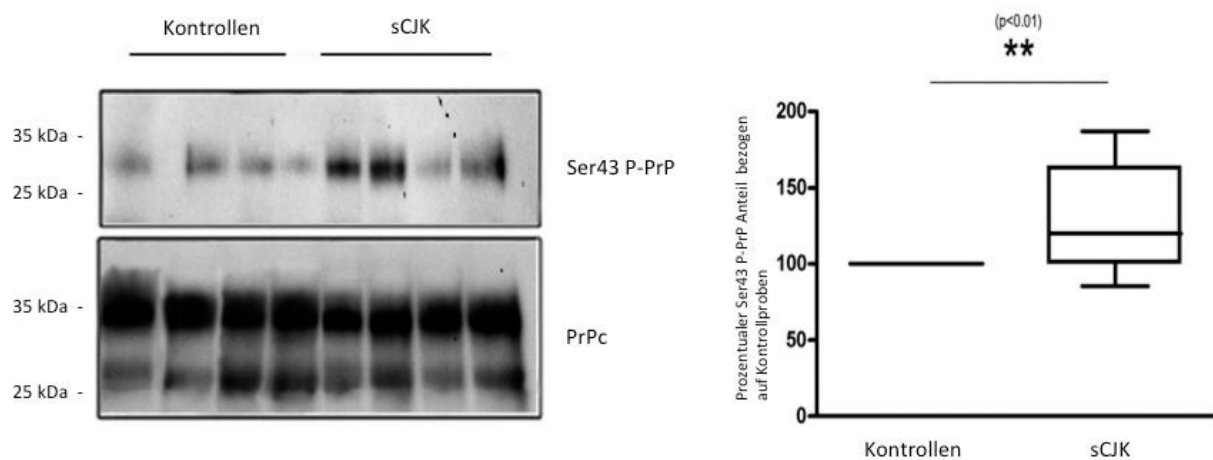


Abbildung 24: Immunoblot mittels Ser43 P-PrP in Liquorproben von sCJK und Kontroll-Patienten. Es erfolgte eine quantitative Analyse der PrPC-Signalintensitäten mithilfe der Software „Scion Image“ (n= 8 pro Gruppe; 8x sCJK, 8x Kontrolle). Die Signalstärke zeigte sich bei den sCJK-Proben im Vergleich zu den Kontroll-Proben insgesamt signifikant erhöht (** p < 0,01). Zur statistischen Analyse wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney Test verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standard-Abweichung (SEM).

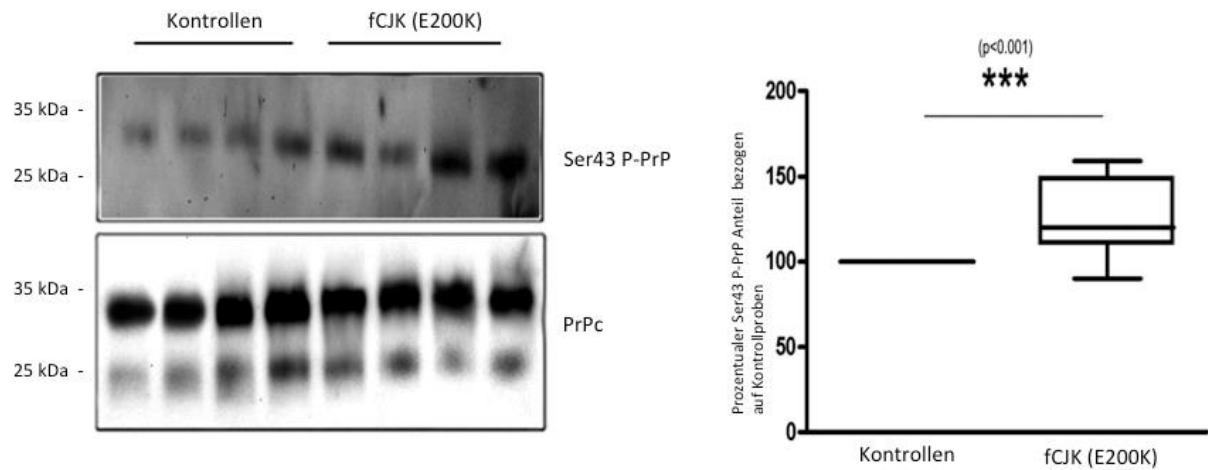


Abbildung 25: Immunoblot mittels Ser43 P-PrP in Liquorproben von fCJK (E200K) und Kontroll-Patienten. Es erfolgte eine quantitative Analyse der PrPC-Signalintensitäten mithilfe der Software „Scion Image“ (n= 8 pro Gruppe: 8x E200K Mutation, 8x Kontrolle). Die Signalstärke zeigte sich bei fCJK-Proben im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht (***) p < 0,001). Zur statistischen Analyse wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test verwendet. Die Fehlerbalken zeigen die mittlere Standard-Abweichung (SEM).

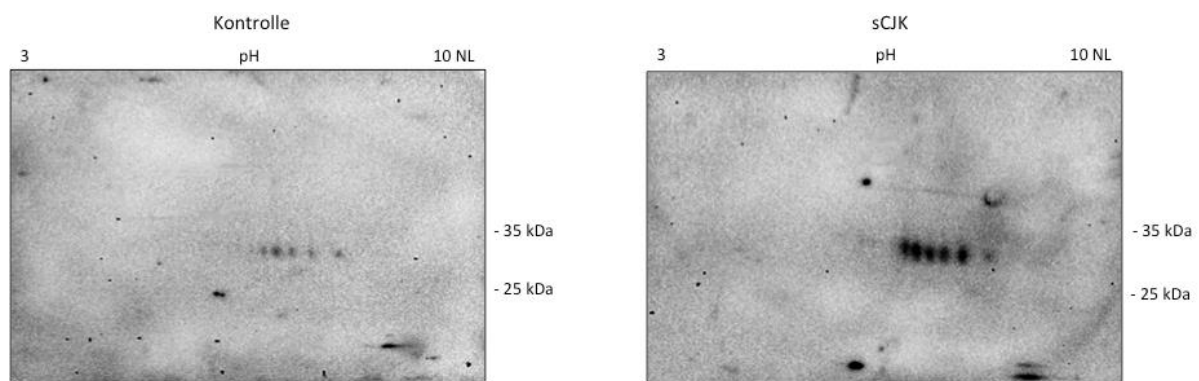


Abbildung 26: Detektion von PrPC-Isoformen mittels des P-PrP Ser43 Antikörpers in Kontroll- und CJK-Liquorproben im 2D-Western Blot. Mindestens fünf Isoformen mit einem Molekulargewicht zwischen 30 und 32 kDa mit isoelektrischen Punkten zwischen pH 6 und 8 zeigen sich in der sCJK-Probe. Die Signale der Isoformen in der Kontroll-Probe erscheinen insgesamt abgeschwächt.

4 Diskussion

In mehreren Studien wurde bereits ein Einfluss des PRNP-Genotyps oder der Prionerkrankung (familiär oder sporadisch) auf die phänotypische Ausprägung der Erkrankung und auf den molekularen Metabolismus untersucht. Beispielsweise zeigten sich in Gehirnproben von CJK-Erkrankten mit E200K oder FFI im Vergleich zu sCJK unterschiedliche PrPSc-Glykosylierungsmuster nach Proteinase-K-Verdau. Bei FFI und E200K-Proben kamen dabei gehäuft diglykosylierte PrPSc-Formen vor (Hill et al. 2006). In einem Zellmodell zur Untersuchung, ob eine genetische Mutation den Metabolismus von PrPC ändert, traten bei der Mutante vermehrt PrP-Fragmente *in vitro* auf (Capellari et al. 2000). Diese Immuno- oder 2D-Western Blot Untersuchungen weisen auf veränderte molekulare Mechanismen hin, wobei die genauen pathologischen Auswirkungen noch nicht vollständig geklärt sind.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir PrPC-Ladungs-Isoformen im Liquor von CJK- und Kontroll-Patienten mithilfe von PrP-spezifischen Antikörpern in der 2D-Gelelektrophorese, um eventuelle Unterschiede der Isoform-Zusammensetzung zwischen einzelnen Gruppen (Proben mit definiertem Codon-129-Polymorphismus, Prion-Protein Typ 1 und 2 sowie sCJK, fCJK und FFI) detektieren zu können.

Bisherige Studien, in denen Gehirnproben und Liquor mittels 2D-Western Blot untersucht wurden, haben die Existenz mehrerer PrP-Isoformen sowie fragmentierte PrP-Anteile nachgewiesen. Das Muster zeigte sich insgesamt im Liquor im Vergleich zu den Hirnproben abgeschwächt (Castagna et al. 2002).

In einer anderen Studie zeigten sich Unterschiede in der PrP-Ladungs-Isoform-Zusammensetzung einerseits sowohl bei klinisch verschiedenen Phänotypen, als auch bei Untersuchungen an Gehirnproben von CJK-Patienten, bei denen der PRNP-Genotyp bekannt war. Bei MM1 und MM2 wurden PK-resistente PrPSc-Fragmente nach Deglykosylierung von 16 kDa generiert, bei MV2 und VV2 zeigten sich Fragmente von 17,5 kDa bis 18 kDa (Zanusso et al. 2002; Zanusso et al. 2004).

Allerdings hatte bisher keine Studie die PrPC-Ladungs-Isoform-Zusammensetzung in humanem Liquor sowie den Einfluss des Codon-129-Polymorphismus oder der PrP-Typen an sCJK-Patienten auf die Expression von PrPC-Ladungs-Isoformen untersucht.

Zu Beginn der Studie konnte mithilfe eines Proteinase-K-Verdau gezeigt werden, dass die hier gezeigten PrP-Isoformen ausschließlich PrPC darstellen, da PrPSc mittels Western Blot oder ELISA nicht im Liquor von CJK-Patienten nachweisbar ist. Dies wurde in einer zurückliegenden Studie bestätigt (Wong et al. 2001). Inzwischen lässt sich allerdings durch die Amplifikation mit RT-QuIC minime Mengen von PrPSc in Hirnflüssigkeiten nachweisen (Atarashi et al. 2011).

4.1 Darstellung von PrPC-Isoformen im Liquor von CJK-Patienten mittels 2D-Western Blot

In der vorliegenden Arbeit benutzten wir verschiedene PrP-spezifische Antikörper, um möglichst unterschiedliche PrPC-Isoformen im 2D-Western Blot detektieren zu können. Die von uns verwendeten Antikörper richteten sich insgesamt gegen drei unterschiedliche Regionen von PrPC. Im zweidimensionalen Western Blot konnte so eine Vielzahl von PrPC-Isoformen detektiert werden, die sich anhand ihres Glykosylierungszustandes (zweifach glykosyliertes (36 kDa) und unglykosyliertes PrP (27 kDa) unterscheiden. Die glykosylierte Form überwog dabei gegenüber der unglykosylierten Form, was auch in zurückliegenden Studien das Ergebnis war (Kuczius et al. 2007; Schmitz et al. 2010). Zudem erfolgte die Darstellung von verschiedenen PrPC-Fragmenten mithilfe der beiden Antikörper SAF70 und 12F10, die gegen die C-terminale Kern-Region gerichtet sind.

Über zwölf intensitätsstarke PrPC-Isoformen im Liquor konnten mit den an die Octarepeat- und die Zentral-Region bindenden Antikörpern 3B5, SAF32 und 3F4 aufgezeigt werden. Im Gegensatz zum Immunoblot ist mithilfe der 2D-Gelelektrophorese zusätzlich eine Differenzierung der einzelnen Isoformen über den jeweiligen isoelektrischen Punkt, welcher auf unterschiedlichen Ladungen der Moleküle basiert, möglich. Die isoelektrischen Punkte lagen bei den oben genannten Antikörpern in einem Bereich zwischen pH 4 bis 8,5 (bei nicht-linearer Aufteilung). Der Nachweis von Isoformen in diesem pH-Bereich könnte unter anderem auf die dem PrPC anhängenden neutralen und sialinhaltigen komplexen Glykanstrukturen zurückzuführen sein (Pan et al. 2002; Rudd et al. 1999).

Im Gegensatz dazu zeigten sich in der 2D-Gelelektrophorese mit Antikörpern, welche die Kern-Region von PrPC erkennen (SAF70, 12F10) noch zusätzliche PrPC-Fragmente, die durch N-terminale Spaltung von PrPC entstehen. Ihr isoelektrischer Punkt liegt in einem pH-Bereich zwischen 4 und 6. Das Molekulargewicht dieser Spaltfragmente lag zwischen 10 und 21 kDa. Einige dieser Fragmente wiesen ein Molekulargewicht von 19 beziehungsweise 21 kDa auf. Aufgrund ihrer Masse entsprachen sie am ehesten den C2- und C1-Fragmenten (siehe dazu auch Abbildung 27). Die abgebildeten Isoformen bei 12 bis 15 kDa könnten N-terminalen PrPC-Fragmenten entsprechen. Sie entstehen durch die Alpha- und Beta-Spaltung des PrP an den Aminosäureresten 90/91 beziehungsweise 111/112 (Jimenez-Huete et al. 1998; Mange et al. 2004).

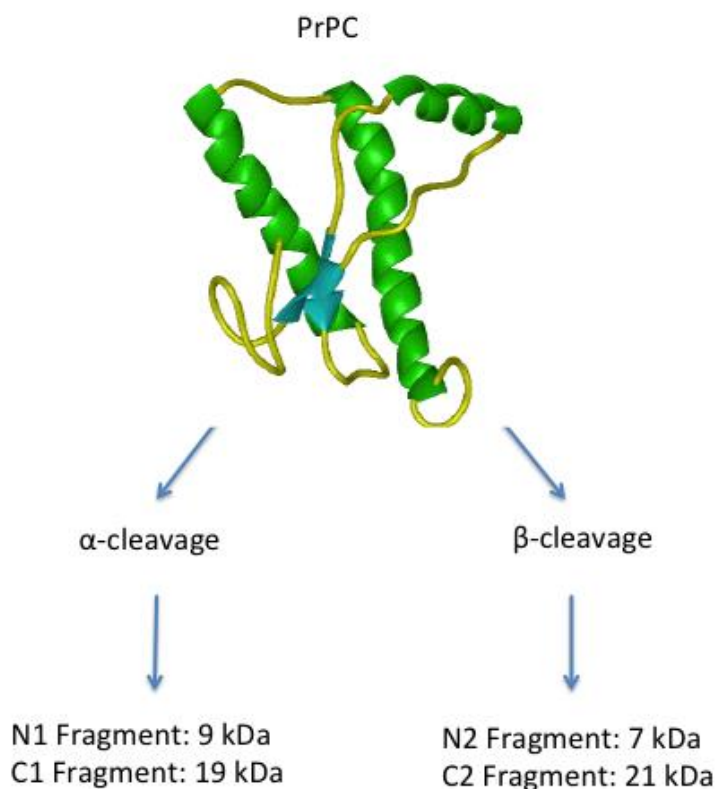


Abbildung 27: Alpha- und Beta-Cleavage des Prion Proteins in der Übersicht. Modifiziert nach: http://www.bio.davidson.edu/Courses/Molbio/MolStudents/spring2003/WilsonE/aw_prion.gif

Noch kleinere Fragmente zwischen 12 und 13 kDa bei einem pH Wert um 3 bis 5 wurden bereits zuvor im Liquor im Immunoblot beschrieben (Schmitz et al. 2010). Über ihre Entstehung ist bisher jedoch noch nichts bekannt.

Man geht davon aus, dass die dargestellten PrPC-Isoformen durch physiologische oder pathophysiologische posttranslationale Modifizierung entstanden sind (Basler et al. 1986). In vorangegangenen Studien zur Erforschung der PrPC-Expression im Liquor und Gehirn von CJK-Patienten mittels 1D- oder 2D-Western Blot wurde bereits das Vorhandensein verschiedener PrPC-Ladungs-Isoformen beschrieben (Castagna et al. 2002; Zanusso et al. 2002; Zanusso et al. 2004). Allerdings wurde in dieser Arbeit erstmals ein möglicher Zusammenhang bei der Expression von spezifischen PrPC-Isoformen oder Fragmenten mit einem bestimmten sCJK Geno- oder Subtyp durch eine umfangreiche densitometrische Analyse der einzelnen PrPC-Formen untersucht.

4.2 Vergleich von PrPC-Isoformen in der 2D-Gelelektrophorese unter Berücksichtigung des Codon-129-Polymorphismus, des Prion-Protein-Typs 1 und 2 sowie der PRNP-Mutationen (E200K, FFI)

Der Codon-129-Polymorphismus auf dem PRNP-Gen (MM, MV oder VV) hat einen großen Einfluss auf den klinischen Verlauf und den Phänotyp bei sporadischen CJK-Erkrankungen (Collins et al. 2006) sowie auf molekularer Ebene Einfluss auf die Konformation von PrPC und die Proteinase-K-Resistenz von PrPSc (Pham et al. 2008; Uro-Coste et al. 2008). Der Codon-129-Polymorphismus ist damit bedeutend für die Diagnostik, Prognose und gegebenenfalls Therapie der CJK. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die genaue molekularbiologische Einflussnahme dieses Polymorphismus allerdings weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden Liquorproben von CJK-Patienten mit verschiedenen Codon-129-Polymorphismen (MM, MV und VV) mittels 2D-Western Blot untersucht, um dabei eventuelle Unterschiede der abgebildeten Isoform-Zusammensetzung aufzeigen zu können, die wiederum Hinweise auf den unterschiedlichen Metabolismus von PrPC geben könnten.

Nach statistischer Auswertung zeigte sich eine überraschend große Übereinstimmung der PrPC-Isoform-Profile. Die zwölf am stärksten exprimierten PrPC-Isoformen wurden nummeriert. Die Isoformen 1 bis 11 waren bei allen drei sCJK-Codon-129-Genotypen MM, MV und VV nicht signifikant unterschiedlich reguliert. Bei Isoform 12 zeigte sich dagegen eine wesentlich geringere Expression in sCJK-VV-Patienten im Vergleich zum MM oder MV-Codon-129-Genotyp. Diese Abnahme der Signalintensität von Isoform 12

in sCJK VV-Proben wurde mit einem zweiten Antikörper bestätigt, wodurch sich ein Antikörper-spezifischer Effekt ausschließen lässt.

Ob die verminderte Expression dieser Isoform bei sCJK-VV-Patienten einen direkten Einfluss auf den Krankheitsverlauf oder der Krankheitsentstehung hat oder lediglich auf einen geringfügig veränderten Metabolismus von PrPC hinweist, bleibt unklar.

Untersuchungen von Kontroll-Proben, die von Patienten stammen, bei denen eine Prionerkrankung ausgeschlossen wurde, zeigten keine signifikante Minderung der Signalintensität von Isoform zwölf bei VV-Homozygotie. Dies unterstützt die These, dass die in der 2D-Gelelektrophorese gezeigten Isoform-Unterschiede mit der CJK assoziiert sind.

Neben dem Codon-129-Polymorphismus wird der Verlauf der CJK, durch differente Prion-Scrapie-Stämme beeinflusst. Diese lassen sich nach Protease-K-Verdau anhand des molekularen Gewichts ihrer unglykosylierten PrP-Isoform unterscheiden (Parchi et al. 1996; Parchi et al. 2009a). PrPSc-Typ 1 hat dabei ein molekulares Gewicht von 21 kDa, wogegen Typ 2 eine molekulare Masse von 19 kDa aufweist.

Deswegen wurden zusätzlich CJK-Proben mit definiertem Prion-Typ 1 und 2 miteinander in der 2D-Gelelektrophorese verglichen. Im erneuten Vergleich der 12 intensitätsstärksten Isoformen zeigten sich keine signifikanten Varianzen der Isoformen 1 bis 11. In sCJK-PrPSc-Typ 2 Proben (MM2, MV2 oder VV2) ließ sich dagegen erneut eine signifikante Signalminderung der Isoform 12 beobachten.

Die gleiche Beobachtung konnte auch in FFI-Proben mit MM-Polymorphismus festgestellt werden. Diese wurden mit sCJK- (6x MM, 2x MV) und fCJK- (E200K) (4x MM, 2x MV) Patienten verglichen und verfügten ebenfalls über eine geringere Expression der Isoform 12 in Relation zum gesamten PrPC.

Zusammengefasst ließ sich also zeigen, dass bei CJK-Patienten mit VV-Homozygotie an Codon-129 und FFI-Patienten sowie Proben vom Prion-Typ 2 jeweils die gleiche Isoform 12 herunterreguliert ist. In anderen Studien ist bei VV-Homozygotie und FFI der PrPSc-Typ 2 interessanterweise überrepräsentiert (Montagna et al. 2003; Parchi et al. 1999). Dies könnte bedeuten, dass die Herunterregulation von Isoform 12 eher vom PrPSc abhängt als vom PRNP-Codon-129-Genotyp. Allerdings ließ sich diese Fragestellung, ob nun alleine die VV Homozygotie an Codon-129, der Prion-Typ 2 oder beide Faktoren zusammen die PrP-Isoform Unterschiede bedingen, in der vorliegenden Untersuchung nicht abschließend klären.

Die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede im PrPC-Isoform-Profil bei verschiedenen sCJK-Subtypen oder fCJK-Prionerkrankungen sind insgesamt subtil. Eine spezifische PrPC-Ladungs-Isoform oder ein charakteristisches PrPC-Isoform-Muster ließ sich nicht detektieren. Dies entspricht im Wesentlichen vorangegangenen Untersuchungen mit 1D-Western Blots, die keine signifikanten Unterschiede bezüglich der PrPC-Glykoformen bei einzelnen sCJK-Genotypen im Liquorproben von CJK-Patienten finden konnten (Schmitz et al. 2010).

Ein entscheidender Vorteil der 2D-Western Blot Methode ist ihre Sensitivität gegenüber den abzubildenden Proteinstrukturen. Aufgrund der zusätzlichen Ladungsaufftrennung lassen sich weit mehr PrP-Signale darstellen als im Immunoblot alleine. So können auch kleine Unterschiede in der Isoform-Zusammensetzung von PrPC detektiert werden, welche sich nicht alleine durch ein unterschiedliches Molekulargewicht darstellen lassen. In dieser Arbeit konnten wir erstmals systematisch PrPC-Isoform-Zusammensetzungen in Liquorproben von CJK-Patienten mit unterschiedlichen Genotypen und Kontroll-Proben miteinander vergleichen. Subtile Unterschiede, die sich bei VV-sCJK-Patienten, Proben mit Prion-Protein-Typ 2 und FFI-Proben ergaben, konnten so erstmals aufgezeigt werden. Die in den Versuchen dargestellte Differenz der Isoform 12 kam durch geringfügige Ladungsunterschiede zustande, die durch eine veränderte Zusammensetzung der angehängten Zuckerketten bedingt sein könnte. Diese Zusammensetzung müsste dazu in einem nachfolgenden Projekt mithilfe von beispielsweise Massenspektrometrie näher aufgeschlüsselt werden.

Nachteilig an zweidimensionalen Western Blots ist das sehr aufwendige Verfahren, welches dadurch meist nur kleine Fallzahlen zulässt. Der Vorteil der 2D-Gelelektrophorese ist die hohe Sensibilität zur Darstellung von Proteinstrukturen. Sie ist dabei allerdings vielen äußeren Faktoren unterworfen. So kann zum Beispiel die Probenlagerung oder das Alter der Proben Einfluss auf die Ergebnisse haben. Wir haben versucht, dies durch standardisierte Verfahren der Probenlagerung und Verhinderung eines zu häufigen Auftauens auszuschließen.

4.3 Zunahme von P-PrP Ser43 im Liquor von CJK-Patienten

Neben der Glykosylierung ist die Phosphorylierung von Proteinen (hier PrPC) eine weitere posttranslationale Modifikation, die Einfluss auf den isoelektrischen Punkt eines

Proteins hat. Diese spielt in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen eine entscheidende Rolle (Giannopoulos et al. 2009). Die in dieser Arbeit durchgeführten Immunoblots zeigten eine signifikante Erhöhung der Signalintensität von P-PrP Ser43 im Liquor von sCJK- und fCJK (E200K)-Patienten im Vergleich zu Kontroll-Proben. Interessanterweise ließ sich diese Beobachtung auch im Gehirngewebe von sCJK- und fCJK-Patienten bestätigen (Schmitz et al. 2014).

Insgesamt besteht nach wie vor Unklarheit darüber, wie zelluläres Prion-Protein in die pathologische Form PrP^{Sc} konvertiert. Die Phosphorylierung von PrP könnte dabei eine Rolle spielen. Genauere Untersuchungen, ob phosphoryliertes PrP die Konversion zu PrP^{Sc} möglicherweise durch die negative Ladung begünstigt, könnten neue Hinweise zur Pathogenese geben. Dafür könnte beispielsweise mithilfe des Amplifikationsverfahrens *real-time quaking induced conversion* (RT-QuIC) nach einer Korrelation zwischen der Menge an phosphoryliertem PrP und der PrP-Umfaltungsaktivität beim jeweiligen CJK-Subtyp gesucht werden.

5 Zusammenfassung

Humane Prionerkrankungen wie die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit gehören zum Formenkreis der übertragbaren spongiformen Enzephalopathien, welche durch progrediente Neurodegeneration mit stets letalem Verlauf gekennzeichnet sind. Erreger dieser Erkrankungen ist das infektiöse fehlgefaltete PrP^{Sc}, welches durch charakteristische physikochemische Eigenschaften wie Protease- oder Temperaturresistenz gekennzeichnet ist. Der Krankheitsmechanismus beruht dabei auf einer Fehlfaltung des zellulären PrP^C zum pathologischen und infektiösen PrP^{Sc}, das sich aufgrund der Konformationsänderung als toxisches Amyloid in den Zellen ablagert. Der genaue pathologische Mechanismus ist allerdings bis heute nicht komplett geklärt.

Molekulare Subtypen der CJK, vor allem der Codon-129-Polymorphismus, genetische Mutationen auf dem PRNP und zwei klassifizierte Prion-Protein-Typen 1 und 2 gehen mit definierten klinischen und neuropathologischen Phänotypen einher. Dies lässt vermuten, dass auf molekularer Ebene der Metabolismus des Prions in den einzelnen Subtypen verschiedene Aspekte beinhaltet, welche Gegenstand momentaner Forschung sind (Gawinecka et al. 2013).

Ziel dieser Arbeit war es, die Isoform-Zusammensetzung von PrP^C im Liquor von verschiedenen Codon-129-Geno- und Subtypen, von verschiedenen Prionerkrankungen (CJK, FFI) im Vergleich und Kontroll-Patienten, die keine neurodegenerative Erkrankung aufwiesen, mittels 2D-Gelelektrophorese zu analysieren, um gegebenenfalls ein charakteristisches Expressionsmuster von PrP^C bei den jeweiligen Krankheitsgruppen zu detektieren.

Allerdings konnten wir in dieser Arbeit lediglich subtile Unterschiede in den Isoform-Ladungsmustern mittels 2D-Western Blot zeigen. Die signifikante Verminderung der Signalstärke einer PrP^C-Isoform mit einer Molekulargröße von etwa 35 kDa und isoelektrischem Punkt bei pH 9 in sCJK-Liquorproben mit VV an PRNP-Codon-129, in FFI und Prion-Protein-Scrapie-Typ 2 Proben weist auf einen geringfügigen Unterschied im molekularen Stoffwechsel des PrP^C hin.

Das sensitive Verfahren der 2D-Gelelektrophorese gibt somit weitere Aufschlüsse der PrP^C-Isoform-Zusammensetzung, welche im eindimensionalen Immunoblot nicht feststellbar gewesen wären. Die genauen Mechanismen dahinter werden dabei noch Gegenstand vieler Untersuchungen sein.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PrP-Typisierung nach Proteinase-K-Verdau im Western Blot.	9
Abbildung 2: Schematische Struktur des Prion-Proteins.	12
Abbildung 3: Umwandlung des Prions von einer α -Helix-Konformation beim PrPC zur β - Faltblattstruktur beim PrPSc.....	15
Abbildung 4: Limitierter Proteinase-K-Verdau mit anschließendem Western Blot von sCJK- und Kontrollproben.....	25
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Prion-Proteins mit Bindungsstellen PrP- spezifischer Antikörper.	26
Abbildung 6: 2D-Western-Blot-Analyse mit den an die <i>Octarepeat</i> -Region bindenden spezifischen PrP-Antikörpern 3B5 und SAF32.	27
Abbildung 7: 2D-Western Blot Analyse mit dem an die Zentral-Region bindenden PrP- spezifischen Antikörper 3F4.	28
Abbildung 8: 2D-Western Blot Analyse von PrPC-Isoformen mit den, gegen die Kern- Region gerichteten, PrP-spezifischen Antikörpern 12F10 und SAF70.....	29
Abbildung 9: Zusätzliche fragmentierte PrP-Isoformen in Liquorproben von Patienten mit sCJK und Kontrollen im 2D-Western Blot mit dem PrP-spezifischen Antikörper 12F10.....	29
Abbildung 10: Statistische Auswertung der unfragmentierten und fragmentierten PrPC - Isoformen in der 2D-Gelelektrophorese mit dem PrP-spezifischen Antikörper 12F10.....	30
Abbildung 11: Einfluss des Geschlechts bei CJK-Patienten auf die prozentuale Zusammensetzung einzelner PrPC-Isoformen.....	31
Abbildung 12: Einfluss des Patientenalters auf prozentuale Anteile einzelner PrPC- Isoformen.....	32
Abbildung 13: Vergleich der Isoform Zusammensetzung aus Liquorproben von Patienten mit unterschiedlichem Codon-129-Genotyp (MM, MV, VV) mittels des PrP-spezifischen Antikörpers SAF32.	33
Abbildung 14: Statistische Auswertung der einzelnen PrPC-Isoformen im Liquor bei verschiedenen sCJK-Genotypen.	35

Abbildung 15: Vergleich der Isoform Zusammensetzung von Patienten mit bekanntem PRNP-Genotyp (MM, MV, VV an Codon-129) in der 2D-Gelelektrophorese mit dem PrP-spezifischen Antikörper 3F4.....	36
Abbildung 16: Statistische Auswertung einzelner PrPC-Isoformen bei bekanntem PRNP-Genotyp (MM, MV oder VV) nach 2D-Western Blot mit dem PrP-spezifischen Antikörper 3F4.....	38
Abbildung 17: Vergleich von PrPC-Isoformen aus Liquorproben von Kontroll-Patienten mit definiertem PRNP-Genotyp (MM, MV, VV an Codon-129) in der 2D-Gelelektrophorese mit dem PrP-spezifischen Antikörper SAF32.....	39
Abbildung 18: Statistische Auswertung der 2D-Gelelektrophorese von Kontroll-Patienten mit definiertem Genotyp an Codon-129.....	41
Abbildung 19: Vergleich der Isoform-Zusammensetzung zwischen PrPSc-Typ 1 und PrPSc-Typ 2 in der 2D -Gelelektrophorese mit dem PrP-spezifischen Antikörper SAF32.....	42
Abbildung 20: Statistische Auswertung der einzelnen PrP-Isoformen bei PrP-Typ 1 und PrP-Typ 2 im 2D -Western Blot.....	43
Abbildung 21: Vergleich des Ladungs-Isoform-Profiles von VV1 und VV2 in der 2D-Gelelektrophorese mittels des PrP-spezifischen Antikörpers SAF32.	44
Abbildung 22: Vergleich der PrPC-Isoform-Zusammensetzung im Liquor von Patienten mit sCJK, fCJK (E200K Mutation), und FFI mittels SAF32.....	45
Abbildung 23: Statistische Auswertung der 2D-Western Blot Analyse bei sCJK, fCJK und FFI-Patienten.....	47
Abbildung 24: Immunoblot mittels Ser43 P-PrP in Liquorproben von sCJK und Kontroll-Patienten.....	48
Abbildung 25: Immunoblot mittels Ser43 P-PrP in Liquorproben von fCJK (E200K) und Kontroll-Patienten.....	49
Abbildung 26: Detektion von PrPC-Isoformen mittels des P-PrP Ser43 Antikörpers in Kontroll und CJK-Liquorproben im 2D-Western Blot.	49
Abbildung 27: Alpha- und Beta-Cleavage des Prion Proteins in der Übersicht.	52

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über Erkrankungsalter, einzelne neurologische Symptome und mediane Überlebenszeit bei sporadischer, familiärer und new variant CJK.....	6
Tabelle 2: Klinische und apparative Diagnosekriterien und Leitfaden zur Klassifizierung einer sCJK	7
Tabelle 3: Verteilung des Genotyps an Codon-129 bei sCJK	10
Tabelle 4: Verteilung des Genotyps an Codon-129 in der Normalbevölkerung	11
Tabelle 5: Übersicht über die benutzten PrP-spezifischen Antikörper.....	19
Tabelle 6: zeitlicher Ablauf der Isofokussierung	22
Tabelle 7: Zeitlicher Ablauf des Immunoblots	24

8 Literaturverzeichnis

- Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC (1967): Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214, 764-6
- 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. *Lancet* 353, 1673-4
- Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse ME, Watt CJ, Udy HJ, MaWhinney S, Dunstan SP, Southwood TR, Wilesmith JW, et al. (1996): Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature* 382, 779-88
- 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. *Nat Med* 17, 175-8
- Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C (1986): Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46, 417-28
- Beringue V, Mallinson G, Kaisar 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, 2065-73
- Bessen RA, Marsh RF (1994): Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J virol* 68, 7859-68
- Borchelt DR, Scott M, Taraboulos A, Stahl N, Prusiner SB (1990): Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol* 110, 743-52
- Bosque PJ, Ryou C, Telling G, Peretz D, Legname G, DeArmond SJ, Prusiner SB (2002): Prions in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 3812-7
- Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A (2001): Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J biol chem* 276, 39145-9
- Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, et al. (1997): The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* 390, 684-7
- Brown P, Brandel J-P, Sato T, Nakamura Y, MacKenzie J, Will RG, Ladogana A, Pocchiari M, Leschek EW, Schonberger LB (2012): Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg Infect Dis* 18, 901-7

- Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992): Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356, 577-82
- Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993): Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73, 1339-47
- Cali I, Castellani R, Yuan J, Al-Shekhlee A, Cohen ML, Xiao X, Moleres FJ, Parchi P, Zou W-Q, Gambetti P (2006): Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease revisited. *Brain* 129, 2266-77
- Capellari S, Parchi P, Russo CM, Sanford J, Sy MS, Gambetti P, Petersen RB (2000): Effect of the E200K mutation on prion protein metabolism. Comparative study of a cell model and human brain. *Am J Pathol* 157, 613-22
- Castagna A, Camprostrini 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, 339-46
- Chazot G, Broussolle E, Lapras Cl, Blattler T, Aguzzi A, Kopp N (1996): New variant of Creutzfeldt-Jakob disease in a 26-year-old French man. *Lancet* 347, 1181-
- Colby DW, Zhang Q, Wang S, Groth D, Legname G, Riesner D, Prusiner SB (2007): Prion detection by an amyloid seeding assay. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 20914-9
- Colby DW, Giles K, Legname G, Wille H, Baskakov IV, DeArmond SJ, Prusiner SB (2009): Design and construction of diverse mammalian prion strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 20417-22
- Colby DW, Wain R, Baskakov IV, Legname G, Palmer CG, Nguyen H-OB, Lemus A, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (2010): Protease-sensitive synthetic prions. *PLoS Pathog* 6
- Colby DW, Prusiner SB (2011): Prions. *Cold Spring Harb perspect biol* 3, a006833
- Collinge J, Rossor M (1996): A new variant of prion disease. *Lancet* 347, 916-7
- Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF (1996): Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383, 685-90
- Collinge J, Whitfield J, McKintosh E, Beck J, Mead S, Thomas DJ, Alpers MP (2006): Kuru in the 21st century--an acquired human prion disease with very long incubation periods. *Lancet* 367, 2068-74
- Collins S, McLean CA, Masters CL (2001): Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *J Clin Neurosci* 8, 387-97
- Collins SJ, Sanchez-Juan P, Masters CL, Klug GM, van Duijn C, Pologgi 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, 2278-87
- Cousens SN, Vynnycky E, Zeidler M, Will RG, Smith PG (1997): Predicting the CJD epidemic in humans. *Nature* 385, 197-8
- Creutzfeldt HG (1920): Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. (Vorläufige Mitteilung). Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie 57 (1), 1-18
- De Michele G, Pocchiari M, Petraroli R, Manfredi M, Caneve G, Coppola G, Casali C, Saccà F, Piccardo P, Salvatore E, et al. (2003): Variable phenotype in a P102L Gerstmann-Straussler-Scheinker Italian family. *Can J Neurol Sci* 30, 233-6
- Deleault NR, Harris BT, Rees JR, Supattapone S (2007): Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 9741-6
- 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
- Donne DG, Viles JH, Groth D, Mehlhorn I, James TL, Cohen FE, Prusiner SB, Wright PE, Dyson HJ (1997): Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 13452-7
- 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, 9097-101
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Asher DM, Brown P, Diwan A, Hoffman P, Nemo G, Rohwer R, White L (1977): Precautions in medical care of, and in handling materials from, patients with transmissible virus dementia (Creutzfeldt-Jakob disease). *N Engl J Med* 297, 1253-8
- Gambetti P, Kong Q, Zou W, Parchi P, Chen SG (2003): Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull* 66, 213-39
- 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
- Gawinecka J, Nowak M, Carimalo J, Cardone F, Asif AR, Wemheuer WM, Schulz-Schaeffer WJ, Pocchiari M, Zerr I (2013): Subtype-specific synaptic proteome alterations in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J Alzheimers Dis* 37, 51-61
- Giannopoulos PN, Robertson C, Jodoin J, Paudel H, Booth SA, LeBlanc AC (2009): Phosphorylation of prion protein at serine 43 induces prion protein conformational change. *J Neurosci* 29, 8743-51

- Glasse R (1967): Cannibalism in the Kuru region of New Guinea. *Trans N Y Acad Sci* 29, 748-54
- Goldfarb LG, Petersen RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montagna P, Cortelli P, Julien J, Vital C, Pendelbury WW (1992): Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science* 258, 806-8
- Goldgaber D, Goldfarb LG, Brown P, Asher DM, Brown WT, Lin S, Teener JW, Feinstone SM, Rubenstein R, Kascsak RJ (1989): Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker's syndrome. *Exp Neurol* 106, 204-6
- Griffith JS (1967): Self-replication and scrapie. *Nature* 215, 1043-4
- Haraguchi T, Fisher S, Olofsson S, Endo T, Groth D, Tarentino A, Borchelt DR, Teplow D, Hood L, Burlingame A (1989): Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Arch Biochem Biophys* 274, 1-13
- Harris DA, Huber MT, van Dijken P, Shyng SL, Chait BT, Wang R (1993): Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry* 32, 1009-16
- Harris DA (2003): Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull* 66, 71-85
- 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, 1350-9
- Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schurmann P, Windl O, Brose N, Kretzschmar H (1999): Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci* 19, 8866-75
- Hill AF, Joiner S, Beck JA, Campbell TA, Dickinson A, Poulter M, Wadsworth JDF, Collinge J (2006): Distinct glycoform ratios of protease resistant prion protein associated with PRNP point mutations. *Brain* 129, 676-85
- Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM, Lakey JH (1995): Copper binding to the N-terminal tandem repeat region of mammalian and avian prion protein: structural studies using synthetic peptides. *Biochem Biophys Res Commun* 214, 993-9
- 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-Straussler syndrome. *Nature* 338, 342-5
- Hsiao K, Meiner Z, Kahana E, Cass C, Kahana I, Avrahami D, Scarlato G, Abramsky O, Prusiner SB, Gabizon R (1991): Mutation of the prion protein in Libyan Jews with Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med* 324, 1091-7

- 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, 382-3
- Jakob A (1921): Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde. (Spastische Pseudosklerose - Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 64 (1), 147-228
- Jimenez-Huete A, Lievens PM, 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, 1561-72
- Kaski D, Mead S, Hyare H, Cooper S, Jampana R, Overell J, Knight R, Collinge J, Rudge P (2009): Variant CJD in an individual heterozygous for PRNP codon 129. *Lancet* 374, 2128
- Kitamoto T, Ogomori K, Tateishi J, Prusiner SB (1987): Formic acid pretreatment enhances immunostaining of cerebral and systemic amyloids. *Lab Invest* 57, 230-6
- Koch TK, Berg BO, De Armond SJ, Gravina RF (1985): Creutzfeldt-Jakob disease in a young adult with idiopathic hypopituitarism. Possible relation to the administration of cadaveric human growth hormone. *N Engl J Med* 313, 731-3
- Kramer ML, Kratzin HD, Schmidt B, Romer A, Windl O, Liemann S, Hornemann S, Kretzschmar H (2001): Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J biol chem* 276, 16711-9
- Krasnianski A, Schulz-Schaeffer WJ, Kallenberg K, Meissner B, Collie DA, Roeber S, Bartl M, Heinemann U, Vargas D, Kretzschmar HA, et al. (2006): Clinical findings and diagnostic tests in the MV2 subtype of sporadic CJD. *Brain* 129, 2288-96
- Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ (1986a): Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* 122, 1-5
- Kretzschmar HA, Stowring LE, Westaway D, Stubblebine WH, Prusiner SB, Dearmond SJ (1986b): Molecular cloning of a human prion protein cDNA. *DNA* 5, 315-24
- Kretzschmar HA, Honold G, Seitelberger F, Feucht M, Wessely P, Mehraein P, Budka H (1991): Prion protein mutation in family first reported by Gerstmann, Straussler, and Scheinker. *Lancet* 337, 1160
- 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. *Eur J Neurosci* 25, 2649-55

- Kuwahara C, Takeuchi AM, Nishimura T, Haraguchi K, Kubosaki A, Matsumoto Y, Saeki K, Matsumoto Y, Yokoyama T, Itohara S, et al. (1999): Prions prevent neuronal cell-line death. *Nature* 400, 225-6
- Ladogana A, 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, 1586-91
- Lansbury PT, Jr., Caughey B (1995): The chemistry of scrapie infection: implications of the 'ice 9' metaphor. *Chem Biol* 2, 1-5
- Lawson VA, Collins SJ, Masters CL, Hill AF (2005): Prion protein glycosylation. *J Neurochem* 93, 793-801
- Liao YC, Lebo RV, Clawson GA, Smuckler EA (1986): Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications. *Science* 233, 364-7
- Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P (1986): Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 315, 997-991003
- Mange A, Beranger 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, 125-32
- Martins VR, Brentani RR (2002): The biology of the cellular prion protein. *Neurochem int* 41, 353-5
- Mastrianni JA (2010): The genetics of prion diseases. *Genet Med* 12, 187-95
- McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB (1983): A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35, 57-62
- McLennan NF, Brennan PM, McNeill A, Davies I, Fotheringham A, Rennison KA, Ritchie D, Brannan F, Head MW, Ironside JW, et al. (2004): Prion protein accumulation and neuroprotection in hypoxic brain damage. *Am J Pathol* 165, 227-35
- Medori R, Tritschler HJ, LeBlanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY, Xue R, Leal S, Montagna P, Cortelli P (1992): Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N Engl J Med* 326, 444-9
- Meyne F, Gloeckner SF, Ciesielczyk B, Heinemann 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, 863-73
- Mitteregger G, Vosko M, Krebs B, Xiang W, Kohlmansperger V, Nolting S, Hamann GF, Kretschmar HA (2007): The role of the octarepeat region in neuroprotective function of the cellular prion protein. *Brain Pathol* 17, 174-83

- Montagna P, Cortelli P, Avoni P, Tinuper P, Plazzi G, Gallassi R, Portaluppi F, Julien J, Vital C, Delisle MB, et al. (1998): Clinical features of fatal familial insomnia: phenotypic variability in relation to a polymorphism at codon 129 of the prion protein gene. *Brain Pathol* 8, 515-20
- Montagna P, Gambetti P, Cortelli P, Lugaresi E (2003): Familial and sporadic fatal insomnia. *Lancet Neurol* 2, 167-76
- Morel E, Fouquet S, Chateau D, Yvernault L, Frobert Y, Pincon-Raymond M, Chambaz J, Pillot T, Rousset M (2004): The cellular prion protein PrP^c is expressed in human enterocytes in cell-cell junctional domains. *J biol chem* 279, 1499-505
- Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B (1995): Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 14, 509-17
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE (1993): Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 10962-6
- 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. *J Neurochem* 81, 1092-101
- 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, 767-78
- Parchi P, Capellari S, Chen SG, Petersen RB, Gambetti P, Kopp N, Brown P, Kitamoto T, Tateishi J, Giese A, et al. (1997): Typing prion isoforms. *Nature* 386, 232-4
- 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, 224-33
- Parchi P, Zou W, Wang W, Brown P, Capellari S, Ghetti B, Kopp N, Schulz-Schaeffer WJ, Kretschmar HA, Head MW, et al. (2000): Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 10168-72
- Parchi P, Notari S, Weber P, Schimmel H, Budka H, Ferrer I, Haik S, Hauw J-J, Head MW, Ironside JW, et al. (2009a): Inter-laboratory assessment of PrP^{Sc} typing in creutzfeldt-jakob disease: a Western blot study within the NeuroPrion Consortium. *Brain Pathol* 19, 384-91
- Parchi P, Strammiello R, Notari S, Giese A, Langeveld JPM, Ladogana A, Zerr I, Roncaroli F, Cras P, Ghetti B, et al. (2009b): Incidence and spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease variants with mixed phenotype and co-occurrence of PrP^{Sc} types: an updated classification. *Acta Neuropathol* 118, 659-71

- Parchi P, Strammiello R, Giese A, Kretzschmar H (2011): Phenotypic variability of sporadic human prion disease and its molecular basis: past, present, and future. *Acta Neuropathol* 121, 91-9112
- Peters PJ, Mironov A, Peretz D, van Donselaar E, Leclerc E, Erpel S, DeArmond SJ, Burton DR, Williamson RA, Vey M, et al. (2003): Trafficking of prion proteins through a caveolae-mediated endosomal pathway. *J Cell Biol* 162, 703-17
- 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, 875-81
- Polymenidou M, Prokop S, Jung HH, Hewer E, Peretz D, Moos R, Tolnay M, Aguzzi A (2011): Atypical prion protein conformation in familial prion disease with PRNP P105T mutation. *Brain Pathol* 21, 209-14
- Poser S, Zerr I, Schulz-Schaeffer WJ, Kretzschmar HA, Felgenhauer K (1997): [The Creutzfeld-Jakob disease. A sphinx of current neurobiology]. *DMW* 122, 1099-105
- Poser S, Zerr I (2002): [Clinical aspects, diagnosis and therapeutic possibilities of human prion diseases]. *Internist (Berl)* 43, 731-7
- Prusiner SB (1982): Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216, 136-44
- Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG (1983): Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35, 349-58
- Prusiner SB (1991): Molecular biology of prion diseases. *Science* 252, 1515-22
- Prusiner SB (1994): Molecular biology and genetics of prion diseases. *Philos trans R Soc Lond B*, 343, 447-63
- Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L (1991): Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet* 49, 320-9
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K (1996): NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* 382, 180-2
- Rudd PM, Endo T, Colominas C, Groth D, Wheeler SF, Harvey DJ, Wormald MR, Serban H, Prusiner SB, Kobata A, et al. (1999): Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 13044-9
- Safar J, Wille H, Itri V, Groth D, Serban H, Torchia M, Cohen FE, Prusiner SB (1998): Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 4, 1157-65

- Sakaguchi S, Katamine S, Nishida N, Moriuchi R, Shigematsu K, Sugimoto T, Nakatani A, Kataoka Y, Houtani T, Shirabe S, et al. (1996): Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380, 528-31
- Schmitt-Ulms G, Legname G, Baldwin MA, Ball HL, Bradon N, Bosque PJ, Crossin KL, Edelman GM, DeArmond SJ, Cohen FE, et al. (2001): Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J Mol Biol* 314, 1209-25
- Schmitz M, Schlomm M, Hasan B, Beekes M, Mitrova E, Korth C, Breil A, Carimalo J, Gawinecka J, Vargas D, et al. (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* 31, 2024-31
- Schmitz M, Lullmann 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, 1177-88
- 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, 353-7
- Shorter J, Lindquist S (2005): Prions as adaptive conduits of memory and inheritance. *Nat rev. Genet* 6, 435-50
- Shyng SL, Huber MT, Harris DA (1993): A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 268, 15922-8
- Somerville RA, Chong A, Mulqueen OU, Birkett CR, Wood SC, Hope J (1997): Biochemical typing of scrapie strains. *Nature* 386, 564
- Sonati T, Reimann RR, Falsig J, Baral PK, O'Connor T, Hornemann S, Yaganoglu S, Li B, Herrmann US, Wieland B, et al. (2013): The toxicity of anti-prion antibodies is mediated by the flexible tail of the prion protein. *Nature* 501, 102-6
- Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB (1987): Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* 51, 229-40
- Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB (1993): Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32, 1991-2002
- 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, 1956-63

- Tanji K, Saeki K, Matsumoto Y, Takeda M, Hirasawa K, Doi K, Matsumoto Y, Onodera T (1995): Analysis of PrPc mRNA by in situ hybridization in brain, placenta, uterus and testis of rats. *Intervirology* 38, 309-15
- Tateishi J, Kitamoto T, Hoque MZ, Furukawa H (1996): Experimental transmission of Creutzfeldt-Jakob disease and related diseases to rodents. *Neurology* 46, 532-7
- Telling GC, Scott M, Mastrianni J, Gabizon R, Torchia M, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (1995): Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* 83, 79-90
- Telling GC, Parchi P, DeArmond SJ, Cortelli P, Montagna P, Gabizon R, Mastrianni J, Lugaresi E, Gambetti P, Prusiner SB (1996): Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science* 274, 2079-82
- Uro-Coste E, Cassard H, Simon S, Lugan S, Bilheude J-M, Perret-Liaudet A, Ironside JW, Haik S, Basset-Leobon C, Lacroux C, et al. (2008): Beyond PrP^{9res}) type 1/type 2 dichotomy in Creutzfeldt-Jakob disease. *PLoS Pathog* 4
- Vassallo N, Herms J (2003): Cellular prion protein function in copper homeostasis and redox signalling at the synapse. *J Neurochem* 86, 538-44
- Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE, Dyson HJ (1999): Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 2042-7
- Walmsley AR, Watt NT, Taylor DR, Perera WSS, Hooper NM (2009): alpha-cleavage of the prion protein occurs in a late compartment of the secretory pathway and is independent of lipid rafts. *Mol Cell Neurosci* 40, 242-8
- Wang F, Wang X, Ma J (2011): Conversion of bacterially expressed recombinant prion protein. *Methods* 53, 208-13
- Weise J, Sandau R, Schwarting S, Crome O, Wrede A, Schulz-Schaeffer W, Zerr I, Bahr M (2006): Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury. *Stroke* 37, 1296-300
- Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG (1996): A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* 347, 921-5
- Will RG, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Mitrova E, de Silva R, D'Alessandro M, Delasnerie-Laupretre N, Zerr I, et al. (1998): Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in six European countries, 1993-1995. EU Collaborative Study Group for CJD. *Ann neurol* 43, 763-7

- Wille H, Michelitsch MD, Guenebaut V, Supattapone S, Serban A, Cohen FE, Agard DA, Prusiner SB (2002): Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 3563-8
- 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, 244-52
- 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
- Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wuthrich K (2000): NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 145-50
- 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. *Electrophoresis* 23, 347-55
- 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, 38936-42
- Zerr I, Poser S (2002): Clinical diagnosis and differential diagnosis of CJD and vCJD. With special emphasis on laboratory tests. *APMIS : acta pathol microbiol immunol Scand* 110, 88-98
- 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, 2659-68
- Zerr I: Entzündliche und erregerbedingte Krankheiten. Creutzfeldt-Jakob-Krankheit; aus: Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie; hrsg. v. der Kommission "Leitlinien" der deutschen Gesellschaft für Neurologie; Thieme Verlag, Stuttgart, September 2012
- Zou W-Q, Capellari S, Parchi P, Sy M-S, Gambetti P, Chen SG (2003): Identification of novel proteinase K-resistant C-terminal fragments of PrP in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem* 278, 40429-36
- Zou W-Q, Puoti G, Xiao X, Yuan J, Qing L, Cali I, Shimoji M, Langeveld JPM, Castellani R, Notari S, et al. (2010): Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol* 68, 162-72

9 Anhang

Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ich danke Frau Professor Dr. med. I. Zerr für das Überlassen des Dissertationsthemas innerhalb der Prionforschungsgruppe und die viele Mühe bei der sehr hilfreichen Korrektur dieser Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Betreuer, Dr. rer. nat. Matthias Schmitz, für die großartige und sehr engagierte Betreuung während des gesamten Zeitraumes. Vielen Dank für die Ideen zur Durchführung, geduldige Beantwortung meiner Fragen, die stets motivierenden Worte und die sorgfältige Korrektur der Arbeit.

Ebenfalls besonders danken möchte ich Barbara Ciesielczyk, die mir als MTA in praktischen Anliegen im Labor Auskunft geben konnte und mir so in der praktischen Versuchsdurchführung immer eine große Hilfe war.

Dankend erwähnt seien auch die anderen Mitarbeiter der Arbeitsgruppe, die stets hilfsbereit zur Seite standen.

Lebenslauf

Mein Name ist Katharina Lüllmann, ich bin am 14. Februar 1984 als Tochter von Christina Röper und Manfred Lüllmann in Lüneburg geboren. Die allgemeine Hochschulreife erlangte ich 2003 am Kippenberg-Gymnasium in Bremen. Im elften Schuljahr verbrachte ich sechs Monate als Austauschschülerin in den USA.

Im April 2004 nahm ich mein Medizinstudium an der Charité Universitätsmedizin Berlin auf und wechselte nach dem Physikum an die Medizinische Fakultät der Georg-August - Universität Göttingen. 2007 verbrachte ich im Rahmen des ERASMUS Programmes ein Semester an der Universidade Lisboa in Lissabon, Portugal. Das Praktische Jahr absolvierte ich an der Kinderklinik des Städtischen Klinikums Oldenburg, am Zentrum für Innere Medizin des Kantonspitals Luzern, Schweiz, und in der chirurgischen Abteilung des Krankenhauses Northeim.

Nach Abschluss des Studiums im Oktober 2010 erlangte ich die Approbation als Ärztin. 2011 begann ich meine Weiterbildung im Bereich Pädiatrie am Krankenhaus Wurzen und arbeite seit 2012 als Assistenzärztin in der Abteilung für Kinderkardiologie des Herzzentrums Leipzig. Im Januar 2014 wurde mein Sohn Anton Ferdinand geboren.