

# **Einfluss einer Hochdruckbehandlung auf die Stabilität und Infektiosität von Prion-Proteinen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

**DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN**

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der  
Universität Karlsruhe (TH)  
vorgelegte

**DISSERTATION**

von

Diplom-Lebensmittelchemiker

**Philipp Heindl**

aus Ulm

Dekan: Prof. Dr. H. Puchta

Referent: Prof. Dr. A. Hartwig

Korreferent: Prof. Dr. M. Metzler

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2005



## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Andrea Hartwig für ihre freundliche Betreuung meiner Promotionsarbeit.

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Bernhard Tauscher für die Ermöglichung der Promotion an seinem Institut und für die umfangreiche und stets freundliche Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit bedanken.

Das gute Gelingen dieser Arbeit wäre ohne die hervorragende Zusammenarbeit mit Frau Dr. Avelina Fernández García nicht möglich gewesen. Dafür, und für ihre anregenden Fragen, Diskussionen und Ideen möchte ich ihr herzlich danken.

Die Untersuchungen an infektiösen Prionen wurden durch die erfolgreiche wissenschaftliche Kooperation mit Prof. Dr. Eberhard Pfaff (Institut für Immunologie des Bundesforschungsinstituts für Tiergesundheit, Tübingen) ermöglicht. Dafür und für die zahlreichen fachlichen Diskussionen und Anregungen ein großes Dankeschön.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Chemie und Biologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel für die gute Zusammenarbeit und die stets hervorragende und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Bei Prof. Dr. Mathias Büttner und Dr. Heiner Voigt möchte ich mich für die Durchführung der Tierversuche bedanken. Auch bei allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Immunologie des Bundesforschungsinstituts für Tiergesundheit möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein besonders großer Dank geht an meine Eltern, die mir den Weg zu dieser Arbeit ermöglicht haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Manuela für ihr Verständnis und ihre liebe Unterstützung über die ganzen Jahre hinweg bedanken. Schließlich möchte ich noch meinem kleinen Sohn Maurice für die allabendliche überschwängliche Begrüßung danken, die mir immer wieder neue Kraft für die Durchführung dieser Arbeit gab.

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>2</b>
2.1	Thematische Einführung .....	2
2.2	Hochdruck.....	4
2.2.1	Druckerzeugung .....	4
2.2.2	Thermodynamische und kinetische Effekte von Druck .....	6
2.2.3	Auswirkungen von Druck auf chemische Reaktionen .....	10
2.2.4	Auswirkungen von Druck auf die Proteinstruktur .....	11
2.2.5	Druckinduzierte Proteindenaturierung .....	15
2.3	Prionen .....	18
2.3.1	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien.....	18
2.3.2	Das Prionen-Modell .....	21
2.3.3	Prion-Protein-Isoformen.....	27
2.3.4	Inaktivierung infektiöser Prionen.....	32
<b>3</b>	<b>Fragestellung.....</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>41</b>
4.1	Umgang mit infektiösem Material .....	41
4.2	Aufarbeitung von infektiösem Material.....	42
4.2.1	Herstellung von Hamster-PrP <sup>Sc</sup> -Gehirnhomogenaten.....	42
4.2.2	Herstellung von Maus-PrP <sup>Sc</sup> -Gehirnhomogenaten .....	42
4.2.3	Herstellung von PrP27-30-Gehirnhomogenaten .....	43
4.2.4	Isolierung von PrP27-30 aus Gehirnen Scrapie erkrankter Hamster .....	43
4.3	Hochdruckbehandlung von infektiösem Material .....	45
4.3.1	Hochdruckapparatur .....	45
4.3.2	Hochdruckbehandlung von aufgearbeitetem infektiösem Material .....	46
4.3.3	Hochdruckbehandlung von Gehirnen Scrapie erkrankter Hamster.....	46
4.4	Immunologischer Nachweis infektiöser Prion-Proteine.....	47
4.4.1	Nachweis von PrP <sup>Sc</sup> und PrP27-30 in Hirnextrakten von Hamstern .....	47
4.4.2	Nachweis von PrP <sup>Sc</sup> in Hirnextrakten von Mäusen .....	49

---

4.4.3	Nachweis des isolierten PrP27-30 (iPrP27-30).....	50
4.5	Elektronenmikroskopischer Nachweis der Prionrods.....	51
4.6	Bioassays zur Infektiositätsbestimmung.....	52
4.6.1	Bioassays mit Syrischen Goldhamstern .....	52
4.6.2	Bioassays mit Tga20-Mäusen .....	53
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>56</b>
5.1	Hochdruckbehandlung von PrP <sup>Sc</sup> .....	56
5.1.1	Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von Hamster-PrP <sup>Sc</sup> .....	56
5.1.2	Einfluss von Hochdruck auf die Infektiosität von Hamster-PrP <sup>Sc</sup> .....	58
5.1.3	Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von Maus-PrP <sup>Sc</sup> .....	61
5.1.4	Einfluss von Hochdruck auf die Infektiosität von Maus-PrP <sup>Sc</sup> .....	62
5.2	Hochdruckbehandlung von PrP27-30.....	63
5.2.1	Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von PrP27-30 .....	63
5.2.2	Einfluss von Hochdruck auf die Infektiosität von PrP27-30.....	64
5.3	Hochdruckbehandlung von isoliertem PrP27-30 (iPrP27-30).....	66
5.3.1	Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von iPrP27-30 .....	66
5.4	Einfluss verschiedener Faktoren auf das Druckverhalten von PrP <sup>Sc</sup> .....	71
5.4.1	Einfluss der Temperatur und der Druckhaltezeit.....	71
5.4.2	Einfluss des Puffermediums .....	78
5.4.3	Einfluss der Homogenisierung infektiöser Gehirne .....	82
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>84</b>
6.1	Druckeffekte auf die Struktur infektiöser Prion-Proteine .....	86
6.1.1	Druckeffekte auf das native infektiöse Prion-Protein (PrP <sup>Sc</sup> ) .....	86
6.1.2	Druckeffekte auf das N-terminal verkürzte Prion-Protein (PrP27-30) .....	91
6.1.3	Druckeffekte auf das isolierte Prion-Protein (iPrP27-30) .....	92
6.1.4	Einflussfaktoren auf das Druckverhalten des infektiösen Prion- Proteins .....	95
6.1.5	Zusammenfassung der Druckeffekte auf das infektiöse Prion- Protein .....	98
6.2	Druckinaktivierung infektiöser Prion-Proteine .....	102

---

<b>7</b>	<b>Zusammenfassende Diskussion und Ausblick.....</b>	<b>107</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>127</b>
9.1	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen .....	127
9.2	Glossar .....	130
9.3	Liste der verwendeten Chemikalien .....	133
9.4	Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	135
9.5	Verwendete Lösungen und Puffer .....	137

---

## Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäurereste
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CD	Circulardichroismus
CJD/CJK	Creutzfeld-Jakob-Disease/Krankheit
CWD	Chronic Wasting Disease
ECL	Enhanced-Chemilumineszenz
fCJD	Familiäre CJD
FFI	Fatal Familiar Insomnia
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
FSI	Fatal Sporadic Insomnia
FT-IR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GdnSCN	Guanidinthiocyanat
GPI	Glykosyl-Phosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom
iCJD	iatrogen bedingte CJD
ID <sub>50</sub>	Infektiositätsdosis
iPrP27-30	isoliertes PrP27-30
kDa	Kilo Dalton
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis
MPa	Megapascal, 1 MPa = 10 bar
NaOCl	Natriumhypochlorit
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nvCJD	new variant Creutzfeld Jakob Disease (auch vCJD)

---

PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PK	Proteinase K
PRNP	Prion-Protein-Gen beim Menschen
Prnp	Prion-Protein-Gen beim Tier
Prnp <sup>0/0</sup>	Gentechnisch erwirkte Ablation von Prnp
PrP	Prion-Protein
PrP27-30	Infektiöser und Proteinase K-resistenter Teil des PrP <sup>Sc</sup> (Molekulargewicht von 27-30 kDa)
PrP33-35	Synonym für PrP (Molekulargewicht von 33-35 kDa)
PrP <sup>BSE</sup>	Prion-Protein-BSE
PrP <sup>C</sup>	zelluläres (normales) Prion-Protein (Prion-Protein-Cellular)
PrP <sup>res</sup>	Proteinase K-resistenter Teil von PrP <sup>Sc</sup> ; Synonym für PrP27-30
PrP <sup>Sc</sup>	pathogenes (fehlgefaltete) Prion-Protein (Prion-Protein-Scrapie)
PrP <sup>TSE</sup>	infektiöses Prion-Protein, Synonym für PrP <sup>Sc</sup>
PVDF	Polyvinylidendifluorid-Membran
recPrP	rekombinantes Prion-Protein
recSHaPrP 90-231	rekombinantes PrP des syrischen Goldhamsters (AS 90-231)
SAF	scrapie-associated fibrils
sCJD	sporadisch auftretende CJD
SDS	Natriumdodecylsulfat
TME	Transmissible Mink Encephalopathy
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien
wt-Mäuse	Wildtyp-Mäuse
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von hydrostatischem Hochdruck (100 bis 1000 MPa) auf die Stabilität und Infektiosität von Hamster-Prion-Proteinen untersucht. Die Studie sollte klären, inwieweit die Hochdrucktechnologie, die bereits zur Inaktivierung Lebensmittel relevanter pathogener Mikroorganismen eingesetzt wird, in der Lage ist Scrapie-Erreger zu inaktivieren. Daneben stellt die thermodynamische Variable Druck eine Möglichkeit dar, physikochemische Eigenschaften eines Proteins zu untersuchen, die mittels anderen Parametern, wie z.B. Temperatur, nicht möglich sind.

Im Vergleich zu den empfohlenen Dekontaminationsmethoden (Dampfsterilisation bei 133 °C für 20 min; einstündige Behandlung mit 1M Natronlauge) zeigte die Hochdruckbehandlung von mit Scrapie infizierten Hamstergehirnhomogenaten bei 800 MPa und Temperaturen deutlich unterhalb Sterilisationsbedingungen (60-80 °C) vergleichbare und zum Teil sogar bessere Inaktivierungsraten. Diese relativ milde Dekontaminationsmethode stellte sich somit nicht nur als Alternative zu den bisherigen Inaktivierungsmethoden heraus, sondern ist zudem auch weitaus materialchonender, wodurch sich eine Weiterverarbeitung von Risikomaterial ermöglichen könnte.

Da das Verhalten eines Proteins unter Druck durch dessen Konformation bestimmt wird, konnten im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich neue Kenntnisse über die komplexe Faltung der infektiösen Prion-Proteine gewonnen werden. Die Hochdruckbehandlung infektiöser Hamster-Prion-Proteine konnte Unterschiede in der thermodynamischen Stabilität verschieden aufgearbeiteter Prion-Proteine aufzeigen. Je nach Umgebungsbedingungen (pH-Bedingung, Salzkonzentration) und Aufarbeitung (Homogenisierung, Ultrazentrifugation) zeigte sich das Prion-Protein unterschiedlich druckstabil. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das Prion-Protein in unterschiedlich stabilen Konformationen vorliegen kann, die verschieden resistent gegenüber Inaktivierung sind. Zudem konnte die Bedeutung der Struktur des Prion-Proteins für dessen Infektiosität verdeutlicht werden. Da die Destabilisierung der Prion-Protein-Konformation zu einer Reduktion der Infektiosität führt, könnten durch genaue Kenntnisse über die Prion-Protein-Faltung optimale Inaktivierungsmethoden entwickelt werden.

---

## 2 Einleitung

### 2.1 Thematische Einführung

Als Erreger der Transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE), zu denen unter anderem BSE beim Rind, Scrapie beim Schaf und die Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJK) beim Menschen zählen, gelten fehlgefaltete Prion-Proteine. Ausgelöst werden diese übertragbaren, stets tödlich verlaufenden degenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems durch eine Isoform des zellulären Prion-Proteins PrP<sup>C</sup>. Diese fehlgefaltete, pathogene Isoform des Prion-Proteins wird als PrP<sup>Sc</sup> (auch PrP<sup>TSE</sup>) bezeichnet. Die Resistenz von PrP<sup>Sc</sup> gegenüber Proteasen sowie dessen Stabilität gegenüber Inaktivierungsmethoden, mit denen herkömmliche Krankheitserreger unschädlich gemacht werden können, stellt ein großes Problem für dessen Inaktivierung dar. So ist auch der Ausbruch der BSE-Epidemie in Europa auf die Verfütterung von ungenügend behandelten Tierkörpermehlen zurückzuführen (Prusiner 1997). Zu Beginn der siebziger Jahre reduzierte man in den britischen Tierkörperbeseitigungsanlagen bei der Herstellung von Tiermehl die Behandlungstemperaturen und -zeiten. Aufgrund dieser Umstellung des Herstellungsverfahrens von Tiermehl, bei welchem auch Schafskadaver verwendet wurden, erfolgte offensichtlich keine Inaktivierung des Scrapie-Erregers mehr, welchen man zuvor unwissentlich unschädlich gemacht hat. Um die daraus resultierende BSE-Epidemie einzudämmen, sind von der Europäischen Union umfangreiche Maßnahmen ergriffen worden, die das Risiko für den Verbraucher minimieren sollen. Zu den wichtigsten Punkten zählen dabei das Verbot der Verfütterung tierischer Proteine an lebensmittelliefernde Tiere, die Entfernung von Risikomaterial (Gehirn und Rückenmark) bei der Schlachtung sowie umfangreiche Überwachungs- und Kontrollprogramme. Derzeit existiert jedoch kein Verfahren, das sichere Lebensmittel aus als Nutztier gehaltenen Wiederkäuern (Rinder, Ziegen, Schafe), die mit Prionen verunreinigt sein könnten, gewährleistet. Die zurzeit gängigste Methode, um die Sicherheit von Lebensmitteln zufrieden stellend zu garantieren, liegt im Nachweis von ZNS-Kontaminationen in Fleisch und Fleischerzeugnissen. Da das Gehirn und Rückenmark BSE-erkrankter Tiere eine hohe Konzentration an infektiösen Prionen aufweisen, stellen Lebensmittel, die mit diesen Geweben verunreinigt sind, eine besonders hohe Gefahr für den Verbraucher dar.

---

Geeignete Inaktivierungsmethoden, wie z.B. Autoklavieren bei 133 °C für 20 min oder die Behandlung mit 1M Natronlauge oder starken Oxidationsmitteln sind aggressiv und führen zu einem starken Verlust an Qualität und Textur des zu behandelten Materials, der eine Weiterverarbeitung unmöglich macht. Ein mildes Verfahren zur Reduktion der Stabilität und Infektiosität von Prionen könnte dagegen eine Weiterverarbeitung ermöglichen und somit für sichere Lebensmittel sorgen und die Verbrauchersicherheit erhöhen. Solch ein mildes Verfahren stellt die Hochdrucktechnologie dar. Diese relativ neuartige Methode, die bereits bei der Haltbarmachung von Lebensmitteln Anwendung findet, weist mehrere Vorteile gegenüber den konventionellen Methoden wie z. B. die Behandlung mit Hitze, auf. So können beispielsweise unerwünschte Temperatureffekte wie Vitamin- und Nährstoffverlust und Änderungen in Geschmack, Textur und Farbe mit diesem schonenden Verfahren minimiert werden. Mit hydrostatischem Druck können somit qualitativ hochwertige, haltbare und mikrobiologisch einwandfreie Lebensmittel hergestellt werden.

Eine weitere Besonderheit von Hochdruck stellt dessen Fähigkeit dar, Proteinkonformationen so zu beeinflussen, dass es zur Umfaltung und Denaturierung von Proteinen kommt. Die daraus resultierenden Strukturänderungen unterscheiden sich dabei von temperatur- oder chemikalieninduzierten Änderungen, da bei der Druckdenaturierung von Proteinen in erster Linie nur Volumeneffekte eine Rolle spielen. Daher findet Hochdruck nicht nur als Verfahren zum Haltbarmachen von Lebensmitteln Anwendung, sondern auch als thermodynamischer Parameter zur Untersuchung von Proteinaggregationen und -faltungen.

## 2.2 Hochdruck

### 2.2.1 Druckerzeugung

Die Erzeugung von hydrostatischem Druck kann auf unterschiedlicher Weise erfolgen. Abbildung 2.1 zeigt schematisch, wie der Druck erzeugt und auf eine Probe übertragen werden kann. Eine Möglichkeit ist die Übertragung der mit einem Stempel mit der Basisfläche  $A$  erzeugten Kraft  $F$  auf ein druckübertragendes Medium  $M$  (Abb. 2.1a). Dabei setzt das im Behältervolumen eingeschlossene Medium die zunächst gerichtete Kraft in einen Druck vom Betrag  $F/A$  um. Im Idealfall wirkt der Druck dabei direkt und ohne Druckgradient auf die vom Druckmedium umschlossene Probe. Diese Bedingung ist bei fluiden Medien mit geringer Viskosität normalerweise gegeben. Eine weitere Möglichkeit zur Erzeugung von Druck ist, den außerhalb des Behälters erzeugten Druck mittels Leitungen in die Probenkammer und somit auf die Probe zu übertragen (Abb. 2.1b). Um Drücke von mehreren tausend bar zu erreichen, werden Druckübersetzer, die dem hydrostatischen Prinzip folgen, eingesetzt. Dabei wird im Druckübersetzer eine Fläche  $A_1$  mit dem Primärdruck  $p_1$  beaufschlagt. Die sich dadurch ergebende Kraft erzeugt auf der kleineren Fläche  $A_2$  einen dem Flächenverhältnis entsprechenden Übersetzungsdruck  $p_2$  (Sekundärdruck), der dann in die Probenkammer übertragen wird.

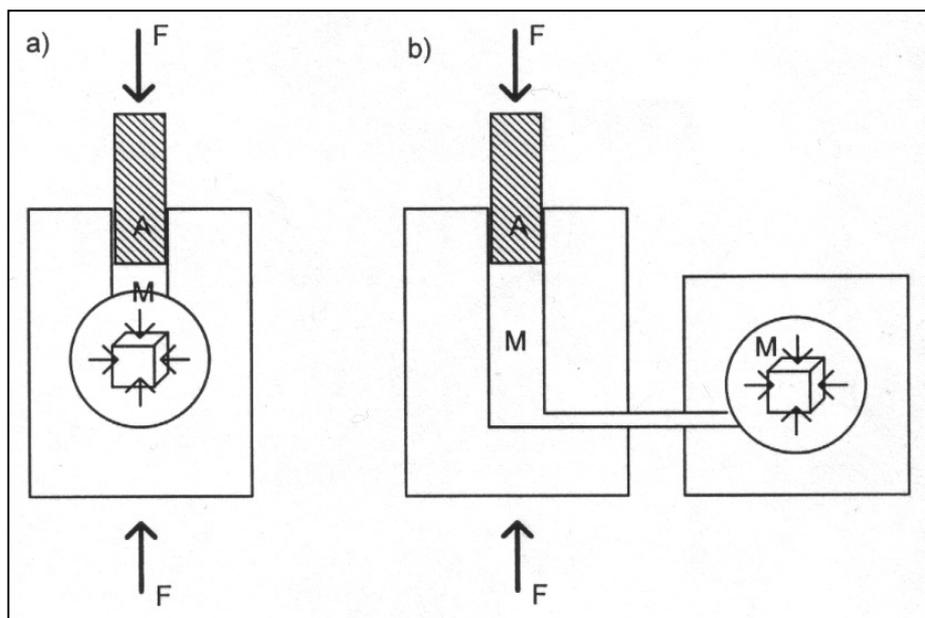


Abbildung 2.1: Druckaufbaumethoden (nach Ludwig 2000).

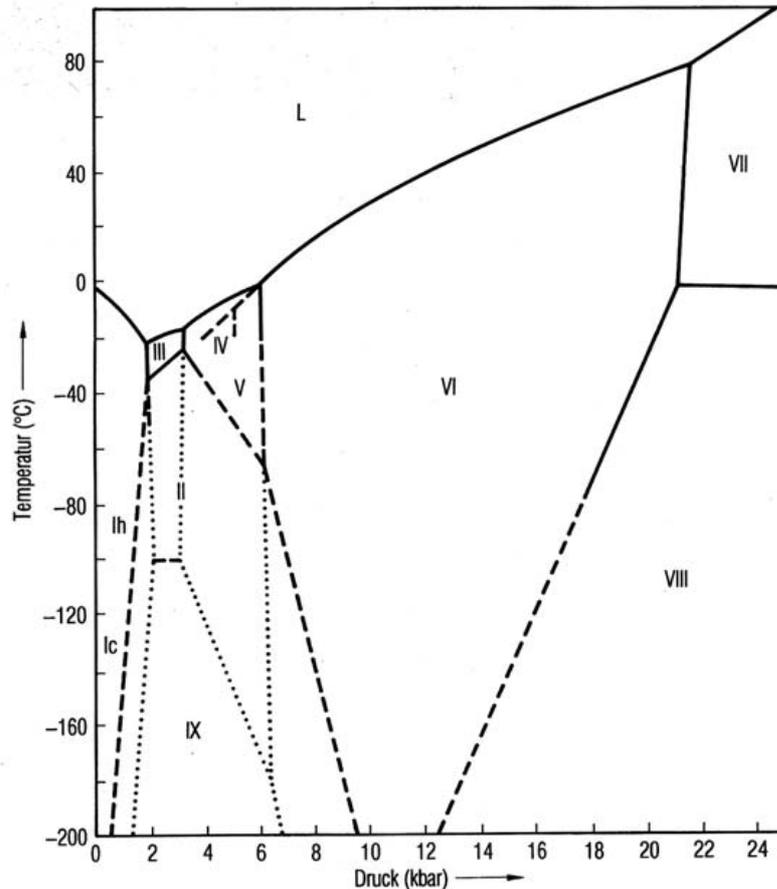
Abhängig von ihrer Kompressibilität wird die Probe unter Druck mehr oder weniger stark verdichtet. Der Probenbehälter muss die dafür notwendige Flexibilität besitzen. Eine flüssige Probe kann dabei selbst als druckübertragendes Medium fungieren, in diesem Fall kann auf die Verpackung verzichtet werden. Ist jedoch eine Verpackung der Probe notwendig, so muss diese wie der Probenbehälter über ausreichende Flexibilität verfügen. Die Volumenabnahme für eine wässrige Probe beträgt bei Raumtemperatur bei 1 kbar ca. 4 %, bei 6 kbar liegt sie bei ca. 15 % (Ludwig 2000). Bei diesen Drücken verschwinden gasgefüllte Hohlräume. Elastische Proben und Probenbehälter finden beim Entspannen wieder in ihre ursprüngliche Form und Größe zurück.

Um eine zufrieden stellende Übertragung des erzeugten Druckes auf die Probe sicherzustellen, sollte das druckübertragende Medium folgende Eigenschaften besitzen (Ludwig 2000):

- es sollte chemisch inert gegenüber allen Materialien, mit denen es in Berührung kommt sein.
- eine geringe Scherfestigkeit, bzw. niedrige Viskosität besitzen, wodurch ein homogener Druckaufbau und eine homogene Druckverteilung gewährleistet werden.
- über eine möglichst kleine Kompressibilität verfügen, um ein sicheres Arbeiten zu ermöglichen. Daher sind Gase aufgrund ihrer hohen Kompressibilität in Bezug auf Sicherheit weniger günstig als Flüssigkeiten.
- zudem sollten flüssige Druckmedien einen niedrigen Gefrierpunkt aufweisen, damit ein Festwerden des Mediums bei hohem Druck ausgeschlossen werden kann.

Flüssigkeiten, die die oben beschriebenen Eigenschaften besitzen und deswegen häufig verwendet werden, sind Mineralöle und ihre Mischungen mit Kerosin sowie Silikonöle. In der Lebensmitteltechnologie bietet sich Wasser als Medium an, da es für die Lebensmittelherstellung bzw. -verarbeitung zugelassen ist. Ein weiterer Punkt der für Wasser als Druckmedium spricht ist dessen besonderes Verhalten unter Druck, das an dessen Dichteanomalie liegt: Am Phasendiagramm von Eis (Abb. 2.2) erkennt man, dass es bei Raumtemperatur bis 10 kbar flüssig bleibt. Bei tieferen Temperaturen ist der Bereich kleiner, bei 0 °C bis 6,3 kbar und bei -22 °C bis 2,1

kbar. Weitere positive Eigenschaften von Wasser sind die geringe Druckabhängigkeit dessen Viskosität und die relativ kleine Kompressibilität im Vergleich zu anderen Flüssigkeiten. Um bestimmte Geräteteile wie z.B. Dichtungen jedoch nicht zu sehr durch das Wasser zu beanspruchen wird diesem häufig Glykol zugesetzt.



**Abbildung 2.2: Phasendiagramm von Eis.**

Das Diagramm zeigt die verschiedenen Modifikationen von Eis in Abhängigkeit vom Druck (L, flüssiges Wasser; Ih, hexagonales Wasser; II-IX, Kristallformen von Eis).

### 2.2.2 Thermodynamische und kinetische Effekte von Druck

In welche Richtung eine chemische Reaktion bevorzugt abläuft, ist durch das Minimum an Freier Enthalpie vorgegeben. Auf diese Weise stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Edukten und Produkten ein. Die Lage des Gleichgewichtes ist von der Temperatur, vom Druck und von der Konzentration der beteiligten Reaktionspartner abhängig (Schröter 1988). Mit der Veränderung dieser Parameter kann das Gleichgewicht in die gewünschte Richtung verschoben werden,

vorausgesetzt man kennt das Gleichgewicht und die entscheidenden Parameter. Der Einfluss, den diese Faktoren auf die Lage des chemischen Gleichgewichtes ausüben, unterliegt dem *Prinzip von LeChatelier und Braun*. Man bezeichnet diese allgemeine Gesetzmäßigkeit auch als *Prinzip des kleinsten Zwanges*:

*Wird auf ein im Gleichgewichtszustand befindliches System durch Änderung der äußeren Bedingungen ein Zwang ausgeübt, so verschiebt sich die Lage des Gleichgewichtes derart, dass der äußere Zwang vermindert wird.*

Nach diesem Prinzip wird das Gleichgewicht einer chemischen Reaktion unter erhöhtem Druck in die Richtung verschoben, in der das Reaktionsprodukt das kleinere Volumen einnimmt als die Summe der Volumina der Edukte. Das bedeutet, dass unter Druckeinfluss bevorzugt solche Reaktionen ablaufen, die mit einer Verringerung des Volumens einhergehen.

Thermodynamisch lässt sich die Druckbehandlung wie folgt betrachten:

Für einen einfachen Gleichgewichtsprozess



können die Änderung des Systems in der freien Enthalpie  $\Delta G$ , der inneren Energie  $\Delta U$ , des Reaktionsvolumens  $\Delta V$  und der Entropie  $\Delta S$  als eine Funktion der Temperatur  $T$  und des Druckes  $p$  ausgedrückt werden:

$$\Delta G = \Delta U + p\Delta V - T\Delta S \qquad \text{Gleichung 2.2}$$

Unter Voraussetzung einer isothermen Zustandsänderung (konstante Temperatur) und unter Annahme der Konvention, dass die Änderung des Reaktionsvolumens  $\Delta V$  gleich der Differenz zwischen Endvolumen  $V_B$  und dem Anfangsvolumen  $V_A$  ist, lautet die Gleichung 2.2:

$$\Delta V = V_B - V_A = \left( \frac{\partial \Delta G}{\partial p} \right)_T = -RT \left( \frac{\partial \ln K}{\partial p} \right)_T \quad \text{Gleichung 2.3}$$

In Gleichung 2.3 bedeutet  $R$  die allgemeine Gaskonstante ( $R = 8,3414510 \text{ J/mol K}$ ) und  $K$  die Gleichgewichtskonstante für die Gleichung 2.1.

Aus der Gleichung 2.3 lässt sich schließen, dass bei Vorgängen mit negativen Reaktionsvolumina die Produktbildung mit steigendem Druck begünstigt wird, bei Vorgängen mit einem positiven Reaktionsvolumen wird dagegen mit steigendem Druck die Eduktbildung begünstigt. So beträgt z.B. das Reaktionsvolumen für die Solvolyse von Wasser  $-22 \text{ cm}^3/\text{mol}$ , d.h. die Ionenbildung wird somit mit steigendem Druck gefördert.

Durch erhöhten Druck wird neben der Lage des Gleichgewichts einer chemischen Reaktion auch die Geschwindigkeit der Einstellung des Gleichgewichts beeinflusst. Gleichung 2.5 beschreibt den Zusammenhang zwischen der Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung und dem Druck.



$$\Delta V^\ddagger = V^\ddagger - V_A = \left( \frac{\partial \Delta G^\ddagger}{\partial p} \right)_T = -RT \left( \frac{\partial \ln k}{\partial p} \right)_T \quad \text{Gleichung 2.5}$$

In Gleichung 2.5 stehen  $\Delta G^\ddagger$  und  $\Delta V^\ddagger$  für die Änderung der freien Aktivierungsenthalpie bzw. des Aktivierungsvolumens  $k$  ist die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für eine Reaktion dargestellt in Gleichung 2.4.  $V^\ddagger$  kennzeichnet das Aktivierungsvolumen des aktivierten Systems,  $V_A$  ist das Volumen vor der Aktivierung.

Aus Gleichung 2.5 folgt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit einer chemischen Reaktion bei negativem Aktivierungsvolumen mit steigendem Druck beschleunigt wird. Eine Volumenänderung von beispielsweise  $-16 \text{ cm}^3/\text{mol}$  bedeutet bei

Raumtemperatur und bei einer Druckerhöhung von 1 kbar, etwa die Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit.

Die Gleichungen 2.3 und 2.5 sind die quantitative Fassung des *Prinzips nach LeChatelier und Braun* vom kleinsten Zwang. Demnach nehmen die Gleichgewichts- und Geschwindigkeitskonstanten mit dem Druck zu, wenn die betreffenden Vorgänge mit einer Volumenabnahme verknüpft sind.

Die hier aufgezeigten Gleichungen gelten streng genommen nur für einfache Reaktionssysteme und in ideal verdünnten Lösungen, welche die Bildung von Intermediärprodukten oder Reaktionen höherer Ordnung ausschließen. Anhand der thermodynamischen Betrachtungsweise lässt sich jedoch verdeutlichen, dass die Änderung des Druckes einen bedeutenden Einfluss auf chemische Reaktionen und deren Reaktionskinetiken haben kann.

Ein Effekt der bei Hochdruckexperimenten eine wichtige Rolle spielen kann und deswegen nicht außer Acht zu lassen ist, ist die Temperaturänderung innerhalb des druckübertragenden Mediums und der Probe beim Druckaufbau. Verantwortlich für diesen Effekt ist der thermische Ausdehnungskoeffizient, der das Ausmaß der adiabatischen Kompression folgendermaßen beschreibt:

$$\left(\frac{\partial T}{\partial p}\right)_{ad.} = \frac{\alpha T}{\rho c_p} \quad \text{Gleichung 2.6}$$

Dabei bedeutet  $\alpha$  den thermischen Ausdehnungskoeffizienten,  $T$  die absolute Temperatur,  $\rho$  die Dichte und  $c_p$  die Wärmekapazität bei konstantem Druck.

Hier nimmt das Wasser wiederum mit einem relativ kleinen Wert eine Sonderstellung ein, und auch hier ist diese Ausnahmerecheinung von Vorteil. Die Temperaturerhöhung ist von der Ausgangstemperatur abhängig, sie beträgt bei Wasser bei einer Ausgangstemperatur von 10 °C 2 K kbar<sup>-1</sup>, bei einer Ausgangstemperatur von 70 °C bereits 4 K kbar<sup>-1</sup> (Makita 1992). Andere Substanzen, z.B. Fette, führen zu wesentlich höheren Temperaturen. Bei n-Hexan kommt es bei einer Ausgangstemperatur von 18 °C zu einer Erhöhung um ca. 40 K kbar<sup>-1</sup>. Von diesem Temperatureffekt sind sowohl das druckübertragende Medium als auch die Probe

betroffen. Demnach erhält man die geringsten Temperaturerhöhungen für wässrige Medien und wässrige Proben. Ebenfalls zu berücksichtigen ist, dass beim Entspannen der umgekehrte Effekt auftritt, d.h. Medium und Probe kühlen sich entsprechend ab.

### 2.2.3 Auswirkungen von Druck auf chemische Reaktionen

Wird ein eingestelltes Gleichgewicht einer Reaktion durch äußeren Zwang wie erhöhten Druck beeinflusst, so reagiert das System mit einer Zwangsverminderung, bei Druck führt dies zu einer Volumenkontraktion. Folgende Faktoren spielen dabei eine entscheidende Rolle (Hamann 1980):

- Der intrinsische Volumenanteil  $\Delta\bar{V}_{intr}$  einer gelösten Spezies, bestimmt durch die Änderung von *van-der-Waals*-Radien. Dieser Anteil resultiert aus der Bewegung der Atomkerne der Reaktanden und den Änderungen der Bindungslängen und Bindungswinkel während der Bildung der Produkte.
- Der Solvatationsanteil  $\Delta\bar{V}_{solv}$  beschreibt die Volumenänderungen in Abhängigkeit von der veränderten Polarität, der Elektrostriktion und der Dipolinteraktionen mit dem Lösungsmittel während der Reaktion.
- Der Einfluss der Wechselwirkungen zwischen den gelösten Teilchen, kann in verdünnten Lösungen vernachlässigt werden.

Das Reaktionsvolumen besteht somit annäherungsweise aus der Summe des intrinsischen Volumenanteils und dem Volumenanteil der Solvatationshülle:

$$\Delta\bar{V} = \Delta\bar{V}_{intr} + \Delta\bar{V}_{solv} \quad \text{Gleichung 2.7}$$

Das Aktivierungsvolumen kann auf gleiche Art beschrieben werden:

$$\Delta V^\ddagger = \Delta V^\ddagger_{intr} + \Delta V^\ddagger_{solv} \quad \text{Gleichung 2.8}$$

Reaktionen bei denen die Solvatisierungsbeiträge zu vernachlässigen sind, werden  $\Delta V^\ddagger$  durch  $\Delta V^\ddagger_{intr}$  bestimmt. Dabei wird die Bildung einer kovalenten Bindung, die mit einer negativen Volumenänderung einhergeht unter Druck begünstigt, während Bindungsspaltungen zu einer positiven intrinsischen Volumenänderung führen und daher unter Druck gehindert werden. Aus diesem Grund ist es sehr unwahrscheinlich, dass unter Druck kovalente Bindungen gespalten werden.

Treten Ladungen im Übergangszustand oder in den gebildeten Produkten auf, so führen diese infolge von Wechselwirkungen mit der Solvatationshülle zu komplizierteren Verhältnissen. Bei Reaktionen mit starken Änderungen in der Polarität kann  $\Delta V^\ddagger_{solv}$  größer sein als  $\Delta V^\ddagger_{intr}$ . Solche polaren Reaktionen zeigen eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Lösungsmittelpolarität. Handelt es sich bei dem Lösungsmittel um Wasser, so werden die Ionen von den Wassermolekülen, die unter Druck komprimiert werden, umlagert. Daraus resultiert die Volumenabnahme. Diesen Vorgang nennt man Elektrostriktion.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Bindungsbildung, Ladungstrennung und die Konzentrierung von Ladungen sowie sterischer Zusammenhalt zu einer Volumenkontraktion führen. Bindungsspaltungen sowie Neutralisierungen und Delokalisierungen von Ladungen führen dagegen zu einer Volumenexpansion.

#### 2.2.4 Auswirkungen von Druck auf die Proteinstruktur

Die Konformation von Proteinen wird durch verschiedenartige chemischen Bindungen und Wechselwirkungen zwischen den Peptidketten, mit anderen Proteinen oder dem umgebenden Lösungsmittel stabilisiert. Dazu zählen:

- kovalente Bindungen (Peptidbindungen) zwischen den einzelnen Aminosäuren.
- Disulfidbrücken zwischen den einzelnen Peptidketten
- Wasserstoffbrückenbindungen
- elektrostatische Wechselwirkungen (Ionenbindungen)
- zwischenmolekulare Kräfte (van-der-Waals-Kräfte)
- hydrophobe Wechselwirkungen.

Unter Druck erleiden Proteine Veränderungen ihrer Struktur, die Auswirkungen sind dabei sehr vielschichtig. Die Bindungsarten und Wechselwirkungen unterscheiden

sich hinsichtlich ihrer Drucksensitivität. Im Folgenden wird die Wirkung hydrostatischen Hochdrucks auf die in Proteinen vorkommenden Wechselwirkungen beschrieben (zusammengefasst in Mozhaev et al. 1994):

**Kovalente Bindungen** können durch Druckeinfluss nicht gespalten werden, da deren Austausch (z.B.  $A-B + C-D \leftrightarrow A-C + B-D$ ) ein  $\Delta\bar{V} \approx 0$  aufweist und deren Aufbrechen eine Volumenzunahme bewirken würde.

**Wasserstoffbrückenbindungen** werden unter Druck stabilisiert. Die Formation neuer Wasserstoffbrückenbindungen ist mit keiner Volumenverminderung verbunden, so dass dies unter erhöhtem Druck nicht beobachtet werden kann. Der Austausch von *Protein-Protein*-Wasserstoffbrückenbindungen durch *Protein-Wasser*-Wasserstoffbrückenbindungen und ihre vermeintliche Zerstörung ist ebenfalls mit keiner ausschlaggebenden Volumenabnahme verbunden ( $\Delta\bar{V} \approx 0$ ).

Auf bestehende **elektrostatische Wechselwirkungen** wirkt eine Druckerhöhung destabilisierend, da die Hydratisierung von geladenen Aminosäureseitenketten, ebenso die Dissoziation eines Moleküls in geladene Teilchen und anschließender Hydratisierung zu einer Volumenverminderung führt ( $\Delta\bar{V} = -10-20 \text{ mlmol}^{-1}$  in Wasser, van Eldik et al. 1989). Die Ausbildung einer Ionenbindung in Wasser geht jedoch mit einer Volumenerhöhung von  $10-20 \text{ mlmol}^{-1}$  einher (van Eldik et al. 1989), so dass dies unter Druck nicht begünstigt wird.

Die Neuformation **hydrophober Bindungen** wird aufgrund eines positiven  $\Delta\bar{V}$  von  $10-20 \text{ mlmol}^{-1}$  unter Druck nicht gefördert (van Eldik et al. 1989). Dagegen zeigt die Stapelung aromatischer Ringe eine negative Volumenänderung auf, so dass es unter Druck zu dieser kommen kann und diese auch stabilisiert wird.

**Tabelle 2.1: Übersicht über die Wirkung von Druck auf intra- und intermolekulare Wechselwirkungen.**

Bindungsart / Wechselwirkung	Formation unter Druck	Druck wirkt stabilisierend	Druck wirkt destabilisierend
kovalente	•	•	
Wasserstoffbrücken		•	
elektrostatische			•
hydrophobe			•

Das Verhalten von Proteinen unter Druck ist Gegenstand vieler wissenschaftlicher Arbeiten und wurde in zahlreichen Artikeln zusammengefasst (Heremans 1982, Silva und Weber 1993, Balny und Masson 1993, Gross und Jaenicke 1994, Mozhaev 1996, Lange 2002, Royer 2002, Balny 2004). Ein kurzer Überblick über die Auswirkung von Druck auf die Proteinkonformation soll veranschaulichen, welche Strukturen inwieweit beeinflusst werden können.

Die **Primärstruktur** von Proteinen wird durch die Sequenz von Aminosäuren, die über kovalente Bindungen (Peptidbindungen) miteinander verknüpft sind, bestimmt. Da kovalente Bindungen unter Druck äußerst stabil sind, zeichnet sich diese Proteinstruktur als sehr druckresistent aus. Im Gegensatz zur Temperatur sind Bindungsbrüche unter Druck nur bei extremen Bedingungen (sehr hohe Drücke in Verbindung mit hohen Temperaturen) zu erreichen. Die **Sekundärstruktur** entsteht durch Wechselwirkungen über kurze Distanz (z.B. Wasserstoffbrückenbindungen), die bestimmte Anordnungsmuster der Kette bewirken ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt, Turns). Sie weist ebenfalls eine sehr hohe Druckresistenz auf, erst ab 300-700 MPa sind Effekte zu sehen, die meist in eine irreversible Denaturierung enden. Dabei stellte sich die  $\beta$ -Faltblattstruktur als nahezu inkompressibel und damit deutlich stabiler als die  $\alpha$ -helikale Struktur heraus (Gross und Jaenicke 1994). Die **Tertiärstruktur** beschreibt die Anordnung der Sekundärstrukturelemente innerhalb eines Moleküls. Wechselwirkungen (Disulfidbrückenbindungen, elektrostatische und hydrophobe) erstrecken sich hier über ganze Domänen. Die schwächsten nicht-kovalenten Bindungen zwischen Aminosäureresten, welche die Tertiärstruktur stabilisieren, werden als erstes unter Hochdruck destabilisiert, dazu zählen z.B. London-Dispersionskräfte. Dabei kommt es zur Ausbildung von Wasser-Protein-Interaktionen, die ein geringeres Volumen einnehmen (Weber 1993). Reversible Änderungen der Tertiärstruktur in Proteinen sind bereits ab 200 MPa zu beobachten. Bei kleineren Proteinen und Monomeren sind jedoch 400 MPa für die Beeinflussung ihrer Tertiärstruktur von Nöten (Gross und Jaenicke 1994). Die **Quartärstruktur** basiert auf Interaktionen zwischen individuellen Ketten und wird durch intermolekulare elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Diese Strukturanordnung kann bereits durch sehr niedrige Drücke destabilisiert werden. So können beispielsweise Drücke von 50-200 MPa die Dissoziation oligomerer Proteine in ihre Untereinheiten induzieren (Silva und Weber 1993). Die

druckinduzierte Dissoziation von Oligomeren weist die Besonderheit auf, dass die Untereinheiten in ihrer nativen Form vorliegen, was nach einer thermischen Behandlung oder einer mit Chemikalien induzierten Dissoziation nicht der Fall ist (Mozhaev et al. 1996). Nach der Dissoziation können die Untereinheiten Aggregate bilden. Bei Drücken oberhalb 200 MPa beginnen sich die Ketten zu entfalten, und die dissoziierten Untereinheiten von Oligoproteinen verbinden sich wieder.

**Tabelle 2.2: Übersicht über die Wirkung von Druck auf Proteinstrukturen (nach Balny 2004).**

Struktur	Druck	Wirkung
Sekundärstruktur	> 300-700 MPa	irreversible Proteindenaturierung
Tertiärstruktur	400-800 MPa	reversible Auffaltung von Proteinen
Quartärstruktur	< 150-200 MPa > 150-200 MPa	Dissoziation oligomerer Proteine Auffaltung von Proteinen Umlagerung von Untereinheiten Reassoziations Subunits oligomerer Proteine

Maßgebend für die native Struktur eines Proteins ist das Gleichgewicht von stabilisierenden und destabilisierenden Interaktionen zwischen den Polypeptidketten und dem Lösungsmittel. Hydrostatischer Hochdruck wirkt als thermodynamischer Parameter, der das Gleichgewicht der inter- und intramolekularen Wechselwirkungen der Polypeptidketten (sowohl stabilisierende als auch destabilisierende) und die Wechselwirkungen zwischen Lösungsmittel und Protein stört. Am stärksten wird dabei die Hydratisierung der einzelnen Komponenten (Protein, Peptidketten, Lösungsmittel) im gesamten System beeinflusst. Letztendlich kommt es unter Druck zur Spaltung und Neuformation nicht-kovalenter Bindungen, die zu Änderungen der Hydratisierung und Konformation der Proteine führt. Die Komprimierbarkeit eines Proteins wird hauptsächlich durch die Kompression der internen Hohlräume, die aufgrund mangelhafter Packung der Aminosäureseitenketten entstehen, bestimmt (Balny und Masson 1993). Weitere Volumenanteile die bei der Kompression von Proteinen eine Rolle spielen sind der Anteil der beteiligten Atome und der der Solvatationshülle (Gross und Jaenicke 1994). Hydrostatischer Hochdruck induziert entweder lokale oder globale Änderungen der Proteinstruktur die zu einer reversiblen oder irreversiblen Denaturierung führen können.

### 2.2.5 Druckinduzierte Proteindenaturierung

Bei der Denaturierung von Proteinen kommt es zu einer partiellen oder vollständigen, reversiblen oder irreversiblen Änderung der nativen Konformation, die ohne Lösung von kovalenten Bindungen (außer Disulfidbindungen) erfolgt. Alle Einflüsse die Wasserstoffbrückenbindungen, Ionenbindungen oder hydrophobe Bindungen lösen können, führen zu einer Änderung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur und somit zur Denaturierung des Proteins. Faktoren die eine Denaturierung auslösen können sind z.B. Temperatur- und pH-Änderungen, organische Lösungsmittel, Salze, Harnstoff, Guanidinhydrochlorid oder Detergentien. Ob die Veränderungen reversibler oder irreversibler Natur sind, hängt davon ab, inwieweit die aufgefalteten Strukturen durch die Wechselwirkungen mit anderen Peptidketten (z.B. durch Ausbildung neuer Disulfidbindungen) stabilisiert werden (Belitz und Grosch 1992).

Durch die Entfaltung der Aminosäureketten während der Proteindenaturierung kommt es zu einer Änderung der sterischen Anordnung des Proteins, wodurch die Funktionalität des Proteins verloren geht. Da die gefaltete native Konformation des Proteins mehr Volumen einnimmt als die ungefaltete denaturierte, wird dieser Prozess unter Druck begünstigt. Während der Denaturierung verschwinden wassergefüllte Hohlräume, dadurch können Aminosäureketten besser gepackt, und der Volumenbedarf des Proteins gesenkt werden (Mozhaev et al. 1996). Die Umfaltung der Peptidketten kann zuvor im Innern gelegene Seitenketten und Aminosäurereste freilegen und somit für das Lösungsmittel zugänglich machen. Die dadurch ermöglichten neuen Interaktionen zwischen dem Lösungsmittel, in der Regel Wasser, und dem Protein führen zu einer Reduktion der Protein-Protein- und Wasser-Wasser-Wechselwirkungen, was mit einer weiteren Volumenabnahme einhergeht (Royer et al. 1995). Die aus der Hydratisierung der freigelegten Aminosäureresten resultierende Volumenvergrößerung der Protein-Hydratationshülle wird durch die Volumenminderung die durch die Zerstörung interner Hohlräume und die mit der Spaltung und Neuformation nicht-kovalenter Bindungen verbundene Änderung der Konformation kompensiert, so dass der Unterschied zwischen dem Volumen des nativen und dem des denaturierten Proteins letztendlich nur 2 % beträgt (Silva und Weber 1993).

Die Denaturierung der Proteine unter Hochdruck ist abhängig von der Temperatur. Das in Abbildung 2.3 dargestellte pT-Phasendiagramm von single-chain Proteinen verdeutlicht das Denaturierungsverhalten von Proteinen unter Druck. Die Druck-

---

Temperaturabhängigkeit kann in diesem Fall als ein 2-Komponenten-System (nativ  $\leftrightarrow$  denaturiert), wie erstmals von Suzuki 1960 beschrieben und von Hawley 1971 am Beispiel von Chymotrypsinogen gezeigt, betrachtet werden. Demnach nimmt mit zunehmendem Druck die Denaturierungstemperatur zunächst bis zur maximal möglichen Übergangstemperatur ( $\Delta\bar{V} = 0$ ) zu. Von da an werden bei gegebenem Druck niedrigere Temperaturen zur Denaturierung des Proteins benötigt. Bei dem maximal möglichen Übergangsdruck ( $\Delta\bar{S} = 0$ ) ändert  $\Delta S$  das Vorzeichen, so dass von diesem Punkt an bei niedrigeren Drücken und sinkender Temperatur das Protein denaturiert wird. Aus dieser angenäherten ellipsoiden Form der Funktion wird ersichtlich, dass Proteine sowohl heiß als auch kalt denaturiert werden können. Bei bestimmten hohen Temperaturen, kann die freie Enthalpie  $\Delta G$  der Denaturierung bei Erhöhung des Druckes positiv werden und somit in einen energetisch ungünstigen Bereich kommen. Das bedeutet, dass bei höherer Temperatur Hochdruck vor Hitzedenaturierung schützt. Andersherum schützt bei niedrigen Temperaturen eine Erhöhung der Temperatur vor einer Druckdenaturierung. Bei der Kältedenaturierung kommt es unter hohem Druck bereits bei niedrigen Temperaturen zur Entfaltung der Peptidketten. Das Phänomen der Druckdenaturation von Proteinen wurde bereits 1914 von Bridgeman entdeckt, als er Eiweiß durch Druck koagulierte und somit die Grundlage zur Untersuchung von Proteinen unter Hochdruck lieferte.

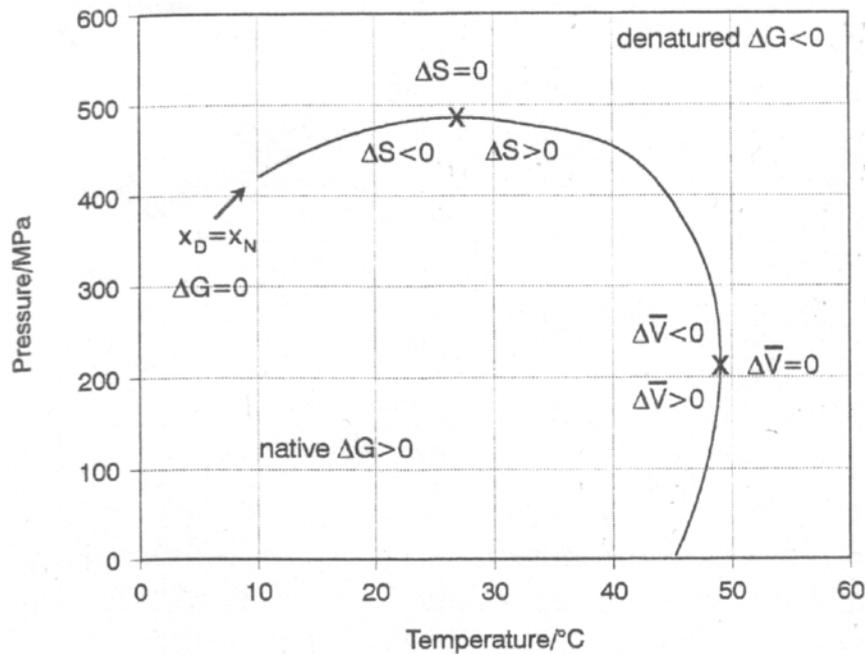


Abbildung 2.3: pT-Phasendiagramm von Proteinen (nach Suzuki 1960, Hawley 1971).

Die Druckdenaturierung von Proteinen ist neben der Temperatur auch abhängig von der Zusammensetzung des Lösungsmittels, wie z.B. dem Salzgehalt und dem pH-Wert. Extreme Effekte sind bei stark erniedrigter Wasseraktivität zu erwarten. So wird z.B. bei Proteinen im trockenen oder kristallinen Zustand kaum eine Denaturierung beobachtet.

Druckdenaturierte Proteine weisen starke Ähnlichkeiten mit Molten Globules auf (Ptitsyn 1992, Silva und Weber 1993). Beide bewahren einen Großteil ihrer Sekundärstruktur, zudem sind ihre hydrodynamischen Radien um 10-20 % größer, als die der nativen Proteine. Das Molten Globule („geschmolzenes Kügelchen“) ist ein Modell zur Beschreibung von Proteine, das ein Faltungsintermediat voraussagt, den so genannten *Molten Globule*, den man kinetisch und thermodynamisch als eine expandierte Form des gefalteten, nativen Zustands charakterisiert hat (Dill 1985).

Der bedeutendste Unterschied zwischen Temperatur- und Druckdenaturierung liegt darin, dass es unter Druck zu keiner Änderung der chemischen Struktur kommt, dies ist besonders bei der Hochdruckbehandlung von Lebensmitteln hinsichtlich der Farbe, des Aromas und Geschmacks von Bedeutung.

## 2.3 Prionen

### 2.3.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind stets tödlich verlaufende, neurodegenerative Erkrankungen, die sowohl beim Tier als auch beim Menschen auftreten und durch Prionen ausgelöst werden (Prusiner et al. 1998, Belay 1999, Collinge 2001). Sie nehmen in der Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen, die mit der Ablagerung amyloider Aggregate einhergehen, eine Sonderstellung ein. Im Gegensatz z.B. zur Alzheimerschen Krankheit oder Chorea Huntington, treten TSEs nicht nur sporadisch oder genetisch bedingt auf, sondern können außerdem durch Infektionen hervorgerufen werden.

Gemeinsames Charakteristikum aller Prion-Krankheiten sind Läsionen mit ausgedehnten Proteinablagerungen im Gehirn der erkrankten Individuen. Histopathologische Befunde sind neben einer abnormalen Vermehrung der Astrozyten (Astrogliose) auch die durch Vakuolisierung des Neuropils hervorgerufenen schwammartigen (spongiforme) Läsionen im Bereich der grauen Hirnsubstanz (DeArmond und Ironside 1999). In der Nähe von Neuronen kann es zudem zu einer Anreicherung diffuser Proteinablagerungen des Prion-Proteins (PrP) in Form amyloider Plaques kommen (Belay 1999). Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium findet man im ZNS die höchste Infektiosität. Aber auch in einigen anderen Organen konnte Infektiosität in Abhängigkeit von der jeweiligen TSE und betroffenen Spezies nachgewiesen werden (Belay 1999, Hörnlimann 2001, Dormont 2002). Nach einer langen Inkubationszeit (mehrere Monate bis mehrere Jahrzehnte, abhängig von der Infektionsroute) kommt es durch die Neurodegeneration zu Bewegungs- und Koordinationsstörungen (Ataxien), die mit zunehmender Demenz einhergehen. Prion-Krankheiten enden immer tödlich, wobei vom Beginn der ersten Symptome bis zum Tod mehrere Monate bis zu 1-2 Jahre vergehen können. Da der Erreger nicht als körperfremd erkannt wird, kommt es im betroffenen Individuum zu keiner spezifischen Immunreaktion. Aufgrund dieser Tatsache ist eine gesicherte Diagnose erst post-mortem möglich. Zudem existieren zurzeit keine geeigneten Therapie- oder Impfmöglichkeiten. Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über die wichtigsten Prion-Krankheiten mit ihrem Ursprung.

**Tabelle 2.3 Prion-Krankheiten (nach Prusiner 1998).**

Krankheit	Wirt	Manifestation
Kuru	Mensch	Infektion durch rituellen Kannibalismus
iatrogene Creutzfeld-Jakob-Krankheit (iCJD)	Mensch	Infektion durch kontaminierte Wachstumshormone, Transplantate, Operationsbesteck, etc.
neue Variante der Creutzfeld-Jakob-Krankheit (vCJD)	Mensch	Infektion durch BSE ?
spontane Creutzfeld-Jakob-Krankheit (sCJD)	Mensch	Somatische Mutation oder spontane Konversion von PrP <sup>C</sup> in PrP <sup>Sc</sup> ?
familiäre Creutzfeld-Jakob-Krankheit (fCJD)	Mensch	Keimbahnmutation im PrP-Gen
Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS)	Mensch	Keimbahnmutation im PrP-Gen
Fatale familiäre Insomnie (FFI)	Mensch	Keimbahnmutation im PrP-Gen
Fatale sporadische Insomnie (FSI)	Mensch	Somatische Mutation oder spontane Konversion von PrP <sup>C</sup> in PrP <sup>Sc</sup> ?
Scrapie	Schaf, Moufflon, Ziege	Infektion in (genetisch bedingt) anfälligen Schafen
Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE)	Rind	Infektion durch kontaminiertes Tiermehl
Transmissible Nerz Enzephalopathie (TME)	Nerz	Infektion durch kontaminierte Rinderprodukte oder Tiermehl
Chronische Auszehrungs Krankheit (CWD)	Hirsch, Elch	unbekannt
Feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)	Katze	Infektion durch kontaminierte Rinderprodukte oder Tiermehl
Exotische Huftier Enzephalopathie	Antilope	Infektion durch kontaminiertes Tiermehl

Bereits im 18. Jahrhundert wurde in Großbritannien zum ersten Mal über die Traberkrankheit (Namensgebung aufgrund Koordinationsstörungen beim Laufen) bei Schafen berichtet (McGowan 1922). Auf Grund eines intensiven Juckreizes kratzten sich die Schafe ihre Wolle ab (engl.: *to scrape* – kratzen, daher die englische Bezeichnung: *Scrapie*). Der infektiöse Charakter von Scrapie wurde 1936 nachgewiesen, indem man gesunden Schafen Hirnmaterial von an Scrapie erkrankten Schafen intraokular injizierte und diese daraufhin an Scrapie erkrankten (Cuillé und Chelle 1936). Der natürliche Übertragungsweg scheint die orale Aufnahme infizierten Plazentamaterials durch gesunde Schafe zu sein (Pattison und Millson 1961). 1961 konnte die Übertragbarkeit des Scrapie-Erregers über Artengrenzen hinweg gezeigt werden, indem es gelang Mäuse mittels intrazerebraler Inokulation mit Scrapie zu infizieren (Chandler 1961). 1975 gelang dies Marsh und Kimberlin ebenfalls für den Syrischen Goldhamster. Diese auf Maus- bzw. Hamster-adaptierten Scrapie-Erreger werden heute meist als Modellsysteme in der Forschung verwendet.

Anfang der 20iger Jahre erschienen die ersten Berichte von einer TSE-Erkrankung beim Menschen. Hans Creutzfeld und Alfons Jakob beschrieben unabhängig

voneinander Patienten mit einem seltenen Syndrom, der *Spastischen Pseudosklerose* (Creutzfeld 1920, Jakob 1921). Später wurde diese Krankheit nach ihren Entdeckern Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJK, *engl.* CJD) genannt. Der infektiöse Charakter menschlicher Prion-Krankheiten wurde erstmalig für die Kuru-Krankheit einige Jahrzehnte später beschrieben (Zigas und Gajdusek 1957). Diese Krankheit trat bei den Fore, einen Volksstamm in Papua-Neuguinea auf, bei dem es bei kannibalischen Riten zum Verzehr von Hirnen verstorbener Angehöriger kam. Klatzo et al. beschrieb 1959 neuropathologische Ähnlichkeiten sowohl zwischen Kuru und Scrapie als auch zwischen CJD und Kuru.

Die häufigste beim Menschen auftretende Prion-Krankheit ist die Creutzfeld-Jakob-Krankheit. Sie tritt in 85 % aller Fälle sporadisch (sCJD), d.h. ohne erkennbare Infektion oder Genmutation auf (Palmer und Collinge 1993). In 5-15 % konnte eine genetische (fCJD) und in weniger als 1 % der Fälle eine infektiöse (iCJD) Korrelation nachgewiesen werden (zusammengefasst in Belay 1999). Letztere wurde durch unzureichend sterilisierte neurochirurgische Instrumente bei Operationen oder durch kontaminierte Dura-Mater-Transplantate oder Wachstumshormone übertragen.

Aufsehen erregte in den letzten Jahren das Auftreten einer bis dato unbekanntes Prion-Krankheit bei Rindern, die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE), im Volksmund auch „Rinderwahnsinn“ genannt. Im Jahre 1985 trat der erste Fall der neuen TSE-Erkrankung in Großbritannien auf (Wells et al. 1987). Höhepunkt der BSE-Epidemie war 1992/1993 mit schätzungsweise 200.000 erkrankten Rindern in Großbritannien und einige Tausende in anderen europäischen Ländern und in Japan (Brown et al. 2001). Als Ursache der BSE-Epidemie wird heute hauptsächlich der Scrapie-Erreger diskutiert (Wilesmith und Wells 1991). Als Verbreitungsweg der Erreger gilt die Verfütterung von kontaminiertem Tiermehl, das aus Schafen hergestellt wurde, von denen einige mit Scrapie infiziert waren, an Wiederkäuern. Es gilt als am Wahrscheinlichsten, dass die Umstellung in der Tiermehlproduktion Ende der 70er Jahre in Großbritannien zur Übertragung des Scrapie-Erregers auf Rinder führte. Aus ökonomischen Gründen wurde die Temperatur beim Herstellungsprozess gesenkt, auf diese Weise konnte der Erreger, der zuvor unwissentlich unschädlich gemacht wurde, nicht mehr ausreichend inaktiviert werden (Prusiner 1997). Nach dem Verbot der Verfütterung von Tiermehl an Wiederkäuer ging die Zahl der BSE-Fälle pro Jahr in Großbritannien seit 1992 kontinuierlich zurück. Seit 2000 sind in Deutschland 383 Rinder positiv auf BSE getestet worden (Bundesministerium für

Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Stand 17.10.05). Parallel zu BSE traten TSEs bei verschiedenen Zootieren und bei Katzen auf, die sehr wahrscheinlich auch auf die Verfütterung von kontaminiertem Tiermehl zurückzuführen sind (Wells und McGill 1992, Schreuder 1994).

Als 1996 in Großbritannien eine neue Prion-Krankheit beim Menschen, die variante CJD (vCJD), beschrieben wurde und diese zudem auf einen Zusammenhang mit der BSE-Epidemie und dem Verzehr von infizierten Rinderprodukten hinwies (Will et al. 1996, Collinge 1999), war erneut für großes Aufsehen gesorgt. Diese neue Variante der CJD tritt im Gegensatz zu den bekannten Creutzfeld-Jakob-Krankheiten verstärkt bei jüngeren Menschen auf (Durchschnittsalter bei sCJD 65, bei vCJD 29). Weitere Unterschiede zeigen sich in den Symptomen sowie durch einen deutlichen längeren Krankheitsverlauf von durchschnittlich 15 Monaten (Ironsides 1998). Tierversuche mit Makakken erhärteten die These über einen Zusammenhang von BSE und vCJD, so unterscheidet sich das neuropathologische Erscheinungsbild von mit BSE und vCJD infizierten Tieren nicht. Während sich die Läsionsmuster von mit sCJD-Erregern infizierten Affen deutlich von denen mit vCJD infizierten unterscheiden (Lasmézas et al. 1996). Zudem zeigt das Glykosylierungsmuster der vCJD-Erreger große Übereinstimmung mit denen von BSE und weniger mit denen von sCJD (Collinge und Rossor 1996). In Großbritannien sind bisher 151 Menschen der neuen Variante der CJD zum Opfer gefallen (The UK Creutzfeld-Jakob Disease Surveillance Unit, Stand 04.10.2005). Ob dies bereits das Maximum der vCJD-Fälle war, oder ob es noch zu einer größeren Epidemie kommt, ist derzeit nicht abzuschätzen. Eine realistische Prognose erscheint äußerst schwierig, die Schätzungen liegen mit 50 bis zu einigen Tausend Fällen weit auseinander (Ferguson et al. 2002).

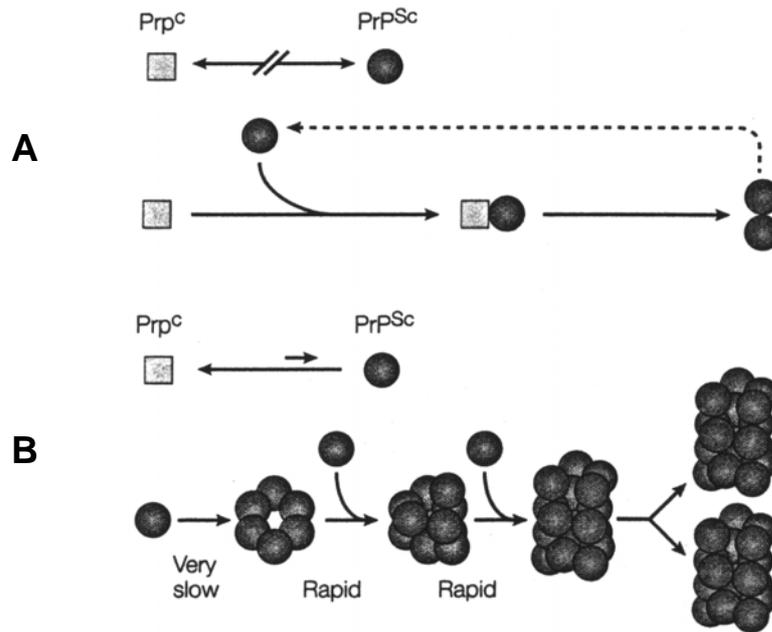
### 2.3.2 Das Prionen-Modell

Aufgrund der Analogien zwischen Kuru, CJK und Scrapie sowie dem Beweis von Infektiosität durch Übertragung machte man sich auf die Suche nach der Identität des infektiösen Agens. Anfangs vermutete man langsam wirkende Viren („*slow virus disease*“, Sigurdsson 1954). Diese These wurde jedoch verworfen als Alper und Kollegen 1966 Scrapie-Hirnextrakte mit UV-Licht sowie kurzweiliger ionisierender Strahlung behandelten, was gewöhnlich zur Schädigung und Zerstörung von Nukleinsäuren führt. Erstaunlicherweise behielten die Scrapie-Erreger nach dieser

Behandlung ihre Infektiosität. Dies führte zu der Annahme, dass sich der Erreger ohne Nukleinsäuren vermehrt (Alper et al. 1967). Daraufhin wurden mehrere mögliche Hypothesen bezüglich der Natur des Erregers beschrieben. So wurde z.B. weiterhin von einem Virus ausgegangen, der ein „unkonventionelles“ Verhalten aufzeigt (Gajdusek 1977), andere vermuteten ein Viroid als Scrapie-Erreger (Diener 1972). Es wurde aber auch ein selbstreplizierendes Protein (Griffith 1967, Pattison und Jones 1967) und ein Zellmembranprotein (Gibbson und Hunter 1967) als mögliche Krankheitserreger der TSE in Betracht gezogen. Weitere Untersuchungen zeigten, dass sich die Infektiosität gereinigter Extrakte mit diversen nukleinsäureschädigenden Verfahren nicht verringern ließ (Prusiner et al. 1980, McKinley et al. 1983a), wohl aber mit Substanzen, die Proteine abbauen oder denaturieren (Prusiner et al. 1981, Prusiner et al. 1982a). Mit einer neu entwickelten Aufreinigungsmethode konnte zudem ein Protein als Hauptkomponente des Erregers isoliert werden (Prusiner et al. 1980, 1982b). Aufgrund dieser Tatsachen formulierte Prusiner 1982 die These, der Erreger der Scrapie besteht überwiegend, wenn nicht gar ausschließlich aus einem Protein. Er nannte die infektiösen Partikel Prionen, abgeleitet aus „proteinaceous infectious particle“ (Prusiner 1982). Für sein Prion-Modell erhielt Prusiner 1997 den Nobel-Preis für Medizin.

Das bei der Aufreinigung aus Gehirnen Scrapie infizierter Hamster isolierte Protein wird aufgrund seines Molekulargewichtes nach limitiertem Proteinase K-Verdau von 27-30 kDa PrP<sup>27-30</sup> genannt. *In vitro* bildet PrP<sup>27-30</sup> schwer lösliche Aggregate, die „Prionrods“ genannt werden. Diese zeigen ultrastrukturell fibrilläre Strukturen, die denen von amyloiden Fibrillen gleichen. Zudem ähneln die *in vitro* erhaltene Aggregate denen in den Ablagerungen infizierter Gehirnen (Bolton et al. 1982, Prusiner et al. 1983, McKinley et al. 1983b). Das um ca. 67 Aminosäuren verkürzte Prion-Protein ist weiterhin infektiös, und gilt daher als die sauberste Aufreinigung des Scrapie-Erregers. Bei weiteren Arbeiten konnte das kodierende Gen Prnp, das sowohl in gesunden als auch in infizierten Hamstern in gleichem Maße exprimiert wird, identifiziert werden (Oesch et al. 1985). Somit stand fest, dass das Prion-Protein ein wirtseigenes Protein ist. Neben der potentiell infektiösen Form des Prion-Proteins, der Scrapie-Isoform PrP<sup>Sc</sup>, existiert also auch eine nicht infektiöse Form, die zelluläre Form PrP<sup>C</sup>. Auf die biophysikalischen und strukturellen Unterschiede dieser beiden Formen wird im folgenden Kapitel genauer eingegangen.

Nach der „Protein-only-Hypothese“ des Prion-Modells von Prusiner ist PrP<sup>Sc</sup> das infektiöse Agens, welches in einem autokatalytischen Prozess PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> umwandeln und so Prion-Erkrankungen auslösen kann. Zur Erklärung des Umfaltungsmechanismus wurden mehrere Modelle postuliert. Die meist diskutierten Replikationsmodelle stammen von Prusiner und Lansbury (Prusiner 1991, Jarrett und Lansbury 1993, Come et al. 1993). Beide Modelle beruhen auf einer Konformationsumwandlung des PrP als primärem Ereignis (Abb. 2.4). Der kritische Schritt bei Prusiners *Heterodimer-Modell* ist die Bildung eines Heterodimers aus PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>, möglicherweise über einen metastabilen teildenaturierten Übergangszustand. Ähnlich wie bei einer enzymatischen Katalyse kann das neu gebildete PrP<sup>Sc</sup> weitere Umfaltungen von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> katalysieren. Nach dem ein zellulärer Faktor (Protein X) als Element zur Komplexbildung postuliert wurde (Telling et al. 1995), kam es zur Erweiterung des Modells zum *Template-assistierten Anlagerungs-Modell*. Dabei wird der postulierte Übergangszustand durch das Protein X stabilisiert, dieser Komplex interagiert dann mit PrP<sup>Sc</sup> (Cohen und Prusiner 1998). Das *Keim-induzierte Polymerisations-Modell* von Lansbury beruht auf den Kenntnissen der Fibrillenbildung, wie sie z.B. von Actin und  $\beta$ -Amyloid bekannt sind. Demnach liegt ein schnelles Gleichgewicht zwischen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> vor, wobei PrP<sup>C</sup> stabiler ist. Nur wenn sich genügend PrP<sup>Sc</sup>-Moleküle aneinander lagern ist die Bildung eines stabilen Keims möglich, der eine schnelle Anlagerung weiterer PrP<sup>Sc</sup>-Moleküle induziert. Bei einer Infektion mit Prionen werden nun Keime, die eine schnelle Anlagerung von endogenem PrP<sup>Sc</sup> ermöglichen, extern hinzugefügt. Da beide hier beschriebenen Modelle streng genommen nur für Zustände frei in Lösung gelten, wand Eigen 1996 kinetische Gesetzmäßigkeiten an und leitete daraus ein drittes Modell ab. Demnach müssen zur Umwandlung von PrP<sup>C</sup> mehrere PrP<sup>Sc</sup>-Moleküle kooperativ zusammenwirken.



**Abbildung 2.4: Modelle zur Konversion von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> (nach Weissmann 2002).**

- (A) *Heterodimer-Modell* nach Prusiner (Prusiner 1991). Der Umfaltungsprozess ist kinetisch kontrolliert, eine hohe Aktivierungsenergie verhindert eine spontane Umfaltung von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup>. Extern hinzugefügtes PrP<sup>Sc</sup> tritt mit PrP<sup>C</sup> in Wechselwirkungen und bildet ein Heterodimer, das sich dann in ein Homodimer des PrP<sup>Sc</sup> umlagert. Diese Reaktion kann über einen metastabilen Übergangszustand ablaufen und möglicherweise durch ein Enzym oder Chaperon (Protein X) begünstigt werden.
- (B) *Keim-induziertes Polymerisationsmodell* nach Lansbury (Jarrett und Lansbury 1993). PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> befinden sich in einem Gleichgewicht, das fast vollständig auf der Seite von PrP<sup>C</sup> liegt. PrP<sup>Sc</sup> wird nur innerhalb eines Kristall-ähnlichen Keims oder in PrP<sup>Sc</sup>-Aggregate stabilisiert. Diese Keimbildung findet nur äußerst selten statt, ist jedoch mal ein Keim vorhanden (z.B. extern durch Infektion mit Prionen hinzugefügt), kommt es zu einer schnellen Anlagerung der Monomere.

Bisher weiß man nicht genau, wie PrP<sup>Sc</sup> die Hirnzellen schädigt. Versuche mit kultivierten Neuronen zeigten, dass sich PrP<sup>Sc</sup> nach der Umwandlung von PrP<sup>C</sup> in Lysosomen ansammelt (McKinley et al. 1991a). Die physiologische Aufgabe dieser mit Enzymen gefüllten Bläschen besteht im Abbau von „Abfallgewebe“ aus dem Zellumbau. Es ist denkbar, dass mit PrP<sup>Sc</sup> überfüllte Lysosomen Nervenzellen enzymatisch schädigen können. Deren Absterben würde im Gehirn zu Vakuolen führen, das schließlich zum Zelltod führt. Die dadurch freiwerdenden Prionen könnten von anderen Zellen aufgenommen werden, wodurch eine kaskadenartige Erregerreplikation und -ausbreitung im Organismus stattfinden könnte (Prusiner 2001).

Inzwischen wird nun schon seit vier Jahrzehnten über die Natur des Erregers der Transmissiblen spongiformen Enzephalopathien debattiert, die Prion-Protein-Hypothese von Prusiner findet dabei heute die größte Akzeptanz. Einen entscheidenden Beweis, dass das Prion-Protein für die Infektion mit TSE notwendig ist, lieferte 1993 die Arbeitsgruppe um Weissmann. Sie zeigten, dass Mäuse, die kein funktionales PrP-Gen enthielten und somit kein Prion-Protein exprimieren können, resistent gegenüber einer Infektion mit Scrapie sind (Bueler et al. 1993). Ein weiterer Durchbruch zum Beweis der Prusiner-Theorie war die erfolgreiche Weitergabe der Infektiosität in Neuroblastoma-Zellen (Rubenstein et al. 1984, Race et al. 1987). Diese Zellen konnten chronisch mit infektiösen Gehirnextrakten infiziert werden, so dass sich die Infektiosität über einige Monate erhielt. Trotz allem treten nach wie vor Zweifel an der Protein-only-Hypothese auf (zusammengefasst in Peuschel 2000, Soto und Castilla 2004, Weissmann 2004). So wird auch weiterhin über die Viren-Hypothese diskutiert (zusammengefasst in Naranga 2002, Weissmann 2004). Grund zur Annahme von Zweifeln gibt die Tatsache, dass weder die genaue Struktur von PrP<sup>Sc</sup> noch der Mechanismus der Infektion und der konformationellen Umfaltung bekannt sind. Ebenso weiß man wenig über die Pathogenese der TSEs. Das Auftreten verschiedener Prionen-Stämmen, die in genetisch identischen Wirten unterschiedliche Inkubationszeiten und Verteilungsmuster von Läsionen und Proteinablagerungen im Hirn bewirken, ist das wichtigste Argument der Gegner der Prion-Protein-Hypothese. Im Rahmen des Prion-Modells wird versucht, die Prionen-Stämme auf unterschiedliche Konformationen von PrP<sup>Sc</sup> zurückzuführen (Safar et al. 1998). Dies wird jedoch bezweifelt, da bei Infektionskrankheiten unterschiedliche Stämme normalerweise von genetischen Mutationen oder Polymorphismen des infektiösen Agens ausgehen. Aufgrund dessen wird die Existenz von multiplen Prionen-Stämmen als ein Argument für die Existenz einer Scrapie-spezifischen Nukleinsäure dargestellt (Bruce und Dickinson 1987, Dickinson und Outram 1988). Nach der Protein-only-Hypothese müsste die *in vitro*-Erzeugung infektiöser Prionen (PrP<sup>Sc</sup>) aus nicht infektiösen (PrP<sup>C</sup>) möglich sei. Obwohl es vielfach gelang PrP<sup>C</sup> so umzufalten, dass es Charakteristika von PrP<sup>Sc</sup>, wie z.B. erhöhter  $\beta$ -Faltblattanteil, Aggregation, Generierung amyloider Fibrillen, Unlöslichkeit, Proteinase K-Resistenz und sogar Neurotoxizität aufweist (Kocisko et al. 1994, Caughey et al. 1995, Kaneko et al. 1995, Hill et al. 1999, Post et al. 2000), gelang die *de novo* Erzeugung von Infektiosität *in vitro* aus nicht infektiösem Material nicht. Eine Arbeitsgruppe um

---

Prusiner glaubte 2004 diesen letzten Beweis erbracht zu haben (Legname et al. 2004). Dazu wurden genetisch veränderten Mäusen, deren Zellen eine überhöhte Anzahl Prion-Proteine bilden, aus PrP<sup>C</sup> synthetisch hergestellte Prion-Fibrillen ins Gehirn injiziert. Etwa 380 Tage später zeigten die ersten Tiere Krankheitszeichen, während in den Kontrollgruppen in diesem Zeitraum keine erkrankten. Doch schon kurz nach der Veröffentlichung traten Zweifel an der Studie auf. So können die oben beschriebenen synthetischen Prion-Fibrillen in *wild-type*-Mäusen keine Krankheit auslösen, des Weiteren ist es bekannt, dass transgene Mäuse, die PrP mehrfach überexprimieren, eine spontane, Scrapie-ähnliche Krankheit entwickeln können (Westaway et al. 1994, Chiesa et al. 1998). Neuste Forschungsergebnisse bezüglich dieser Thematik können die Prionen-Hypothese jedoch eindeutig erhärten. Castilla et al. (2005) gelang es in einem PCR-ähnlichen Verfahren infektiöses *in vitro* generiertes PrP<sup>Sc</sup> herzustellen. Die von ihnen entwickelte Technik (PMCA – Protein Misfolding Cyclic Amplification) ermöglicht die Amplifizierung eines einzelnen infektiösen Prion-Proteins um das 10-millionenfache. Da jedoch von infizierten Hamstergehirnen ausgegangen wurde, musste das originale infektiöse Prion-Protein durch starkes Verdünnen herausgelöst werden. Nach einer 10<sup>20</sup>-fachen Verdünnung nahm Castilla et al. (2005) an, dass ihr *in vitro* erzeugtes PrP<sup>Sc</sup> 100 % rein ist. Diese Studie bekräftigt zwar die Protein-only-Hypothese, bestätigt sie aber nicht komplett. Da hier nicht von einem synthetischen Prion-Protein ausgegangen wurde, sondern von infektiösen Hamstergehirnen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Moleküle an dem Umfaltungsprozess und somit an der Weitergabe der Infektiosität beteiligt sind. Der letzte, zweifelsfreie Beweis, nämlich die *in vitro* Erzeugung infektiöser Prionen aus synthetischen Prion-Proteinen (PrP<sup>C</sup>) fehlt daher weiterhin.

### 2.3.3 Prion-Protein-Isoformen

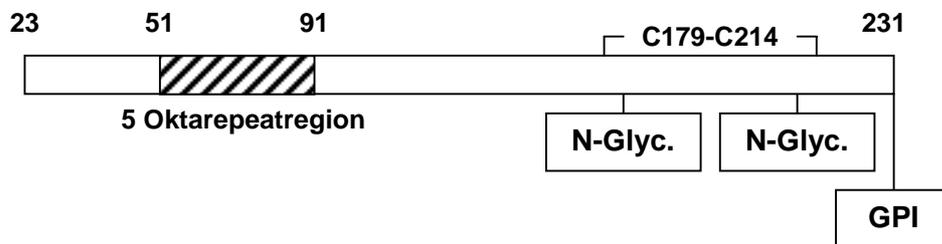
Im folgenden Kapitel wird näher auf die biophysikalischen und strukturellen Unterschiede der Isoformen des Prion-Proteins eingegangen. Das Prion-Protein weist neben der zellulären Form (**PrP<sup>C</sup>**) eine fehlgefaltete Isoform (**PrP<sup>Sc</sup>**) auf, die nach Prusiner's Prionen-Modell als das infektiöse Agens der TSE gilt. Eine weitere Isoform ist das um ca. 67 Aminosäuren verkürzte Prion-Protein 27-30 (**PrP27-30**), das beim Proteinase K-Verdau von PrP<sup>Sc</sup> aus diesem hervorgeht und den infektiösen und Proteinase K-resistenten Teil von PrP<sup>Sc</sup> darstellt.

Die Prion-Proteine der Säugetiere sind außerordentlich stark konserviert. Bei paarweisem Vergleich ihrer Aminosäuresequenz sind sie zu mehr als 90 % identisch (Schätzkel et al. 1995). Dies bedeutet, dass alle Prion-Proteine der Säugetiere praktisch dieselbe dreidimensionale Struktur haben und ähnliche physikalische Eigenschaften aufweisen. Daher sind die diesbezüglich durchgeführten Untersuchungen an Maus- und Hamster-Prion-Proteinen repräsentativ für alle Prion-Proteine aus Säugetieren anzusehen.

Das zelluläre Prion-Protein PrP<sup>C</sup> ist ein posttranslational modifiziertes Membranprotein, das zur Gruppe der Sialoglykoproteine gehört. Es wird primär im zentralen Nervensystem und in Lymphozyten exprimiert (Kretzschmar et al. 1986, Cashman et al. 1990), man findet es aber auch in vielen anderen Geweben und Zellen (Mobeley et al. 1988, Manson et al. 1992). Hauptsächlich kommt PrP<sup>C</sup> in den Zellmembranen von Neuronen und Gliazellen vor. Die posttranslationale Modifikationen des Proteins umfassen das Anhängen eines Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Ankers im endoplasmatischen Retikulum (Bolton et al. 1985), die Ausbildung einer Disulfidbrückenbindung zwischen den Cysteinresten 179 und 214 (Turk et al. 1988), sowie eine N-Glykosylierung an den Asparaginresten 181 und 197 (Endo et al. 1989). In den Zellen liegen alle drei Formen der Glykosylierung vor (nicht, ein- oder zweifach glykosyliert). Die Verankerung des Proteins in der Membran erfolgt über den GPI-Anker. Wie für GPI-Membranproteine typisch, reichert sich PrP<sup>C</sup> auf der Zelloberfläche überwiegend in Caveolae-ähnlichen Domänen, den *lipid rafts*, an (Vey et al. 1996).

Die biologische Funktion des PrP<sup>C</sup> ist bis heute nicht vollständig geklärt. Genetisch veränderte Mäuse, die kein Prion-Protein exprimieren können (Prnp<sup>0/0</sup>-Mäuse), entwickeln sich normal und zeigen bis auf leichte circadiane Rhythmusstörungen kein auffälliges Verhaltensmuster (Bueler et al. 1992, Manson et al. 1994). Auf eine

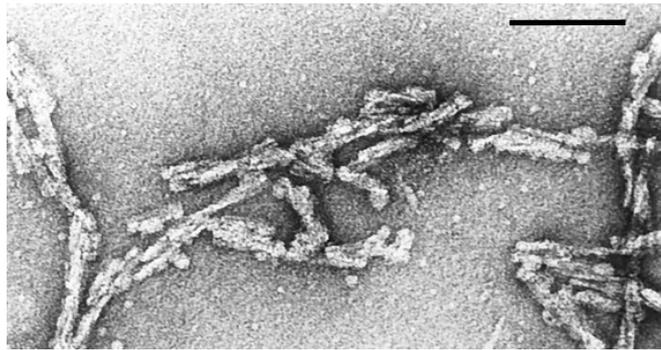
zentrale funktionelle Bedeutung deuten die kupferbindenden Eigenschaften von PrP<sup>C</sup> hin. Die N-terminale Oktarepeatregion (meist 5-fache Wiederholung der acht Aminosäuren PGGGTWGQ) kann unter physiologischen Bedingungen 5-6 Kupferionen binden (Brown et al. 1997, Miura et al. 1999). Aufgrund dessen spricht man PrP<sup>C</sup> eine Funktion in der Regulierung des Kupferhaushaltes der Zelle zu (Stöckel et al. 1998, Viles et al. 1999). Im gleichen Zusammenhang wird auch über eine Superoxiddismutase-Aktivität von PrP<sup>C</sup> diskutiert (Brown et al. 1999, Waggoner et al. 2000). Des Weiteren zeigten Untersuchungen, dass PrP<sup>C</sup> verschiedene Signaltransduktionswege beeinflussen kann (Mouillet-Richard et al. 2000, Hundt et al. 2001, Martins et al. 2002).



**Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Primärstruktur von PrP<sup>C</sup>.**

Das pathogene und infektiöse PrP<sup>Sc</sup> weist die gleiche chemische Zusammensetzung wie PrP<sup>C</sup> auf, beide besitzen identische Aminosäuresequenzen, Lipidanker und N-Glycosylierungen (Stahl et al. 1993, Rudd et al. 1999). Große Unterschiede findet man jedoch bezüglich ihrer biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften. So ist PrP<sup>C</sup> in Wasser beschränkt und in milden Detergentien sehr gut löslich, während PrP<sup>Sc</sup> unter Beibehaltung seiner Infektiosität bisher nicht in Lösung gebracht werden konnte. PrP<sup>C</sup> tritt monomer auf, PrP<sup>Sc</sup> liegt dagegen in Aggregaten polymer vor. Diese großen Aggregate findet man als Amyloid-Plaques unterschiedlicher Ausformung im Gehirn an TSE erkrankter Individuen (Merz et al. 1981). Auch gegenüber proteolytischen Enzymen zeigen beide Isoformen unterschiedliches Verhalten, so wird PrP<sup>C</sup> von Proteinase K rasch vollständig abgebaut, während PrP<sup>Sc</sup> lediglich am N-Terminus um ca. 67 Aminosäuren verkürzt wird. Die exakte Position des Schnittes des N-terminalen Peptids kann je nach Stamm und Spezies zwischen Aminosäure 87 und 91 variieren. Der verbleibende Rest bildet nach der Aufreinigung sehr regelmäßige amyloide Stäbchen, die Prionrods (Prusiner et al. 1983), bzw. Scrapie assoziierte Fibrillen (SAF, Merz et al. 1981). Bei den Prionrods handelt es sich um

ein Aufreinigungsartefakt, das nur bei der Kombination von Detergens-Extraktion und limitiertem PK-Verdau zu beobachten ist (McKinley et al. 1991b). PrP<sup>27-30</sup> widersteht einer weiteren PK-Verdauung über Stunden und behält neben der Infektiosität auch alle weiteren oben genannten Eigenschaften von PrP<sup>Sc</sup> bei (McKinley et al. 1991b). Selbst Tiere die nach genetischer Veränderung nur noch PrP<sup>27-30</sup> exprimieren können, können infiziert werden und die Krankheit kann von diesen Tieren weiter übertragen werden (Fischer et al. 1996).

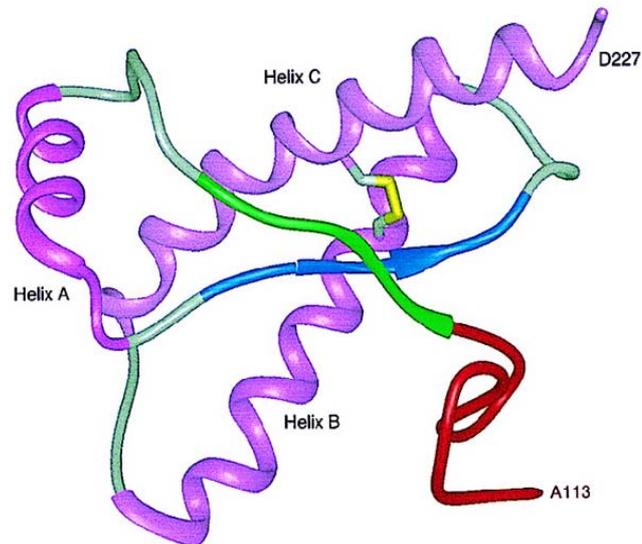


**Abbildung 2.6: Elektronenmikroskopische Darstellung der Prionrods (Prusiner 1998).**

Amyloide Struktur des PrP<sup>27-30</sup>. Der Balken entspricht 100 nm.

Da keine chemischen Unterschiede zwischen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> festgestellt werden konnten, sehr wohl aber große Differenzen in ihrer Struktur, handelt es sich bei den beiden Proteinen aller Wahrscheinlichkeit nach um Konformationsisomeren. Beide Isomere zeigen große Unterschiede in ihrer Sekundärstruktur, die mittels spektroskopischen Messungen (CD, FTIR) aufgezeigt werden konnten. PrP<sup>C</sup> besitzt einen sehr hohen  $\alpha$ -helikalen Anteil (ca. 42 %) und einen  $\beta$ -Faltblattanteil von nur ca. 3 %, während bei PrP<sup>Sc</sup> und PrP<sup>27-30</sup> der  $\beta$ -Faltblattstrukturanteil ca. 43 % bzw. 54 % ausmacht und der  $\alpha$ -helikale Anteil bei nur knapp 30 % bzw. 21 % liegt (Pan et al. 1993, Safar et al. 1993a). Mittels NMR-Spektroskopie rekombinanter Prion-Proteine konnte die PrP<sup>C</sup>-Struktur geklärt werden. Anhand des rekombinanten Prion-Proteins des Syrischen Goldhamsters (recSHaPrP) konnten folgende Merkmale charakterisiert werden. PrP<sup>C</sup> besteht aus einem flexiblen unstrukturierten Schwanz (AS 29-125), drei  $\alpha$ -Helices (AS 144-157, 172-193, 200-227), einer kurzen  $\alpha$ -helikalen Domäne (AS 166-168) und zwei gepaarten  $\beta$ -Faltblattdomänen (AS 129-131, AS 161-163) (James et al. 1997, Donne et al. 1997). Bereits zuvor wurde die

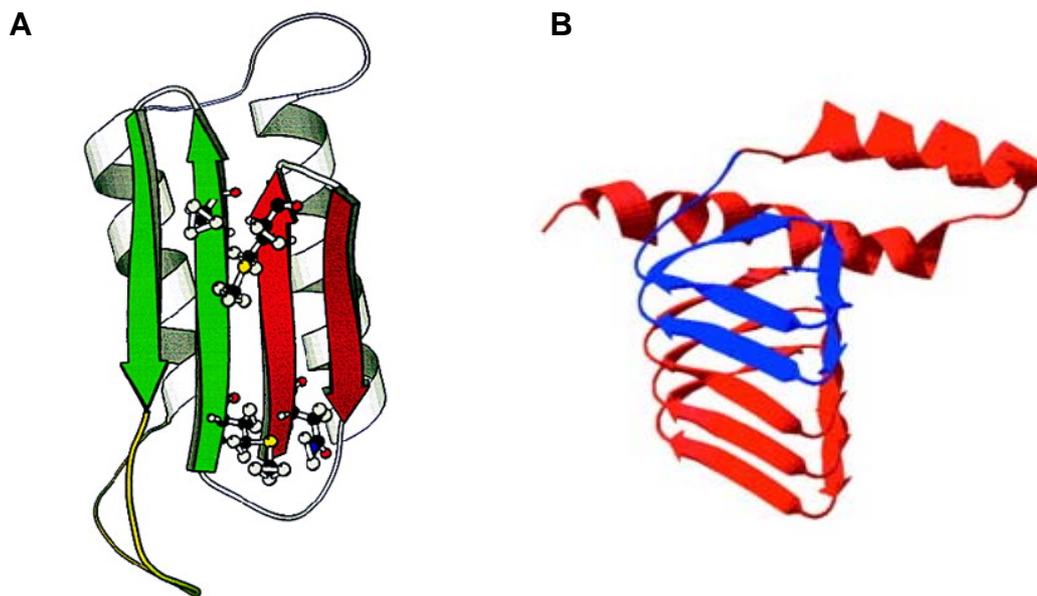
Molekülstruktur für das recPrP der Maus beschrieben (Riek et al. 1996), dabei zeigen beide NMR-Strukturen große Übereinstimmungen.



**Abbildung 2.7: NMR-Strukturanalyse des rekombinanten Hamster-Prion-Proteins (recSHaPrP 90-231, James et al. 1997).**

Die 3  $\alpha$ -Helices (Helix A: AS 144-157, Helix B: AS 172-193, Helix C: AS 200-227) sind lila dargestellt, die Disulfidbrückenbindung zwischen Cys-179 und Cys-214 gelb, die konservierte hydrophobe Region rot (AS 113-126) und Loops grau. Die Pfeile (grün und blau) stellen die  $\beta$ -Faltblattdomänen (AS 129-131 bzw. 161-163) dar.

Aufgrund der Schwierigkeiten  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  in Lösung zu bekommen, gibt es für dieses bisher keine hochauflösende Struktur. Es existieren lediglich Modellvorstellungen über seine dreidimensionale Struktur. Das Modell von Huang basiert auf computer-gestützten Auswertungen experimenteller Daten, die eine Vielzahl spektroskopischer und genetischer Fakten berücksichtigen (Huang et al. 1996). Die von ihm vorgeschlagene Struktur zeigt eine aus vier Strängen bestehende  $\beta$ -Faltblattdomäne, die an einer Seite von zwei  $\alpha$ -Helices bedeckt ist. Ein neueres Modell wurde auf Basis elektronenmikroskopischer Daten aus 2D-Kristallen von PrP27-30 aufgestellt (Wille et al. 2002). Nach diesem Modell besteht  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  aus mehreren antiparallel gepackten  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Demnach sollen sechs  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ -Monomere ein Trimer aus Dimeren bilden. Ein Trimer entspricht dabei einem 2D-Kristall.



**Abbildung 2.8: 3D-Strukturmodelle von PrP<sup>Sc</sup>.**

A. Modell nach Huang et al. 1996, basierend auf spektroskopischen und genetischen Daten.

B. Modell nach Wille et al. 2002 auf Grundlage elektronenmikroskopischer Daten.

Es lassen sich trotz der hier aufgezeigten Unterschiede zwischen PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> jedoch nicht alle Eigenschaften von Prionen und Prion-Krankheiten allein auf Basis von PrP<sup>Sc</sup> erklären. Beispielsweise übertragen sich Prionen nur schwer von einer Art auf die andere. Manche Spezies sind sogar resistent gegenüber Prion-Krankheiten (z.B. Menschenaffen gegenüber Scrapie, Hamster gegenüber BSE, zusammengefasst in Groschup et al. 2001). Versuche mit transgenen Tieren zeigten, dass die Artenbarriere zu einem großen Teil in der Aminosäuresequenz des PrP und somit im PrP-Gen verankert ist (Scott et al. 1989, Weissmann et al. 1994). Eine erfolgreiche Übertragbarkeit hängt somit vom Grad der Aminosäuresequenzhomologie zwischen Spender- und Empfängerart ab.

Tabelle 2.4: Vergleich der unterschiedlichen PrP-Isoformen.

Eigenschaft	PrP <sup>C</sup>	PrP <sup>Sc</sup> und PrP27-30
Sekundärstruktur	40 % $\alpha$ -Helix, 3 % $\beta$ -sheet	<30 % $\alpha$ -Helix, >40 % $\beta$ -sheet
Löslichkeit	löslich	unlöslich
Stabilität	thermo- und drucklabil, denaturierbar	sehr stabil, resistent gegen Hitze, UV- und $\gamma$ -Strahlen
Proteinase K-Sensitivität	vollständig abbaubar	C-terminal resistent
Infektiosität	nicht infektiös	infektiös
Vorliegen	Monomer in der Zellmembran	hochmolekulare Aggregate in den Zellen

### 2.3.4 Inaktivierung infektiöser Prionen

In den vorherigen Kapiteln wurde bereits über die ungewöhnliche Natur des Krankheitserregers der Transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) berichtet. Eine besonders entscheidende Eigenschaft spielt dabei die bemerkenswert starke Resistenz des Erregers gegenüber einer Reihe chemischer und physikalischer Inaktivierungsmethoden, die bei konventionellen pathogenen Mikroorganismen effektiv sind (Taylor 1999a). Die TSE des Menschen sind zwar nicht per Kontakt übertragbar, es besteht aber die Gefahr einer Infektion durch kontaminierte medizinische Instrumente. Des Weiteren besteht der Verdacht der Übertragung von BSE-kontaminierten Lebensmitteln auf den Menschen in Form der vCJD. Daher ist eine effektive Dekontamination vor allem medizinischer Instrumente im Krankenhaus und von BSE-kontaminierten Gegenständen (z.B. Schlachterwerkzeug) und Räumlichkeiten (z.B. im Schlachthof) von besonderer Bedeutung. Dazu sind unterschiedliche chemische Desinfektionsmethoden oder -mittel, teilweise in Kombination mit thermischer Inaktivierung, erforderlich.

Bereits 1950, als über die Natur des Scrapie-Erregers noch nichts bekannt war, wurde die Resistenz des Erregers gegen Hitzebehandlung bei 100 °C während 30 Minuten, sowie gegen Formalin und Chloroform beschrieben (Wilson et al. 1950). Anderthalb Jahrzehnte später wurde erstmals über die Resistenz der TSE-Erreger gegenüber Bestrahlungsmethoden berichtet (Alper et al. 1966). Daraus wurde geschlossen, dass der Erreger keine eigenen Nukleinsäuren besitzt (Kap. 2.3.2). Folglich sind auf virale Nukleinsäuren einwirkende Desinfektionsmittel gegen Prionen unwirksam. Als dann zwei Jahrzehnte später gezeigt wurde, dass bei einer Behandlung von PrP<sup>Sc</sup> mit Proteinase K nur etwa die ersten 67 Aminosäuren abgespaltet werden können und dass das daraus resultierende Proteinfragment

(PrP<sup>27-30</sup>) gegenüber einer weiteren Enzymbehandlung für Stunden resistent ist (Kap. 2.3.3), kam man zu der Annahme, dass die Resistenz gegen Proteinasen und gegen desinfizierende Wirkstoffe eine ähnliche Grundlagen haben muss. Die Widerstandsfähigkeit von Krankheitserregern gegenüber äußeren Einflüssen steht in enger Beziehung zur Struktur und den chemischen Bausteinen der Erreger, daher wird die Grundlage der Resistenz des PrP<sup>Sc</sup> gegenüber Proteasen und Chemikalien in dessen molekularen Struktur vermutet.

Pathogene Prionen sind gegen viele breit eingesetzte bakterizide und virizide Desinfektionsmittel und -verfahren besonders stabil, da diese am PrP<sup>Sc</sup>-Molekül nur erschwerte Reaktionen auslösen können. Oft ist nur eine Senkung der Infektiosität und keine komplette Inaktivierung zu erreichen. Dies wird auf Aggregatbildung als Selbstschutz oder auf sehr resistente Prion-Stamm-Subpopulationen zurückgeführt (Brown et al. 1990a). So kann beispielsweise mit Alkohol die Infektiosität nicht, mit Guanidinthiocyanat nur teilweise und mit Natriumhypochlorit nahezu vollständig gesenkt werden. Wie bereits in Kapitel 2.3.3 erwähnt spielt die geordnete Tertiärstruktur des PrP<sup>Sc</sup> und seine Tendenz zur Bildung mehr oder weniger geordneter Aggregate (Prionrods, Abb. 2.6) für die Resistenz und Infektiosität von Prionen eine wichtige Rolle. Daher sollte die Zerstörung der geordneten Struktur auch zu einer Minderung der Infektiosität führen. Eine irreversible Zerstörung der Aggregatbildung verbunden mit einer bleibenden Inaktivierung sollte demnach mit Stoffen erreicht werden können, die in der Lage sind die Tertiärstruktur zu destabilisieren. Diese wird durch intramolekulare Schwefelbrücken, hydrophobe Wechselwirkungen zwischen unpolaren Aminosäureresten und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen geladenen Seitenketten stabilisiert. Ein weiteres wichtiges Strukturelement des PrP<sup>Sc</sup>-Moleküls ist dessen überwiegend in  $\beta$ -Faltblättern organisierte Sekundärstruktur, die hauptsächlich durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird. Die auf derartige Strukturen wirkenden Chemikalien können in Gruppen, die auf unterschiedliche Bindungen innerhalb der Proteinstruktur einwirken und diese destabilisieren, eingeteilt werden (Tabelle 2.5).

**Tabelle 2.5: Wirkung chemischer Desinfektionsmittel auf Proteine und auf PrP<sup>Sc</sup>.**

chemischer Wirkstoff	Wirkung auf die Proteinstruktur	Inaktivierung von PrP <sup>Sc</sup>
Harnstoff, Guanidin-Hydrochlorid und -Thiocyanat	Zerstörung der H-Brücken innerhalb der $\alpha$ -Helices und $\beta$ -Faltblattstrukturen $\Rightarrow$ ungeordneter Knäuel der Polypeptidkette	in Kombination mit nachfolgender Hitzebehandlung gut wirksam: 4 M GdnSCN, 1 h, anschließend Dampfsterilisation bei 134 °C für mind. 18 min (Manuelidis 1997)
Alkalien (z.B. NaOH)	Zerstörung von polaren und elektrostatischen Wechselwirkungen aufgrund Neutralisation von Lysin- und Argininresten	sehr gut wirksam: 2 M NaOH, 2 x 30 min, besser über Nacht (Brown et al. 1986, Taylor et al. 1994)
Säuren (z.B. Ameisensäure)	Zerstörung von polaren und elektrostatischen Wechselwirkungen aufgrund Neutralisation von Glutamat- und Aspartatresten	Ameisensäure wirkt nur partiell inaktivierend (Brown et al. 1990b).
Alkohole (z.B. Ethanol, Propanol)	wirken strukturverstärkend, z.B. Bildung von $\alpha$ -Helices	Ethanol, 1- und 2-Propanol zeigen keine Wirkung (Taylor 1999b).
Aldehyde (z.B. Formaldehyd)	wirken stabilisierend durch Verknüpfung von Peptidketten	Formalin ist nahezu unwirksam (Brown et al. 1982a, 1990a).
Detergentien (z.B. SDS)	Destabilisierung hydrophober Wechselwirkungen durch Bindung an das Peptidrückrat $\Rightarrow$ Denaturierung	gut wirksam: > 3 % SDS, 10 min sieden (Taylor et al. 1994), noch besser wirksam bei nachfolgendem Autoklavieren bei 121 °C für 1 h (Budka et al. 1995)
Oxidations- und Reduktionsmittel (z.B. NaOCl)	Spaltung von Disulfidbrückenbindungen $\Rightarrow$ irreversible Denaturierung	sehr gut wirksam: > 5 % NaOCl, für mind. 1 h (Brown et al. 1982b, Brown et al. 1986, Taylor et al. 1994)

Aus der Tabelle 2.5 ist ersichtlich, dass die aggressivsten Desinfektionsmittel die effektivste Inaktivierung von Prionen liefern. Dies führt zu der Problematik, dass die am biologisch wirksamsten Mittel gleichzeitig eine Gesundheitsbelastung für den Menschen sowie eine hohe Umweltbelastung darstellen. Zusätzlich ist die Materialverträglichkeit bzw. Korrosionsgefahr durch das Desinfektionsmittel aus ökonomischen Aspekten von großer Bedeutung. Natronlauge ist zur Inaktivierung von Prionen besonders gut geeignet, diese sehr irritierende Lauge birgt aber große Gefahren für den Menschen, ebenso wirkt sie auf Aluminium- und Zinkoberflächen korrosiv. Ähnlich verhält sich das starke Oxidationsmittel Natriumhypochlorit (NaOCl), das alle oxidativ angreifbare Metalle, darunter auch Edelstahl, korrosiv angreift. Ein weiterer Nachteil von NaOCl ist die starke Schleimhautreizung durch das freiwerdende Chlor. Diese Chemikalien eignen sich daher nicht zur Dekontamination

empfindlicher Oberflächen und Instrumente in neurochirurgischen Kliniken, Augenkliniken und Zahnarztpraxen. Für empfindliche Oberflächen und von Instrumenten wird daher eine Behandlung mit Guanidinthiocyanat (GdnSCN) empfohlen. Um dabei eine vollständige Eliminierung der Infektiosität zu erreichen, ist jedoch eine zusätzliche Dampfsterilisation notwendig (Manuelidis 1997). Zur Vermeidung von Verätzungen der Haut und Schleimhaut und zur Vermeidung der Korrosion empfindlicher Materialien, kann als Alternative zu GdnSCN auch eine Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS) verwendet werden. Wie mit GdnSCN bleibt auch nach einer Desinfektion mit SDS eine Restinfektiosität übrig, so dass auch hier eine nachfolgende Dampfsterilisation empfohlen wird (Budka et al. 1995).

Die inaktivierende Wirkung der hier beschriebenen Chemikalien ist auf die Destabilisierung von inter- und intramolekularen Wechselwirkungen des PrP<sup>Sc</sup>-Moleküls zurückzuführen. Unter der Einwirkung von NaOCl wird vermutlich aufgrund zahlreicher kovalenter Modifikationen im PrP<sup>Sc</sup>-Protein die irreversible Inaktivierung hervorgerufen (Prusiner et al. 1993). Das inaktivierende Prinzip des Natriumhypochlorits ist die Erzeugung unterchloriger Säure, die als starkes Oxidationsmittel auf das Prion-Protein einwirkt. Diese ist in Lösung sehr instabil und zerfällt rasch in naszierenden Sauerstoff und Salzsäure. Der wirksame Teil ist somit der frisch entstehende Sauerstoff, welcher oxidativ-denaturierende Prozesse am PrP<sup>Sc</sup> auslösen kann. Das genaue Wirkungsprinzip der anderen wirksamen Desinfektionsmittel ist nicht vollständig geklärt. Im Falle von GdnSCN wird angenommen, dass das Thiocyanat-Anion der aktiv wirksame Teil ist (Prusiner et al. 1981). Während man sich bei der Inaktivierung mit SDS dessen starke tensidische Aktivität zu Nutze macht.

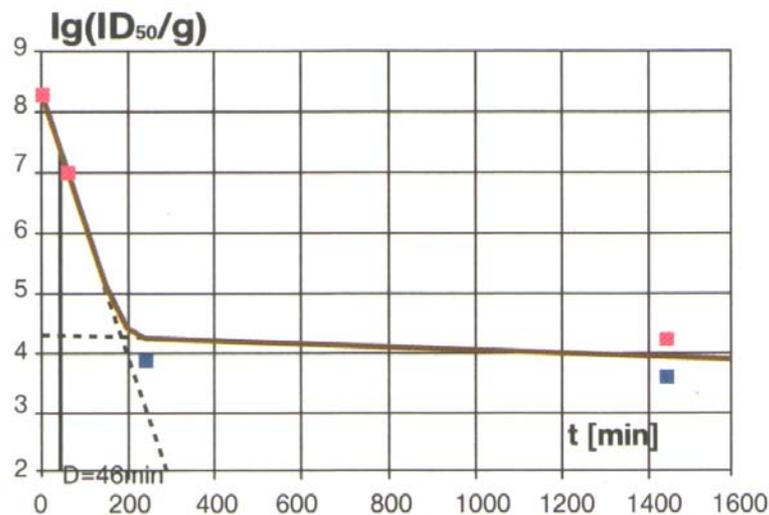
Prionen zeigen auch eine ausgeprägte Resistenz gegenüber physikalischen Inaktivierungsmethoden. So ist auch die enorme Hitzeresistenz schon seit den 60er Jahren bekannt (Hunter und Millson 1964). Erst das massive Auftreten von BSE in den 80er Jahren in Großbritannien hat die Notwendigkeit einer genauen Kenntnis der Inaktivierung von Prionen deutlich gemacht. Diese wurde nach dem Verdacht, dass der BSE-Erreger über die Verfütterung bestimmter tierischer Proteine ohne genügende Inaktivierung übertragen würde, noch verdeutlicht (Kap. 2.3.1). Protein- und fettreiche Rohstoffe, einschließlich Rückenmark und Gehirn geschlachteter Tiere, waren in Großbritannien seit den frühen 70er Jahren nur noch unter relativ

milden thermischen Bedingungen zu proteinreichen Einzelfuttermitteln verarbeitet worden (Prusiner 1997). In Deutschland galten dagegen für die Verarbeitung von verendeten Tieren und Schlachtabfällen bereits seit 1939 die strengen Verarbeitungsbedingungen des Tierkörperbeseitigungsgesetzes mit 132 °C gespanntem Dampf während einer Zeit von 30 Minuten (von Ostertag 1958). Nach der Neufassung des Tierkörperbeseitigungsgesetzes von 1973 ist eine Temperatur von 133 °C während einer Zeit von 20 Minuten vorgeschrieben (Grünwald 1994). Diese Bedingungen sollten in erster Linie die Abtötung der hitzeresistenten Sporen des Milzbranderreger gewährleisten. Heute weiß man, dass unter diesen Bedingungen auch eine ausreichende Inaktivierung von Prionen stattgefunden hat, während bei milderer Bedingungen, wie sie in Großbritannien angewandt wurden, keine genügende Inaktivierung erfolgte.

Temperaturerhöhung bewirkt eine Beschleunigung der molekularen Bewegungen, wodurch vorherrschende Ordnungen zerstört werden. Es kommt u. a. zum Verdampfen von Flüssigkeiten, Zerstörung der dreidimensionalen Proteinstruktur und zur Auflösung zellulärer Ordnungen. Bei sehr hohen Temperaturen kann in Wasser der Abbau von Peptidketten der Proteine durch Hydrolyse stattfinden. Diese Reaktionen führen bei Proteinen zur Denaturierung wodurch z.B. Enzyme ihre Aktivität verlieren. Demnach sollten diese Effekte auch zu einer Inaktivierung von Prionen führen. Es können aber auch wiederum Faktoren auftreten, die stabilisierend auf die ursprüngliche Prion-Proteinstruktur wirken, wie z.B. die Adsorption an Oberflächen (Taylor 1991), das Eintauchen in Fett (Appel et al. 2001), oder wie bereits weiter oben schon erwähnt die Bildung von größeren Aggregaten oder Molekülverbänden aufgrund hydrophober Wechselwirkungen. Kommt es jedoch zu einer Hitze-denaturierung so ist diese fast ausnahmslos irreversibel.

Abbildung 2.9 zeigt die Inaktivierungskurve des TSE-Erregers eines Maus-adaptierten Scrapie-Stammes im trockenen Zustand bei 160 °C. Daraus ist ersichtlich, dass sich bei langen Reaktionszeiten Abweichungen von der Reaktion 1. Ordnung ergeben. Ein derartiges Verhalten wird häufig bei Inaktivierungsexperimenten mit TSE-Erregern aber auch mit anderen Erregern wie Bakterien und Viren gefunden. Dies lässt sich dadurch erklären, dass sich ein Teil der Erreger in einer physikalisch-chemischen Umgebung befindet, die gegen thermische Denaturierung stabilisiert. Aufgrund ihrer ausgeprägten Hydrophobie können sich Prionen durch Aggregation oder durch Adsorption an Oberflächen schützen. Zum

anderen besteht die Möglichkeit, dass eine kleine Subpopulation des Erregers hitzestabiler ist als die Mehrheit (Brown et al. 1990a, Brown 1998). Diese sehr resistenten Erreger-Subpopulationen könnte auch die nicht vollständige Inaktivierung von Prionen mit prinzipiell gut wirksamen Desinfektionsmitteln (siehe oben) erklären. Denkbar ist auch eine Stabilisierung eines kleinen Teils der Prionen durch hydrophob-hydrophile Grenzflächen, wobei sich ein Teil der Infektiosität in der Fettphase ansammelt, wo sie besser geschützt ist (Taylor et al. 1996a).



**Abbildung 2.9: Inaktivierungskurve von PrP<sup>Sc</sup> (ME7-Stamm) im trockenen Zustand bei 160 °C (Taylor et al. 1996a).**

Rote Quadrate, BRVR-Mäuse; blaue Quadrate, A2G-Mäuse; braune Kurve, Anpassung an die experimentellen Befunde mit Hilfe zweier Inaktivierungskurven: einer schnellen mit  $D = 46$  min und einer langsamen mit  $D = 3840$  min.

Wie schon bei den chemischen Desinfektionsmitteln wurde auch zur Untersuchung der Hitzeinaktivierung verschiedener TSE-Erreger eine Fülle von Messungen durchgeführt. Dabei zeigte eine 20-minütige Sterilisation mit gesättigtem Wasserdampf (3 bar) bei 133 °C eine Reduktion der Infektiosität um mehr als 3,3 Zehnerpotenzen (Taylor et al. 1995). Daraufhin wurde 1996 von der Europäischen Union das Drucksterilisationsverfahren bei 133 °C für 20 min zur Verarbeitung von Säugetierabfällen zugelassen und empfohlen (EU-Entscheidung 96/449/EG).

Die Inaktivierung von Prionen durch Hitze ist ein komplexer Vorgang, bei dem viele Einflussgrößen eine Rolle spielen. Die Untersuchungen zeigten, dass im trockenen Zustand eine langsamere Inaktivierung stattfindet als im feuchten wasserdampf-

---

gesättigten Zustand. Ebenso erfolgt im stark alkalischen Medium (z.B. in NaOH-Lsg.) eine deutlich schnellere Hitzeinaktivierung der Prionen als im neutralen Medium. Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor ist das komplexe Medium, in dem sich die Prionen befinden. Dieses Medium besteht im Allgemeinen aus einer wässrigen Phase, einer Fettphase und verschiedenen Feststoffen einschließlich der Behälterwand. Verteilung der Prionen auf die Wasser- und Fettphase resultiert in unterschiedliche Inaktivierungsgeschwindigkeiten für beide Phasen. Ebenso kann die Adsorption an Oberflächen eine stabilisierende Wirkung haben und die Inaktivierungsgeschwindigkeit eines kleinen Teils der Prionen verlangsamen. Weiter könnten amphiphile Membranproteine an hydrophob-hydrophilen Grenzflächen auf Prionen stabilisierend wirken. Oxidierende und reduzierende Bedingungen können Einfluss auf die stabilisierende Disulfidbrückenbindungen des Prion-Proteins nehmen. Die äußerst geringe Restinfektiosität die sowohl bei chemischen als auch bei physikalischen Inaktivierungsmethoden zu beobachten ist, wäre erklärbar, wenn all diese stabilisierenden Einflüsse zusammenkommen.

### 3 Fragestellung

Die Infektiosität von Prionen kann nur unter extremen Bedingungen (Autoklavieren bei 133 °C für mind. 20 min, Behandlung mit 1 M Natronlauge oder 5 %iger Natriumhypochlorit-Lösung für mind. 1h) deutlich reduziert werden. Die zur Inaktivierung geeigneten Verfahren führen jedoch dazu, dass die mit Prionen kontaminierten Materialien oder potentielle Risikomaterialien nach der aggressiven Prozedur stark an Qualität und Textur verlieren. In der Regel führt dies zur Unbrauchbarkeit des Ausgangsmaterials. Eine milde und zugleich effektive Inaktivierungsmethode könnte dagegen die Weiterverarbeitung solcher Materialien gewährleisten. Damit könnte beispielsweise Tiermehl, das bisher verbrannt werden muss, vor Prionen sicher gemacht werden und somit u. a. eine Verfütterung an Tieren ermöglichen. Da es zudem gegenwärtig keine Möglichkeit gibt, potentiell mit Prionen verunreinigte Lebensmittel sicher zu machen, würde ein für das Produkt schonendes Verfahren die Lebensmittelsicherheit und damit auch die Verbrauchersicherheit deutlich erhöhen.

Gesamtziel der vorliegenden Arbeit war es, das Verhalten von Prion-Proteinen unter Hochdruckbedingungen zu untersuchen. Insbesondere sollte geklärt werden ob eine Behandlung mit Hochdruck die Stabilität der Proteine beeinflusst um somit eine Inaktivierung der infektiösen Prionen zu ermöglichen.

Dabei sollte untersucht werden unter welchen Bedingungen Prionen unter Druck denaturiert werden können. Da eine Vielzahl von Proteinen bereits bei Raumtemperatur unter Druck denaturieren, könnte das Hochdruckverfahren eine schonende Alternative zu den bisherigen Inaktivierungsmethoden darstellen. Die Arbeit sollte zudem klären, ob Druck bei den äußerst resistenten Prionen eine Proteinase K-Sensitivität induzieren kann, und ob diese zugleich zu einer Reduktion der Infektiosität führt. Eine erfolgreiche Druckinaktivierung von Prionen würde den Gebrauch stark denaturierender und ätzender Chemikalien überflüssig machen und eine Behandlung von Lebensmittel zur Prionen-Dekontamination ermöglichen. Zudem könnte die Anwendung von Druck, als thermodynamischer Parameter, Einblicke in die Komplexität der Aggregation und Faltung des Prion-Proteins ermöglichen und neue physikochemische Eigenschaften dieses Proteins aufzeigen, die mittels anderer Methoden, wie z.B. Temperaturstudien nicht möglich sind.

---

Die Experimente wurden mit homogenisierten Gehirnen Scrapie erkrankter Hamster und Mäusen durchgeführt. Zur modellhaften Untersuchung fehlgefalteter Prion-Proteinen wurde PrP<sup>Sc</sup> aus dem Gehirn an Scrapie erkrankten Hamstern isoliert. Mittels der Isolierung des infektiösen Prion-Proteins konnte der Einfluss von Hochdruck auf das PrP<sup>Sc</sup>-Protein allein und ohne Matrix-Effekte, die beim Drücken von Gehirnhomogenaten eine Rolle spielen könnten, untersucht werden. Der Einfluss einer Hochdruckbehandlung auf die Proteinase K-Resistenz von Prionen wurde immunologisch mittels der Western-Blot-Technik untersucht. Der Druckeffekt auf deren Infektiosität konnte durch Tierversuche an syrischen Goldhamstern und genetisch veränderten Mäusen aufgezeigt werden.

## 4 Material und Methoden

Verwendete Chemikalien und Reagenzien entsprechen dem höchsten Reinheitsgrad (*p. A. – pro Analysis*). Eine Auflistung aller eingesetzten Chemikalien und Lösungen, sowie eine Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind im Anhang unter Kapitel 9 zu finden. Alle Lösungen und Puffer wurden mit hochreinem Wasser, welches durch ein Wasseraufreinigungssystem (Millipore) gefiltert wurde, angesetzt und ggf. 20 min bei 121 °C sterilisiert.

### 4.1 Umgang mit infektiösem Material

Die Arbeiten mit dem Scrapie-Erreger wurden nach §13 der Biostoffverordnung (BioStoffV) und §19ff des Bundesseuchengesetzes (BSeuchG) bei der zuständigen Behörde angezeigt. Alle Arbeiten mit infektiösem Material wurden in einem L3\*\*-Labor (BFEL, Karlsruhe) bzw. in einem L4-Labor (FLI, Tübingen) unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 und unter Verwendung entsprechender Schutzkleidung durchgeführt. Für eine detaillierte Beschreibung der Sicherheitsvorkehrungen siehe Beschluss 603 „Schutzmaßnahmen bei Tätigkeiten mit Transmissiblen spongiforme Enzephalopathie (TSE) assoziierter Agenzien in TSE-Laboratorien“ des Ausschusses für Biologische Sicherheit (ABAS, Ausgabe: BArbBl. 3/03). Kontaminierte Gegenstände wurden mit 2,5 M NaOH über Nacht inkubiert. Gebrauchte Pufferlösungen wurden auf 1 M NaOH eingestellt und ebenfalls über Nacht inkubiert und anschließend für 120 min bei 134 °C autoklaviert. Kontaminierte Gefäße und Festabfall wurden für 120 min bei 134 °C autoklaviert. Zur Inaktivierung von nicht mehr benötigtem infektiösem Material wurde dieses auf 1 M NaOH eingestellt und nach Inkubation über Nacht für 120 min bei 134 °C autoklaviert.

## 4.2 Aufarbeitung von infektiösem Material

Die Experimente zur Druckinaktivierung von infektiösem TSE-Material wurden mit dem Hamster-adaptierten Scrapie-Stamm 263K und dem Maus-adaptierten Scrapie-Stamm RML6 durchgeführt. Die Gehirne von an Scrapie erkrankten Hamstern wurden freundlicherweise von Prof. Dr. E. Pfaff vom Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Instituts (Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Tübingen) zur Verfügung gestellt.

### 4.2.1 Herstellung von Hamster-PrP<sup>Sc</sup>-Gehirnhomogenaten

Die Gehirne an Scrapie erkrankter Hamster wurden nach grober Zerkleinerung mit einem Skalpell in 100 mg Portionen aufgeteilt und in spezielle Gefäße mit Keramikkügelchen (1,4 mm ceramic spheres, Lysing Matrix D Tubes) mit 1 ml PBS pH 7,4 in einem Homogenisierungsinstrument (FastPrep® FP 120, Einstellung 4,5) zweimal für 45 sec homogenisiert. Durch auf- und abschütteln bei sehr hoher Geschwindigkeit werden die Zellwände zerstört und die in den Zellen enthaltene Proteine herausgelöst. Auf diese Weise erhält man ein sehr homogenes Gehirnextrakt mit dem infektiösen Prion-Protein PrP<sup>Sc</sup>. Um eine möglichst gleich bleibende Konzentration an PrP<sup>Sc</sup> im Homogenat zu gewährleisten wurden mehrere Pools mit der Konzentration von 0,1 g Gehirnmateriale/ml PBS aus mehreren infizierten Gehirnen hergestellt und bei -70 °C gelagert.

Für die Untersuchung des Einflusses des Homogenatmediums (pH-Wert, Salzkonzentration, verschiedene Pufferlösungen) auf das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup>, wurden die Gehirne unter Verwendung des jeweils angegebenen Mediums wie oben beschrieben homogenisiert.

### 4.2.2 Herstellung von Maus-PrP<sup>Sc</sup>-Gehirnhomogenaten

Die Gehirnhomogenate an Scrapie erkrankter Mäuse wurden bereits aufgearbeitet als 20 %iges Homogenat (0,2 g/ml) in 0,32 M Saccharose von Prof. L. Stitz und Mitarbeiter vom Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Instituts aus Tübingen erhalten.

### 4.2.3 Herstellung von PrP27-30-Gehirnhomogenaten

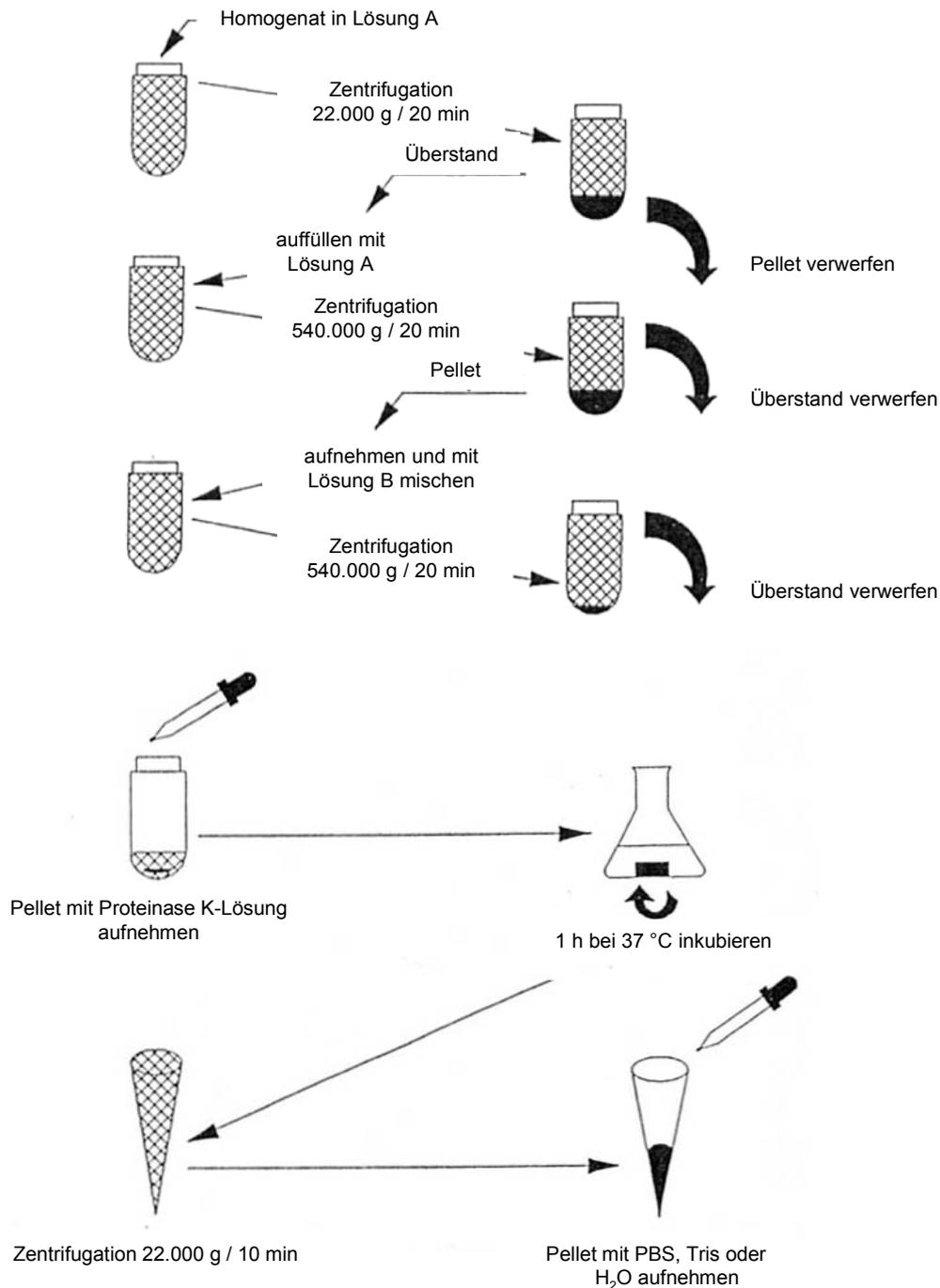
Zur Herstellung von PrP27-30-Gehirnhomogenaten (10 % w/v) aus Hirnen syrischer Goldhamster, die mit dem Scrapie-Stamm 263K infiziert wurden, sind diese zunächst wie oben beschrieben in dem jeweils angegebenen Medium homogenisiert worden. Die Homogenate wurden dann bei 37 °C für 1 h unter ständigem Schütteln in einem Thermomixer mit Proteinase K (Endkonzentration 72 µg/ml) behandelt. Die anschließende Inaktivierung der Proteinase K erfolgte durch Erhitzung der Homogenate für 10 min bei 90 °C. Durch die Proteinase K-Behandlung wurden neben den sonstigen enthaltenen Proteinen auch das zelluläre Prion-Protein PrP<sup>C</sup> vollständig und vom PrP<sup>Sc</sup> der N-Terminus abgebaut, so dass in dem Homogenat als einzige Proteinkomponente nur noch das PrP27-30 vorlag. Die Hirnextrakte wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

### 4.2.4 Isolierung von PrP27-30 aus Gehirnen Scrapie erkrankter Hamster

Die Extraktion und Aufreinigung des N-terminal verkürzten PrP27-30, wurde nach einer modifizierten Version der Methode von Hilmert und Diringer (1984) mittels Detergensextraktion und Ultrazentrifugation durchgeführt:

Zur Extraktion der Prion-Proteine wurde 1 g Hirnmaterial an Scrapie erkrankter Hamster mit 2,5 ml Detergensenlösung A wie in Kap. 4.2.1 beschrieben homogenisiert und anschließend 30 min stehen gelassen. Zur Zentrifugation wurde das Homogenat in Polycarbonatgefäße (Polyallomer Bell-top Quick-Seal™, 13 x 32 mm) überführt, diese wurden dann mit Detergensenlösung A vollständig aufgefüllt und anschließend thermisch verschlossen. Danach wurde in der Beckmann TL-100 Ultrazentrifuge mit dem Rotor TLA 100.3 für 10 min bei 4 °C bei 20.000 rpm (22.000 g) zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand in ein neues Polycarbonatgefäß überführt. Nach dessen Auffüllung mit Detergensenlösung A und Verschließung wurde erneut für 20 min bei 4 °C mit 100.000 rpm (540.000 g) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit Detergensenlösung B resuspendiert und nach Überführung in ein neues Polycarbonatgefäß nochmals für 25 min bei 4 °C mit 100.000 rpm (540.000 g) zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde mit 1,5 ml Proteinase K-Lösung (10 µg/ml) aufgenommen und bei 37 °C für 1 Stunde inkubiert. Nach abschließender Zentrifugation bei 22.000 g für 10 min in einem Mikrozentrifugengefäß wurde das Pellet mit 500 µl des jeweils angegebenen Mediums

(PBS, pH 7,4; 50 mM Tris, pH 7,0; Wasser) aufgenommen und nochmals wie zuvor zentrifugiert und wiederum mit dem angegebenen Medium aufgenommen. Nach Wiederholung des letzten Waschschrilles wurden die Lösungen bis zu ihrer weiteren Verwendung bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.



**Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Aufreinigung von PrP27-30.**

## 4.3 Hochdruckbehandlung von infektiösem Material

### 4.3.1 Hochdruckapparatur

Die Druckbehandlung erfolgte in einer Hochdruckapparatur (Laboratory Hydraulic Press U101) die manuell über eine Doppelkolben-Hydraulikpresse mit einer maximalen Kraft von 300 kN betrieben wird. Der Kolben hat eine Länge von 100 mm und kann bis 80 mm in den Druckbehälter mit einem inneren Durchmesser von 16 mm und einer Höhe von 150 mm geschoben werden. Der Druckbehälter ist ein Zylinder aus Stahl und besitzt ein Fassungsvermögen von ca. 20 ml und ermöglicht einen Arbeitsdruck bis 1300 MPa bei Temperaturen bis 100 °C. Der Druck im Behälter wird über ein Manganin-Druckmessgerät (MU101) gemessen und digital angezeigt. Die Kolbenposition wird ebenfalls digital angezeigt. Als druckübertragendes Medium wurde ein Gemisch aus Petroleumether (Siedebereich 80-100 °C) und Hydrauliköl (Viskosität 32) im Verhältnis von 7:3 verwendet. Der Effekt der adiabatischen Erhitzung wurde durch lange Druckaufbauzeiten (150 sec um 800 MPa zu erreichen) und durch kontinuierliches Temperieren des Druckbehälters mit einem Thermostat (Polystat) minimiert.



Abbildung 4.2: Hochdruckapparatur U101 (Polish Academy of Sciences).

### **4.3.2 Hochdruckbehandlung von aufgearbeitetem infektiösem Material**

Das aufgearbeitete infektiöse Material (Hirnextrakte und resuspendiertes iPrP27-30) wurde in 250 µl Polyethylen-Gefäße möglichst ohne Luft gefüllt. Anschließend wurden die Gefäßdeckel thermisch verschlossen und zusätzlich mit Teflonband abgedichtet. Um die Druckapparatur vor einer möglichen Kontamination mit infektiösem Material zu schützen, wurden die Probengefäße zur Sicherheit zusätzlich in eine mit Polyethylen beschichtete Alufolie eingeschweißt. Die Hochdruckbehandlung erfolgte wie beschrieben in der Hydraulikpresse U101. Die gedrückten Proben wurden nach der Behandlung bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

### **4.3.3 Hochdruckbehandlung von Gehirnen Scrapie erkrankter Hamster**

Die Hochdruckbehandlung von nicht homogenisierten Gehirnen erfolgte in speziellen Teflongefäßen für die oben beschriebene Hochdruckapparatur. Dazu wurde ein Gehirn (ca. 1g) eines an Scrapie erkrankten Hamsters grob mit einem Skalpell zerkleinert und in den Teflonbehälter möglichst ohne Luft gefüllt. Die Hochdruckbehandlung erfolgte wie oben beschrieben in der Hydraulikpresse U101. Das unter den angegebenen Bedingungen gedrückte Gehirn wurde nach der Druckbehandlung wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben homogenisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

## 4.4 Immunologischer Nachweis infektiöser Prion-Proteine

### 4.4.1 Nachweis von PrP<sup>Sc</sup> und PrP27-30 in Hirnextrakten von Hamstern

#### *Probenvorbereitung*

15 µl hochdruckbehandelte und unbehandelte Gehirnextrakte, die PrP<sup>Sc</sup> oder PrP27-30 enthalten wurden mit 3 µl Proteinase K-Gebrauchslösung 1:25 (PK-positiv Proben) unter Zugabe von 15 µl PK-Puffer für 1 h bei 37 °C inkubiert (Endkonzentration der PK: 72 µg/ml). Bei PK-negativ Proben wurde anstelle der PK-Lösung 3 µl 20 mM Tris-Puffer, pH 7,4 verwendet. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach Inkubation der Proben wurden diese bei 95 °C für 10 min mit 10 µl Ladepuffer behandelt und anschließend mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) getrennt.

#### *Elektrophorese und Western-Blot*

Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels denaturierender, diskontinuierlicher SDS-PAGE nach Laemmli (1970). Zur Herstellung vertikaler Plattengele (10 x 10 x 0,05 cm) wurde eine 10 %ige Trenngellösung zwischen zwei Glasplatten eingefüllt und mit Ethanol überschichtet. Nach Polymerisation und Entfernung von Ethanol wurde eine 5 %ige Sammelgellösung darüber geschichtet und mittels eines Kammes Taschen zur Auftragung der Proben in das Sammelgel gemacht.

Zur Auftrennung der Prion-Proteine wurden 10 µl der wie oben beschrieben vorbereitete Proben (35 µg Gehirnmaterial/µl) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde zunächst für 30 min bei 90 V und dann für weitere 120 min bei 110 V durchgeführt. Pro Gel wurden jeweils ein ECL-Molekulargewichtsmarker (14,4-97 kDa) und ein Prestained-Molekulargewichtsmarker (19-118 kDa) mitgeführt.

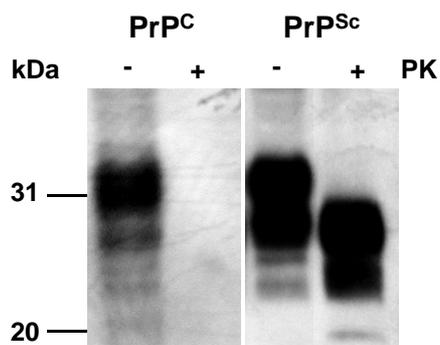
Die Detektion der Prion-Proteine erfolgte mittels Western-Blot-Technik. Dazu wurde das Gel nach vorsichtigem Herauslösen aus den Glasplatten und Abtrennung des Sammelgels auf eine mit Methanol getränkte PVDF-Membran (0,2 µm) gelegt, die auf drei mit Kathodenpuffer getränkten Filterpapieren liegt. Auf das Gel wurden wiederum ein mit Anodenpuffer-2 getränktes Filterpapier und zwei mit Anodenpuffer-1 getränkte Filterpapiere gelegt. Der Western-Blot wurde in einer Semidry-Blot-Apparatur für 30 min bei 130 mA und max. 9 V durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine mittels immunologischen Nachweises detektiert.

### ***Antikörperinkubation***

Freie Protein-Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Schwenken in Blockierlösung (5 % Magermilchpulver, 5 % Rinderserumalbumin) für 1 h geblockt. Anschließend wurde die Membran unter leichtem Schütteln über Nacht bei 4 °C mit dem Anti-PrP-Antikörper 3F4 (Maus IgG<sub>2A</sub>) inkubiert. Dazu wurden 3 µl Antikörper in 15 ml Blockierlösung (1. Antikörperlösung, 1:5000) gelöst. Der monoklonale Antikörper 3F4 erkennt die Aminosäuren 109-112 von denaturiertem PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> von Menschen, Hamster und Katzen. Nach der Inkubation mit der 1. Antikörperlösung wurde die Membran nach zweimaligem Spülen mit PBS-T viermal für 15 min mit PBS-T gewaschen. Danach wurde die Membran 90 min bei Raumtemperatur mit dem an Peroxidase gekoppelten Anti-Maus IgG-Antikörper inkubiert. Hierfür wurden 4 µl des Antikörpers in 12 ml PBS-T gelöst (2. Antikörperlösung, 1:3000). Zur Detektion des biotinylierten ECL-Molekulargewichtsmarkers wurden der 2. Antikörperlösung 8 µl an Peroxidase gekoppeltes Streptavidin zugegeben (1:1500). Zuletzt ist die Membran wie zuvor mit PBS-T gespült und gewaschen worden.

### ***Detektion durch Chemilumineszenz***

Die Detektion der Prion-Proteine erfolgt durch Chemilumineszenz. Dazu wurde die Membran 2 min in ECL-Lösung inkubiert und diese dann mit einer Folie, die auf die Membran gelegt wurde, wieder abgestrichen. Anschließend wurde ein hochsensitiver Autoradiographie-Film in einer Belichtungskassette für 30-90 s von der in Frischhaltefolie eingepackten Membran belichtet. Bei der Reaktion der an das Prion-Protein gebundenen Peroxidase mit ihrem Substrat wird Licht emittiert, das im Dunkeln den Film belichtet. Der belichtete Film wird je nach Belichtungsdauer in Entwicklerlösung für 30-120 s entwickelt, gewässert, fixiert und abschließend noch mal gewässert und schließlich getrocknet.



**Abbildung 4.3: Western-Blot von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>.**

Abbildung 4.3 zeigt die Resistenz von PrP<sup>Sc</sup> gegenüber Proteinase K(PK)-Verdau. Der Gehirnextrakt eines gesunden Hamsters (linkes Bild, PrP<sup>C</sup>-Präparation) und der eines an Scrapie erkrankten Hamsters (rechtes Bild, PrP<sup>Sc</sup>-Präparation) wurde wie oben beschrieben jeweils einmal mit PK (PK+) und einmal ohne PK (PK-) behandelt, anschließend gelelektrophoretisch getrennt, mittels Western-Blot auf eine Membran überführt und mit Hilfe von 3F4 anti-PrP-Antikörper markiert und nach ECL-Detektion fotografiert. Die rechten Spuren zeigen das charakteristische Verhalten von infektiösen Prionen im Western-Blot: der „down shift“ der PrP<sup>Sc</sup>-Bande nach PK-Verdau resultiert aus der Abspaltung des PK-sensitiven N-terminalen Fragments (ca. 67 Aminosäuren) von PrP<sup>Sc</sup>. Dadurch kommt es zu einer Verringerung des Molekulargewichtes von 30-33 kDa (PrP<sup>Sc</sup>) auf 27-30 kDa (PrP27-30). Dagegen wird das zelluläre Prion-Protein PrP<sup>C</sup> vollständig durch PK abgebaut, womit keine Bande mehr nachweisbar ist. Das Prion-Protein zeigt im Western-Blot drei Banden, die aus dem unterschiedlichen Glykosylierungsgrad resultieren. Die untere Bande entspricht der nicht, die mittlere der einfach und die obere der zweifach glykosylierten Form des Proteins.

#### 4.4.2 Nachweis von PrP<sup>Sc</sup> in Hirnextrakten von Mäusen

Der Nachweis von Maus-PrP<sup>Sc</sup> erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie der Nachweis von Hamster-PrP<sup>Sc</sup> mittels der Western-Blot-Technik, jedoch mit folgenden Modifikationen:

##### ***Probenvorbereitung***

15 µl hochdruckbehandelte und unbehandelte Gehirnextrakte Scrapie erkrankter Mäuse, wurden mit 1 µl Proteinase K-Gebrauchslösung 1:25 (PK-positiv Proben) und/oder mit 1 µl 20 mM Tris-Puffer, pH 7,4 (PK-negativ Proben) unter Zugabe von 15 µl PK-Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert (Endkonzentration der PK: 25 µg/ml). Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach dem Verdau mit PK wurden die Proben bei 95 °C für 10 min mit 10 µl Ladepuffer behandelt und anschließend mittels SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) getrennt.

### ***Elektrophorese und Western-Blot***

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Maus-Prion-Proteine sowie die Durchführung des Western-Blots erfolgten analog zum Nachweis von Hamster-PrP<sup>Sc</sup>.

### ***Antikörperinkubation***

Freie Protein-Bindungsstellen auf der Membran wurden durch Schwenken in Blockierlösung für 1 h geblockt. Anschließend wurde die Membran unter langsamen Schwenken über Nacht bei 4 °C mit dem Anti-PrP-Antikörper POM1 inkubiert. Dazu wurden 3 µl Antikörper in 15 ml Blockierlösung gelöst (1. Antikörperlösung, 1:5000). Der monoklonale Antikörper POM1 erkennt spezifisch denaturiertes PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup> der Maus. Nach der Inkubation mit der 1. Antikörperlösung wurde die Membran nach zweimaligem Spülen mit PBS-T viermal für 15 min mit PBS-T gewaschen. Danach wurde die Membran 90 min bei Raumtemperatur mit dem an Peroxidase gekoppelten Anti-Maus IgG-Antikörper inkubiert. Hierfür wurden 4 µl des Antikörpers in 12 ml PBS-T gelöst (2. Antikörperlösung, 1:3000).

### ***Detektion durch Chemilumineszenz***

Die Detektion mittels ECL wurde wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben durchgeführt.

#### **4.4.3 Nachweis des isolierten PrP27-30 (iPrP27-30)**

10 µl hochdruckbehandeltes oder unbehandeltes aufgereinigtes Material, das isoliertes PrP27-30 (iPrP27-30) enthält wurde mit 3 µl PK-Gebrauchslösung 1:100 (Endkonzentration der PK 46 µg/ml) und/oder mit 3 µl 20 mM Tris-Puffer, pH 7,4 versetzt. Nach anschließender Inkubation bei 37 °C für 1 h wurde den Proben 10 µl Ladepuffer zugegeben und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Die gelelektrophoretische Trennung der Proben, sowie der Western-Blot, die Antikörperinkubation und die Visualisierung der Prion-Proteine mittels Chemilumineszenz erfolgte wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben.

---

## 4.5 Elektronenmikroskopischer Nachweis der Prionrods

Der Nachweis der Prionrods erfolgte nach Aufreinigung infektiösen Materials (Kap. 4.2.4) im Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM). Dazu wurde iPrP27-30 nach der Isolierung mit 50 µl Wasser aufgenommen und einem „negativ staining“ unterzogen. Zunächst mussten Formvar®-Kohle-Kupfernetzchen (3 mm Durchmesser, 300 mesh) beglimmt werden, bevor sie mit 10 µl Probenvolumen beschichtet werden konnten. Nach 5-minütiger Inkubation wurden die Netzchen vorsichtig mit Filterpapier abgetupft. Die Färbung erfolgte mit dem Kaliumsalz der Phosphorwolframsäure (2 % w/v). Nach 7 Minuten wurde die Färbelösung vorsichtig mit einem Filterpapier entfernt. Die getrockneten Proben wurden anschließend im Transmissions-Elektronenmikroskop Zeiss 910 bei 80 kV und einer Vergrößerung von 20.000 bis 50.000 betrachtet.

## 4.6 Bioassays zur Infektiositätsbestimmung

Die Durchführung der für die Bestimmung der Infektiosität des mit Hochdruck behandelten TSE-Materials notwendigen Bioassays wurden in Kooperation mit Prof. Dr. E. Pfaff und Prof. Dr. M. Büttner und Mitarbeiter vom Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Instituts (Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Tübingen) vorgenommen.

### 4.6.1 Bioassays mit Syrischen Goldhamstern

Die Proben wurden unmittelbar vor Inokulation aufgetaut und mit einem Vortex gut gemischt. Pro Probenansatz wurden mehrere Verdünnungen ( $10^{-1}$  bis  $10^{-5}$ ) der unbehandelten bzw. druckbehandelten Proben zur Inokulation vorbereitet. Pro Verdünnung wurden 3 bis 6 syrischen Goldhamstern jeweils 150  $\mu$ l Probenmaterial intrazerebral inokuliert. Kontroll-Hamster bekamen 140 mM NaCl-Lösung intrazerebral verabreicht. Die Inokulationen erfolgten nach vorheriger Ether-Anästhesie mit einer 26-gauge Nadel ca. 3 mm tief in den linken Parietallappen.

Die Hamster wurden über einen Zeitraum von mind. 270 Tagen (9 Monate) beobachtet und anschließend bzw. bei Erreichen des terminalen Krankheitsstadiums getötet. Zu den klinischen Zeichen der Scrapie zählen Verhaltens-, Sensibilitäts- und Bewegungsstörungen. Deutliche Anzeichen einer Erkrankung der Hamster an Scrapie sind Schwierigkeiten beim Aufrichten aus der Rückenlage sowie der besonders ausgeprägte breitbeinige Gang der Hinterbeine. Während des Terminalstadiums der Scrapie liegen die erkrankten Hamster ruhig auf der Seite.

Das Gehirn wurde unmittelbar nach der Entnahme bei  $-70$  °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Sowohl die Gehirne von nicht erkrankten als auch die von erkrankten Hamstern wurden im Western-Blot auf PK-resistentes PrP<sup>Sc</sup> hin untersucht.

Die Berechnung des Infektiositätstiters erfolgte über die Inkubationszeit und wurde mit folgender Formel nach Prusiner et al. 1982a vorgenommen:

$$\log ID_{50}/ml = 26,66 - 12,99 \log (T_i - 40) - \log D$$

Mit  $\log ID_{50}/ml$  = Titer in log infektiösen Einheiten pro ml Originalprobe,  $T_i$  = Inkubationszeit in Tagen und  $\log D$  = Verdünnungsfaktor der Originalprobe im

Inokulum. Anhand des eingesetzten Gehirnmaterials wurde in  $\log ID_{50}/g$  Gehirnmateriale umgerechnet.

Die Formel beruht auf Auswertungen der Inkubationszeiten zahlreicher Tierversuche mit infektiösen Hamstergehirnhomogenaten unterschiedlichster Titer. Die Titer der verwendeten Homogenate wurden mittels Endpunkttitrationen und anschließender Berechnung des  $ID_{50}$ -Wertes nach der Methode von Kärber (1931) ermittelt. Aus der Beziehung zwischen der Injektionsdosis (Titer x Verdünnung) und der Inkubationszeit wurde eine lineare Funktion abgeleitet. Um die lineare Beziehung zwischen Inkubationszeit und Dosis zu maximieren wurde zusätzlich ein Zeitfaktor von 40 eingeführt, mit diesem Faktor beträgt der Regressionskoeffizient der Geraden 0,87. Der Vergleich von Infektiositätstiter, die sowohl mittels obiger Formel kalkuliert als auch aus Endpunkttitrationen errechnet wurden, zeigte eine Übereinstimmung von  $\pm 0,5 \log ID_{50}/g$  (Prusiner et al. 1982a).

#### 4.6.2 Bioassays mit Tga20-Mäusen

Die Bioassays mit Tga20-Mäusen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. L. Stitz und Mitarbeiter vom Institut für Immunologie des Friedrich-Loeffler-Instituts (Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Tübingen) durchgeführt.

Tga20-Mäuse sind transgene Mäuse, die das zelluläre Prion-Protein etwa achtfach überexprimieren. Aufgrund dessen erkrankten diese Mäuse nach erheblich kürzeren Inkubationszeiten an Scrapie, so dass dadurch ein schnelles System zur Ermittlung der Erregerinaktivierung zur Verfügung steht.

Die zu untersuchenden Proben wurden unmittelbar vor Inokulation aufgetaut und mit einem Vortex gut gemischt. Pro Probenansatz wurden Verdünnungen des TSE-Agens von  $10^{-1}$  bis  $10^{-9}$  zur Inokulation vorbereitet. Pro Verdünnung wurden 3 bis 7 Tga20-Mäusen jeweils 50  $\mu l$  Probenmaterial intrazerebral inokuliert. Kontrolltiere bekamen 140 mM NaCl-Lösung intrazerebral verabreicht. Die Inokulationen erfolgten wie bei den Hamstern nach vorheriger Ether-Anästhesie mit einer 26-gauge Nadel ca. 3 mm tief in den linken Parietallappen.

Die Mäuse wurden über einen Zeitraum von mind. 300 Tagen (10 Monate) beobachtet und anschließend bzw. bei Erreichen des terminalen Krankheitsstadiums getötet. Die Pathogenese ist durch ähnliche Symptome, wie sie bei Hamster

auftreten, gekennzeichnet. Unmittelbar nach der Entnahme des Gehirnes wurde es bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Sowohl die Gehirne von nicht erkrankten als auch die von erkrankten Mäusen sind im Western-Blot auf PK-resistentes PrP<sup>Sc</sup> hin untersucht worden.

Die Berechnung des Infektiositätstiters erfolgte nach der 50 %-Endpunktmethode von Reed und Muench (1938). Diese Methode ermöglicht die Ermittlung des 50 %-Endpunktes einer Serum- bzw. Virus-Titration. Als 50 %-Endpunkt wird dabei diejenige Verdünnung des infektiösen Agens angesehen, bei der die Hälfte der Versuchstiere eine Reaktion auf das verabreichte Agens zeigt. In der hier durchgeführten Titration ist die zu erwartende Reaktion die Erkrankung der Tiere an Scrapie. Da es vorher nicht abschätzbar ist, bei welcher Verdünnung der Endpunkt erreicht wird, ist es nötig, eine Vielzahl von Versuchstieren mit verschiedenen Verdünnungen des infektiösen Materials zu injizieren. Der Vorteil der hier angewandten Methode liegt an der Miteinbeziehung der gesamten Anzahl der Versuchstiere in die Berechnung. Dies erfolgt unter der Annahme, dass ein Versuchstier, welches bei einer gegebenen Verdünnung eine Reaktion auf die injizierte Substanz gezeigt hat, auch bei einer geringeren Verdünnung darauf reagiert hätte. Auf diese Weise erhöht sich die Anzahl der erkrankten Tiere einer gegebenen Verdünnung um die Anzahl, der bei niedrigeren Dosen erkrankten Tiere. Sind beispielsweise bei der Verdünnung  $10^{-1}$  fünf, bei  $10^{-2}$  vier und bei  $10^{-3}$  drei Versuchstiere an Scrapie erkrankt, so wird nach der Methode von Reed und Muench angenommen, dass die Tiere, die bei den höheren Verdünnungen ( $10^{-2}$  und  $10^{-3}$ ) eine Reaktion auf das injizierte Agens zeigten, auch bei der niedrigeren Verdünnung ( $10^{-1}$ ) eine Reaktion gezeigt hätten. Demnach erhöht sich die in die Titerberechnung eingehende Zahl der bei der Verdünnung von  $10^{-1}$  erkrankten Tiere von fünf auf zwölf, bzw. bei der Verdünnung von  $10^{-2}$  von vier auf sieben Mäuse.

Die Kalkulation des genauen Endpunktes der Titration erfolgt nach folgenden Formeln:

Formel zur Berechnung des proportionalen Abstandes vom Endpunkt (50 % der Versuchstiere an Scrapie erkrankt) zur nächst kleineren Verdünnung (die eine Mortalität oberhalb 50 % aufweist):

---

$$\frac{(\text{Mortalität der nächst kleineren Verdünnung}) - 50\%}{(\text{Mortalität der nächst kleineren Verdünnung}) - (\text{Mortalität der nächst höheren Verdünnung})}$$

Da die Verdünnungen logarithmisch ansteigen, wird der Endpunkt logarithmisch angegeben:

$$\begin{aligned} & \text{Logarithmus der nächst kleineren Verdünnung zum Endpunkt} \\ & + \text{proportionaler Abstand dieser Verdünnung zum Endpunkt} * \log(\text{Verd.faktor}) \end{aligned}$$

---

Summe (log Endpunkt)

Der Infektiositätstiter  $ID_{50}$  gibt die Dosis in Infektiositätseinheiten pro ml injiziertes infektiöses Material an, bei der 50 % der Versuchstiere mit Scrapie infiziert worden sind. Da eine Infektion mit Scrapie stets tödlich verläuft, kann der  $ID_{50}$ -Wert auch als  $LD_{50}$  angegeben werden.

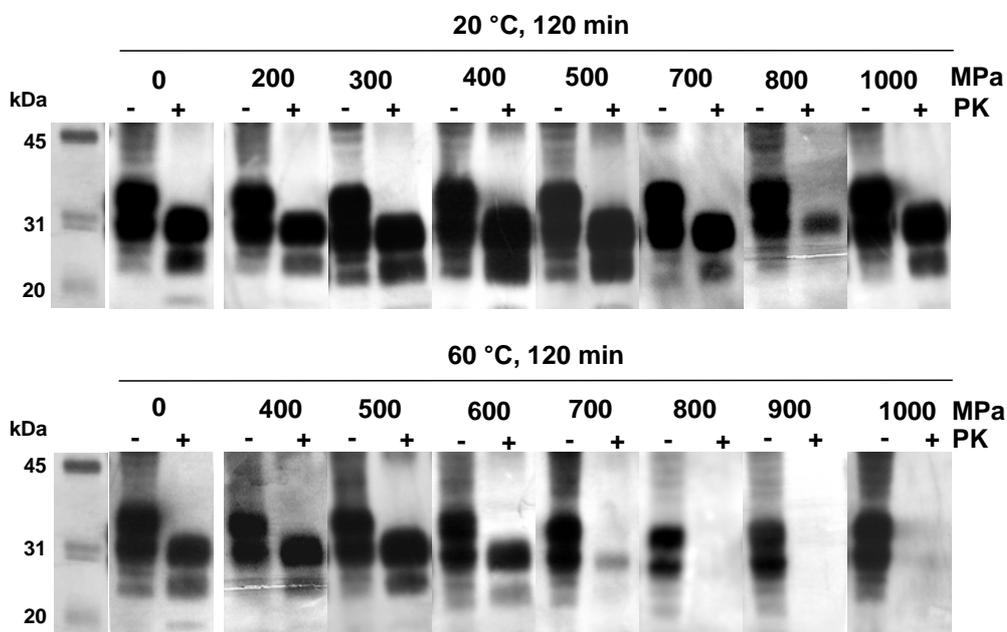
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Hochdruckbehandlung von PrP<sup>Sc</sup>

#### 5.1.1 Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von Hamster-PrP<sup>Sc</sup>

Der Einfluss einer Hochdruckbehandlung auf die Resistenz von PrP<sup>Sc</sup> gegenüber Proteinase K wurde anhand der Immuno-Western-Blot-Technik untersucht. Während PK-resistentes Material nach PK-Verdau mittels Detektion der PrP<sup>Sc</sup>-Banden im Immunoblot nachweisbar ist, zeigt PK-sensitives Material nach dem Verdau keine detektierbaren Protein-Banden mehr (Abb. 4.3).

Gehirne von Scrapie erkrankten Hamstern, die in PBS, pH 7,4 homogenisiert wurden (10 % w/v), sind bei 20 °C und 60 °C für 120 min mit Drücken von 100 bis 1000 MPa behandelt und anschließend mittels Western-Blot untersucht worden. Nach der Hochdruckbehandlung wurde das Lysat mit (PK+) und ohne (PK-) Proteinase K inkubiert. Als Kontrolle wurde unbehandeltes (20 °C) und erhitztes (bei 60 °C für 120 min) Gehirnhomogenat untersucht. Abbildung 5.1 zeigt die resultierenden Immunoblots der Proben.

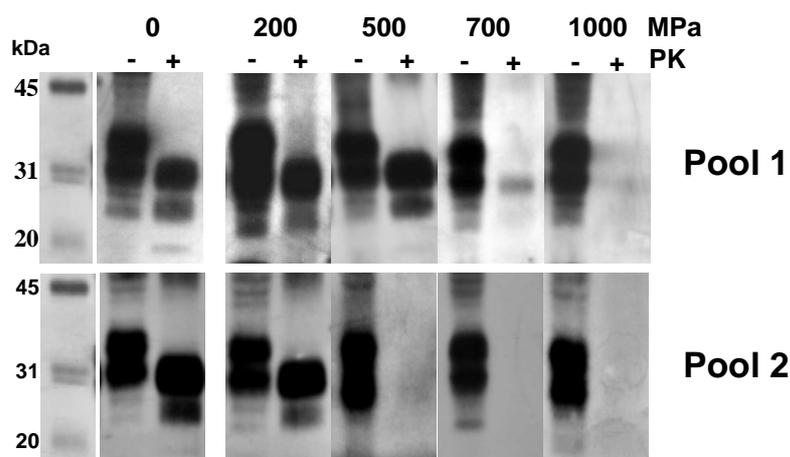


**Abbildung 5.1: Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von Hamster-PrP<sup>Sc</sup>.**

Immunologische Western-Blot-Detektion von Hamster-PrP<sup>Sc</sup>. Proben wurden bei 20 °C und 60 °C für 120 min mit 200-1000 MPa gedrückt. Kontrollen sind druckunbehandelte Proben. (-), PK unbehandelt; (+), PK behandelt. Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Doppelbestimmungen durchgeführt.

Beide Kontrollproben zeigen den charakteristischen „down shift“ der PrP<sup>Sc</sup>-Banden, der aus der N-terminalen Abspaltung von ca. 67 Aminosäuren resultiert. Der Western-Blot zeigt, dass eine zweistündige Temperaturbehandlung bei 60 °C keinen Einfluss auf die PK-Resistenz von PrP<sup>Sc</sup> nimmt. Die bei 20 °C für zwei Stunden gedrückten PK-resistenten Proben zeigen ab einem angewandten Druck von 700 MPa eine leichte Abnahme der Intensität des PK-resistenten Prion-Proteins (PrP<sup>res</sup>), dies bedeutet, dass ein geringer Anteil der PK-Resistenz von PrP<sup>Sc</sup> in diesem Druckbereich verloren ging. Das bei 60 °C gedrückte PK-resistente Hirnhomogenat zeigt dagegen eine deutliche druckabhängige Reduktion der PK-Resistenz. Ab 600 MPa kommt es zu einer Intensitätsabnahme der PrP<sup>res</sup>-Banden, ab einem Druck von 800 MPa ist mit dem hier angewandten immunologischen Nachweissystem kein PK-resistentes Material mehr detektierbar. Aus den Ergebnissen ist zu erkennen, dass eine Behandlung bei 800 MPa unter erhöhter Temperatur bei Hamster-PrP<sup>Sc</sup> eine PK-Sensitivität induziert.

Bei der Untersuchung mehrerer Pools aus Scrapie infizierten Hamstergehirnen (10 % w/v in PBS) wurden ähnliche Ergebnisse erhalten (Abb. 5.2). Dabei stellte sich heraus, dass ab einem Druck von 800 MPa bei 60 °C für zwei Stunden in allen untersuchten Hamstergehirnhomogenaten kein PrP<sup>res</sup> mehr mittels Immunoblot nachweisbar war. Im Übergangsbereich von 500-700 MPa wurden unterschiedliche Ergebnisse beobachtet, so zeigten einige Pools in diesem Bereich eine größere Druckstabilität des enthaltenen PrP<sup>Sc</sup> als andere.



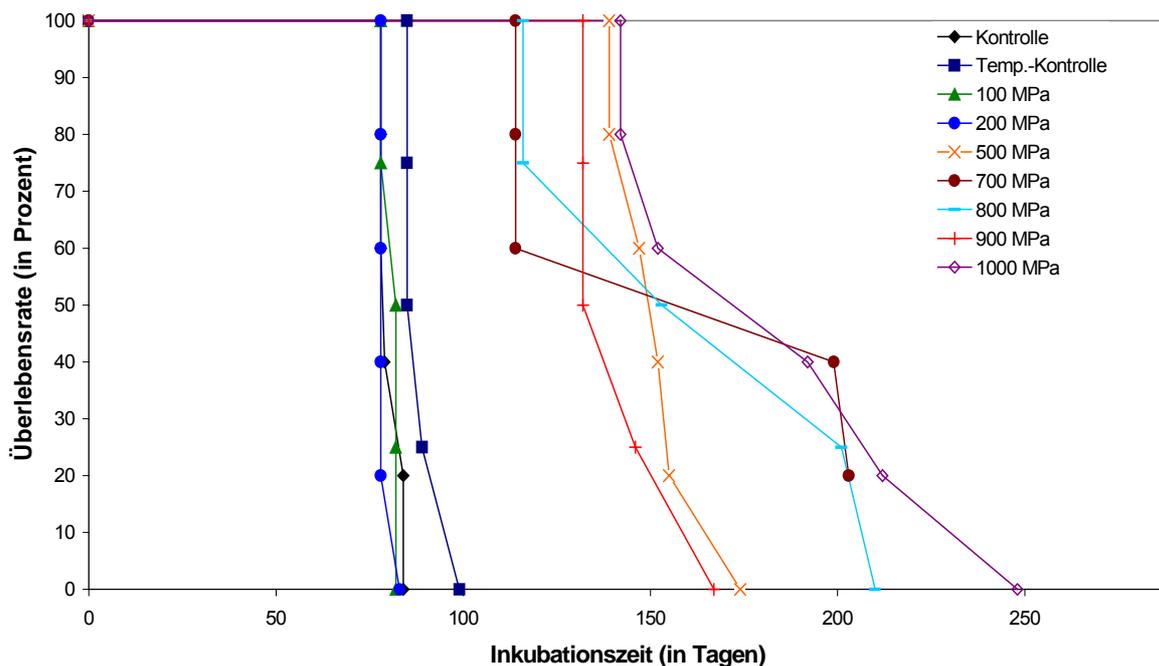
**Abbildung 5.2: Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz verschiedener Hamster-PrP<sup>Sc</sup>-Pools.**

Proben verschiedener Pools aus Gehirnen Scrapie infizierter Hamster (10 % w/v in PBS) wurden mit 200-1000 MPa bei 60 °C für 120 min behandelt und anschließend im Western-Blot untersucht.

### 5.1.2 Einfluss von Hochdruck auf die Infektiosität von Hamster-PrP<sup>Sc</sup>

Um Aufschluss über die Wirkung von Hochdruck auf die Infektiosität von PrP<sup>Sc</sup> zu erlangen, sind Infektiositätsversuche mit Syrischen Goldhamstern durchgeführt worden. Tierversuche sind das empfindlichste Nachweissystem von PrP<sup>Sc</sup>, so dass letztendlich die Ergebnisse aus diesen Versuchen genaue Informationen über den Einfluss einer Hochdruckbehandlung auf infektiöses Scrapie-Material geben können. Der Nachweis mittels Western-Blot-Technik von PrP<sup>res</sup> als Indiz für Infektiosität ist dagegen weitaus weniger sensitiv.

In Abbildung 5.3 sind die Inkubationszeiten der einzelnen Hamster, denen Kontrollproben und druckbehandelte Proben intrazerebral inokuliert wurden, dargestellt. Bei den hier im Tierversuch verwendeten Druckproben handelte es sich um den in Abbildung 5.2 dargestellten Pool 2, bei dem im Western-Blot ab einem Druck von 500 MPa kein PrP<sup>Sc</sup> mehr nachweisbar war.



**Abbildung 5.3: Inkubationszeiten von druckbehandeltem Hamster-PrP<sup>Sc</sup>.**

Inkubationszeiten erkrankter Hamster nach intrazerebraler Inokulation von 1,5 mg unbehandeltem, temperaturbehandeltem und druckbehandeltem Gehirnmateriale (10 % w/v in PBS, pH 7,4) Scrapie erkrankter Hamster.

Die Inkubationszeit des Hamster-adaptierten Scrapie-Stammes 263K betrug bei den Kontrollen  $81 \pm 3$  Tage und bei den Temperaturkontrollen ( $60\text{ °C}$ ,  $120\text{ min}$ )  $90 \pm 6$  Tage. Die 100 und 200 MPa Druckproben zeigten im gleichen Zeitraum ebenfalls eine 100 %ige Infektiosität (100 MPa:  $81 \pm 2$  Tage, 200 MPa:  $79 \pm 2$  Tage). Diese Ergebnisse stimmen mit denen der Western-Blots, bei denen PK-resistentes Prion-Protein nachgewiesen werden konnte, überein (Abb. 5.2, Pool 2). Im Gegensatz dazu konnte bei den mit Drücken ab 500 MPa behandelten Proben im Western-Blot kein PrP<sup>res</sup> mehr nachgewiesen und im Tierversuch eine deutliche Erhöhung der Inkubationszeit beobachtet werden. Durch eine Druckbehandlung oberhalb 500 MPa bei  $60\text{ °C}$  für  $120\text{ min}$  konnte somit der Ausbruch der Krankheit von 78-85 Tagen auf 114-142 Tagen verzögert werden. In Tabelle 5.1 sind die Inkubationszeiten der Druckproben und die damit verbundene Reduktion des log ID<sub>50</sub> Wertes dargestellt.

**Tabelle 5.1: Inkubationszeiten und Infektiositätstiter von druckbehandeltem Hamster-PrP<sup>Sc</sup>.**

Inkubationszeiten und Infektiositätstiter erkrankter Hamster nach intrazerebraler Inokulation von 1,5 mg unbehandeltem, temperaturbehandeltem und druckbehandeltem Gehirnmateriale (10 % w/v in PBS, pH 7,4) Scrapie erkrankter Hamster. Der Infektiositätstiter wurde nach der Formel von Prusiner et al. 1982a berechnet und in log ID<sub>50</sub>-Einheiten pro g Gehirnmateriale angegeben.

Probe	PrP <sup>Sc</sup> -Nachweis im Western-Blot	Inkubationszeit (in Tagen)	Infektiositätstiter (log ID <sub>50</sub> /g)
<b>Kontrolle</b>	positiv	$81 \pm 3$	8,59
<b>60 °C, 120 min</b>	positiv	$90 \pm 6$	7,47
<b>100 MPa, 60 °C, 120 min</b>	positiv	$81 \pm 2$	8,53
<b>200 MPa, 60 °C, 120 min</b>	positiv	$79 \pm 2$	8,82
<b>500 MPa, 60 °C, 120 min</b>	negativ	$153 \pm 12$	2,79
<b>700 MPa, 60 °C, 120 min</b>	negativ	$158 \pm 44$	2,59
<b>800 MPa, 60 °C, 120 min</b>	negativ	$170 \pm 38$	2,50
<b>900 MPa, 60 °C, 120 min</b>	negativ	$144 \pm 14$	3,27
<b>1000 MPa, 60 °C, 120 min</b>	negativ	$189 \pm 39$	1,25

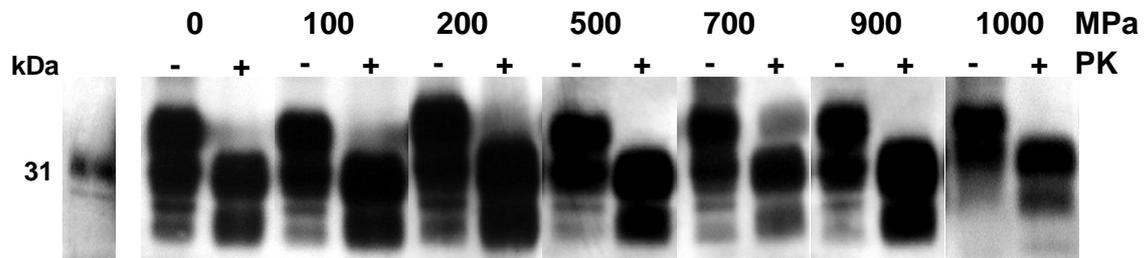
Eine Hochdruckbehandlung von Hamster-PrP<sup>Sc</sup> bei Drücken ab 500 MPa und gleichzeitiger Erhitzung auf 60 °C für 120 min führt nahezu zu einer Verdoppelung der Inkubationszeit. Die Erhöhung der Inkubationszeit von ca. 85 Tage im Falle der Kontrollen auf ca. 160 Tage für die bei 500-1000 MPa behandelten Proben bedeutet gleichzeitig eine Reduktion des Infektiositätstiters um ca. 5-7 log ID<sub>50</sub> Einheiten/g. Die Tierversuchsergebnisse konnten zudem die Ergebnisse aus den Western-Blot-Analysen bestätigen. Die Proben, bei denen nach der Druckbehandlung kein PrP<sup>res</sup> mehr nachweisbar war, zeigten im Tierversuch eine deutlich reduzierte Infektiosität von Hamster-PrP<sup>Sc</sup>. Dass es trotz fehlendem Nachweis von PrP<sup>Sc</sup> im Western-Blot zum Ausbruch von Scrapie bei den Versuchstieren kam, deutet darauf hin, dass diese Nachweismethode in ihrer Sensitivität begrenzt ist. Demnach bleibt ein geringer, im Western-Blot nicht nachweisbarer Anteil von PrP<sup>Sc</sup> nach der Druckbehandlung PK-resistent. Dieser verbliebene Rest enthält genügend Infektiosität um bei den Versuchstieren nach intrazerebraler Inokulation Scrapie auszulösen. Dies konnte durch die Inokulation mit PK behandelte Druckproben bestätigt werden. Dazu wurden Proben die bei 700 MPa und 900 MPa bei 60 °C für 120 min gedrückt wurden, nach der Druckbehandlung mit PK verdaut und nach anschließender Inaktivierung der PK intrazerebral in Hamster inokuliert. Bei diesen Proben konnte die gleiche Reduktion der Infektiosität wie bei den unverdaut inokulierten Druckproben beobachtet werden (Tabelle 5.2).

**Tabelle 5.2: Inkubationszeiten und Infektiositätstiter von druckbehandeltem Hamster-PrP<sup>Sc</sup> vor und nach PK-Verdau.**

Inkubationszeiten und Infektiositätstiter erkrankter Hamster nach intrazerebraler Inokulation von 1,5 mg druckbehandeltem (bei 60 °C für 120 min) Gehirnmateriale (10 % w/v in PBS, pH 7,4) Scrapie erkrankter Hamster. PK+ Druckproben wurden mit 72 µg PK/ml bei 37 °C für 1 h inkubiert, die anschließende Inaktivierung der PK erfolgte bei 90 °C für 10 min. Der Infektiositätstiter wurde nach der Formel von Prusiner et al. 1982a berechnet und in log ID<sub>50</sub>-Einheiten pro g Gehirnmateriale angegeben

<b>inokulierte Probe</b>	<b>700 MPa PK-</b>	<b>700 MPa PK+</b>	<b>900 MPa PK-</b>	<b>900 MPa PK+</b>
<b>PrP<sup>Sc</sup>-Nachweis im Western-Blot</b>	negativ	negativ	negativ	negativ
<b>Inkubationszeit (in Tagen)</b>	158 ± 44	158 ± 23	144 ± 14	155 ± 26
<b>Infektiositätstiter (log ID<sub>50</sub>/g)</b>	2,59	2,58	3,27	2,70

Die Diagnose der Erkrankung der Hamster an Scrapie erfolgte durch die typischen klinischen Anzeichen und wurde zusätzlich durch immunologische Analysen bestätigt (Abb. 5.4).

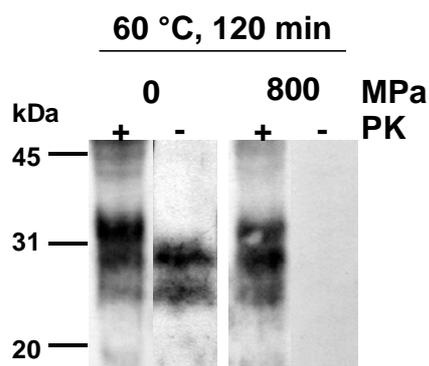


**Abbildung 5.4: Immunologischer Nachweis von PrP<sup>Sc</sup> in Scrapie-Gehirnen.**

Die Gehirne der Hamster, die unbehandeltes und bei 100-1000 MPa bei 60 °C für 120 min behandeltes infiziertes Gehirnhomogenat intrazerebral verabreicht bekamen, wurden nach Ausbruch der Krankheit immunologisch auf PrP<sup>Sc</sup> hin untersucht.

### 5.1.3 Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von Maus-PrP<sup>Sc</sup>

Um ausschließen zu können, dass es sich bei der druckinduzierten Reduktion der PK-Resistenz und Infektiosität von Hamster-PrP<sup>Sc</sup> um einen spezifischen Effekt, der nur bei Hamster-Prionen zu beobachten ist, handelt, wurde das Druckverhalten von Maus-Prionen ebenfalls untersucht. Abbildung 5.5 zeigt den Effekt einer Hochdruckbehandlung auf die PK-Resistenz von Maus-PrP<sup>Sc</sup>.



**Abbildung 5.5: Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von Maus-PrP<sup>Sc</sup>.**

Western-Blot-Detektion von Maus-PrP<sup>Sc</sup> mit POM1-Antikörper. Probe wurde bei 800 MPa und 60 °C für 120 min behandelt. Kontrolle ist eine druckunbehandelte Probe. (-), PK-unbehandelt; (+), PK-behandelt. Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Doppelbestimmungen durchgeführt.

Das infektiöse Maus-Prion-Protein stellte sich, wie auch schon zuvor das Hamster-Prion-Protein als drucksensitiv heraus. Die Behandlung von 20 %igem (w/v) Hamstergehirnhomogenat Scrapie erkrankter Mäuse bei 800 MPa und 60 °C für 120 min führt zu einem Verlust der PK-Resistenz unterhalb der Nachweisgrenze. Damit konnte gezeigt werden, dass Hochdruck in der Lage ist, sowohl beim PrP<sup>Sc</sup> vom Hamster als auch von der Maus eine PK-Sensitivität zu induzieren.

#### 5.1.4 Einfluss von Hochdruck auf die Infektiosität von Maus-PrP<sup>Sc</sup>

Inwieweit die im Immunoblot beobachtete Reduktion der PK-Resistenz des Maus-PrP<sup>Sc</sup> auch mit einem Infektiositätsverlust verbunden ist, wurde mit Infektionsversuche mit Tga20-Mäusen geklärt. Dazu wurde je Verdünnung ( $10^{-1}$  bis  $10^{-9}$ ) 50 µl unbehandeltes, temperatur- und druck/temperaturbehandeltes infektiöses Gehirnhomogenat den Versuchstieren intrazerebral inokuliert. In Tabelle 5.3 sind die Ergebnisse der  $10^{-3}$  Verdünnung (entspricht 10 µg Gehirnmateriale) dargestellt.

**Tabelle 5.3: Inkubationszeiten und Infektiositätstiter von druckbehandeltem Maus-PrP<sup>Sc</sup>.**

Inkubationszeiten und Infektiositätstiter erkrankter Tga20-Mäuse. Gehirnmateriale (20 % w/v in Saccharose) an Scrapie erkrankter Mäuse wurde bei 800 MPa und 60 °C für 120 min behandelt und anschließend 50 µl einer zuvor  $10^{-3}$  verdünnten Probe (10 µg Gehirnmateriale) intrazerebral inokuliert. Der Infektiositätstiter wurde nach der Methode von Reed und Münch berechnet und in log ID<sub>50</sub>-Einheiten pro g infektiöses Gehirnmateriale (log ID<sub>50</sub> u/g) angegeben.

Probe	Inkubationszeit (Tage)	Infektiositätstiter (log ID <sub>50</sub> u/g)
Kontrolle	69 ± 0	7,6
Temperatur-Kontrolle	80 ± 0	6,2
Druckprobe	134 ± 24	3,4

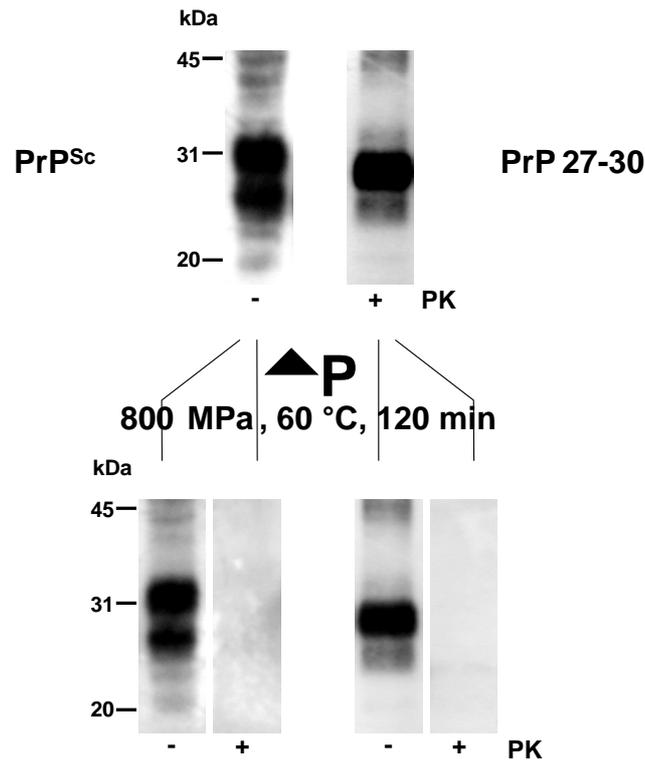
Die Behandlung des Scrapie-adaptierten Maus-Stammes RML6 mit einem Druck von 800 MPa bei 60 °C für 120 min führt zu einer Reduktion der Infektiosität von 4,2 log ID<sub>50</sub> u/g. Die zuvor beschriebene Drucksensitivität von Hamster-PrP<sup>Sc</sup> konnte damit auch auf das infektiöse Maus-Prion-Protein übertragen werden. Damit konnte gezeigt werden, dass der Druckeffekt auf PrP<sup>Sc</sup> nicht hamsterspezifisch ist, wodurch bestätigt werden konnte, dass hydrostatischer Druck in Verbindung mit Temperatur die Struktur und somit die Infektiosität des infektiösen Prion-Proteins PrP<sup>Sc</sup> entscheidend beeinflussen kann.

## 5.2 Hochdruckbehandlung von PrP27-30

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Druck in Kombination mit erhöhter Temperatur bei infektiösen und PK-resistenten PrP<sup>Sc</sup> eine PK-Sensitivität induzieren kann, und dies gleichzeitig mit einer Reduktion der Infektiosität einhergeht, wurde als nächstes der Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz und Infektiosität von PrP27-30 ebenfalls untersucht. Dazu wurde pathogenes Hamstergehirnhomogenat (10 % w/v in PBS, pH 7,4) zunächst mit PK verdaut und anschließend mit Hochdruck behandelt. Da nach dem Verdau des Lysats mit Protease als einzige Protein-komponente im Gehirnhomogenat nur das infektiöse PrP27-30 vorliegt, konnte somit der Effekt von Hochdruck auf den PK-resistenten Teil des Prion-Proteins in der Gehirnmatrix untersucht werden. Zur Untersuchung dieses Effektes wurden die Bedingungen (800 MPa, 60 °C, 120 min), die sich zuvor bei PrP<sup>Sc</sup> am effektivsten erwiesen haben, gewählt.

### 5.2.1 Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von PrP27-30

Abbildung 5.6 zeigt den Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von PrP27-30 im Vergleich zu PrP<sup>Sc</sup>. Daraus ist ersichtlich, dass PrP<sup>Sc</sup> und PrP27-30 gleiches Verhalten unter Druck aufweisen. Die Ergebnisse zeigen, dass auch das *N*-terminal verkürzte Prion-Protein PrP27-30 in Gehirnhomogenat ein drucksensitives Verhalten, das zum Verlust der PK-Resistenz führt, besitzt. Mit diesem Versuch konnte somit bestätigt werden, dass pathogene Prion-Proteine während der Druckbehandlung von 800 MPa bei 60 °C für 120 min die Resistenz gegenüber dem Abbau durch Proteasen verlieren. Da PrP27-30 nach der Druckbehandlung im unverdauten Zustand (PK-) im Western-Blot nachweisbar ist, kann eine Aggregation von PrP27-30 bzw. PrP<sup>Sc</sup> unter Druck, die zu fälschlichen Ergebnissen beim gelelektrophoretischen Nachweis hätte führen können, ausgeschlossen werden. Der Versuch zeigte, dass die PrP27-30-Banden vor und nach der Druckbehandlung identisch sind, jedoch mit dem entscheidenden Unterschied, dass das druckbehandelte PrP27-30 sensitiv gegenüber proteolytischem Abbau ist. Zudem konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass der PrP-Antikörper 3F4 sein spezifisches Epitop auch beim druckdenaturiertem Prion-Protein erkennt.



**Abbildung 5.6: Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von PrP<sup>Sc</sup> und PrP27-30.**

Western-Blot-Detektion von Hamster-PrP<sup>Sc</sup> und vom N-terminal verkürztem Hamster-PrP27-30 mittels 3F4 Antikörper. Die linke Bildhälfte zeigt unbehandeltes (oben) und bei 800 MPa und 60 °C für 120 min gedrücktes (unten) PrP<sup>Sc</sup>, in der rechten Bildhälfte ist unbehandeltes und bei gleichen Bedingungen gedrücktes PrP27-30 dargestellt. Die Proben wurden vor und nach der Druckbehandlung mit (+) und ohne (-) PK behandelt.

### 5.2.2 Einfluss von Hochdruck auf die Infektiosität von PrP27-30

Aus den Versuchen mit PrP<sup>Sc</sup> war ersichtlich, dass der Verlust der PK-Resistenz infektiöser Prionen auch zu einer Verminderung der Infektiosität führt. Welchen Einfluss Druck auf die Infektiosität des N-Terminal-verkürzten PrP<sup>Sc</sup> (PrP27-30) nimmt wurde durch intrazerebrale Inokulation gedrückter PrP27-30-Proben in Hamster untersucht. In Tabelle 5.4 sind die Ergebnisse des Tierversuches dargestellt.

**Tabelle 5.4: Inkubationszeiten und Infektiositätstiter von druckbehandeltem PrP27-30.**

Inkubationszeiten und Infektiositätstiter erkrankter Hamster nach intrazerebraler Inokulation von 1,5 mg unbehandeltem und druckbehandeltem Gehirnmateriale (10 % w/v in PBS, pH 7,4) Scrapie erkrankter Hamster, das vor der Druckbehandlung mit (PK+) und ohne (PK-) Proteinase K behandelt wurde (72 µg/ml, 37 °C, 1 h). Der Infektiositätstiter wurde nach der Formel von Prusiner et al. 1982a berechnet und in log ID<sub>50</sub>-Einheiten pro g Gehirnmateriale angegeben

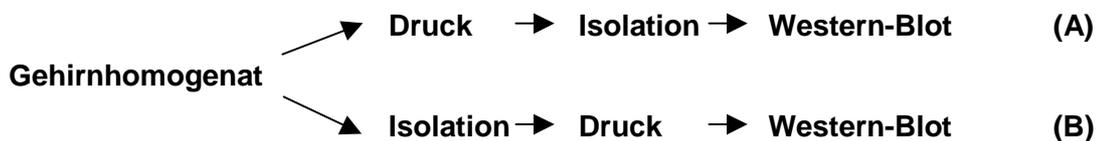
Probe	Inkubationszeit (in Tagen)	Titer (log ID <sub>50</sub> /g)
PrP27-30 - Kontrolle	83 ± 6	8,29
PrP27-30 - 800 MPa, 60 °C, 120 min	118 ± 19	4,91
PrP <sup>Sc</sup> - 800 MPa, 60 °C, 120 min	170 ± 38	2,50

Erstaunlicherweise zeigen die Druckversuche mit PrP27-30 eine geringere Inaktivierung als die mit PrP<sup>Sc</sup>. Während eine Druckbehandlung von unbehandeltem Gehirnhomogenat zu einer Reduktion der Infektiosität um 5,8 log ID<sub>50</sub>-Einheiten pro g Gehirnmateriale führt, ist beim Drücken von zuvor PK-verdautem Gehirnhomogenat nur eine Reduktion um 3,4 log Einheiten zu beobachten. Es konnte jedoch wie zuvor ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Resistenz infektiöser Prionen gegenüber proteolytischen Abbau und der Infektiosität gezeigt werden. Die druckinduzierte Reduktion der PK-Resistenz führt gleichzeitig zu einer verminderten Infektiosität der Prionen. Die Tatsache, dass bei druckbehandelten PrP<sup>Sc</sup>- und PrP27-30-Proben immunologisch keine PK-Resistenz mehr nachweisbar ist, im Infektiositätsversuch dagegen aber deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden Prion-Proteinen zu beobachten sind, zeigt erneut, dass trotz negativer Befunde im Immunoblot, ein Teil der Prionen ihre PK-Resistenz beibehielten, und dass dieser verbliebene, im Immunoblot nicht nachweisbare Rest, die im Tierversuch detektierte Infektiosität trägt.

### 5.3 Hochdruckbehandlung von isoliertem PrP27-30 (iPrP27-30)

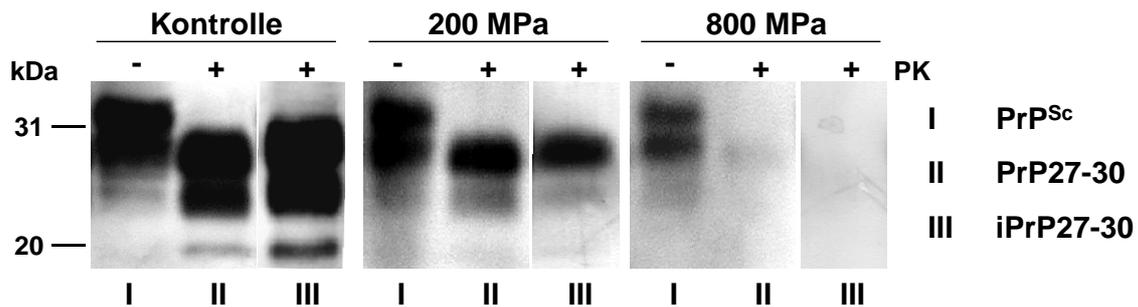
#### 5.3.1 Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von iPrP27-30

Abbildung 5.7 zeigt die Vorgehensweise bei der Isolierung infektiöser Prion-Proteine ausgehend vom Gehirnhomogenat eines mit Scrapie infizierten Hamsters. Die in Abbildung 5.8 dargestellten Ergebnisse wurde nach Schema A erhalten, indem die Isolierung der Proteine aus hochdruckbehandeltem Gehirnhomogenat erfolgte. Zur Untersuchung des Effektes von Hochdruck auf die PK-Resistenz isolierter Prionen wurden diese zunächst aus einem unbehandeltem Gehirnhomogenat isoliert und anschließend hochdruckbehandelt (Schema B). Die Ergebnisse dazu sind in Abbildung 5.10 dargestellt.



**Abbildung 5.7: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Hochdruckbehandlung isolierter Prion-Proteine.**

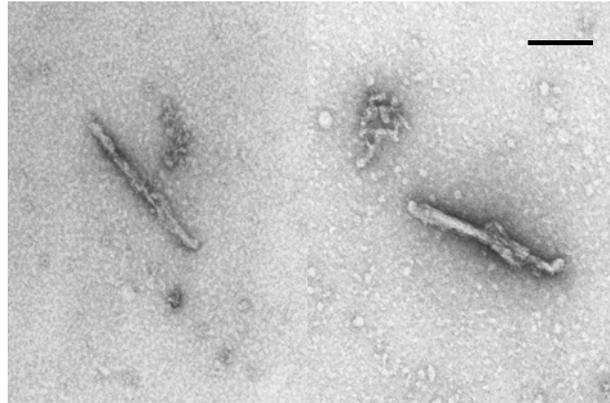
Die Isolation von PrP27-30 erfolgte wie in Kapitel 4.2.4 beschrieben mittels Detergensbehandlung und mehreren Ultrazentrifugationsschritten. Abbildung 5.8 zeigt iPrP27-30 aus unbehandeltem (Kontrolle, III) und aus bei 200 MPa (200 MPa, III) bzw. 800 MPa (800 MPa, III) und 60 °C für 120 min behandeltem Gehirnhomogenat. Während bei der Kontrolle und bei der 200 MPa Druckprobe nach der Aufarbeitung PK-resistentes Material im Western-Blot nachweisbar war, konnte bei der 800 MPa Druckprobe kein isoliertes PK-resistentes Material, das gleichbedeutend mit iPrP27-30 ist, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen aus der Western-Blot-Analyse der Gehirnhomogenaten überein. Ist PrP27-30 im Gehirnhomogenat nachweisbar (Abb. 5.8, II), konnte dies auch isoliert und nach anschließender Resuspension immunologisch nachgewiesen werden (Abb. 5.8, III). Bei der 800 MPa Probe konnten sowohl im Gehirnhomogenat als auch nach der Isolation keine PK-resistenten Prionen detektiert werden. Somit konnten erneut falsch negative Ergebnisse ausgeschlossen werden. Diese Ergebnisse bekräftigen die zuvor erhaltenen Resultate, dass Druck eine PK-Sensitivität bei infektiösen Prionen induzieren kann.



**Abbildung 5.8: PrP27-30-Isolation nach Druckbehandlung.**

Immunologischer Nachweis von PrP<sup>Sc</sup> (I), PrP27-30 (II) und iPrP27-30 (III). iPrP27-30 wurde aus druckbehandeltem, 10 %igem Hamstergehirnhomogenat (in PBS, pH 7,4 bei 60 °C für 120 min) mittels Detergensextraktion und Zentrifugation isoliert und in PBS, pH 7,4 resuspendiert.

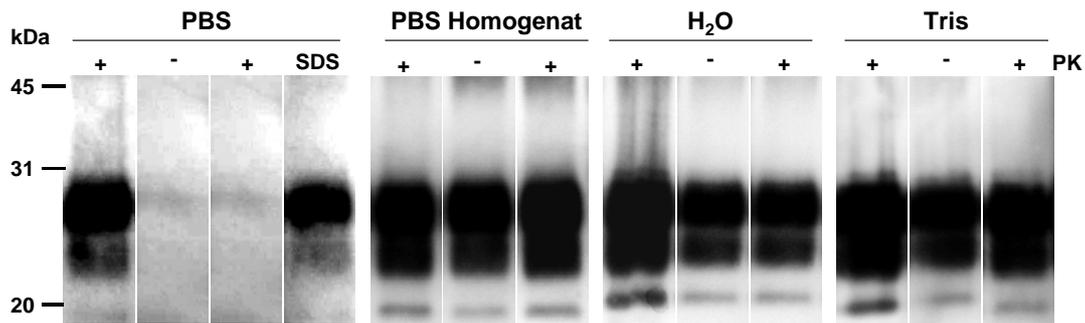
Zur Untersuchung der Druckeffekte auf isoliertes infektiöses Material, wurde iPrP27-30 (Abb. 5.8, Kontrolle III) in PBS, pH 7,4 bzw. in Tris, pH 7,0 oder in Wasser resuspendiert und bei 60 °C für 120 min mit Druck behandelt. Zuvor wurde das aus unbehandeltem infektiösem Gehirnhomogenat gewonnene und in Wasser resuspendierte iPrP27-30 (siehe Kap. 4.2.4) mittels Elektronenmikroskop untersucht (siehe Kap. 4.5). In Abbildung 5.9 sind die äußerst PK-resistenten Prionen-Fibrillen (Prionrods) zu sehen. Anhand einer Druckbehandlung dieser Aufreinigungsartefakte soll der Druckeffekt auf die Struktur des infektiösen Prion-Proteins, ohne den Einfluss von Matrixeffekten (Protein- und Fettkomponenten des Gehirns die im Homogenat vorliegen) untersucht werden.



**Abbildung 5.9: Elektronenmikroskopischer Nachweis der Prionrods.**

Unbehandeltes iPrP27-30 (resuspendiert in H<sub>2</sub>O) wurde nach der Aufreinigung aus einem Gehirn eines an Scrapie erkrankten Hamsters im Elektronenmikroskop untersucht. Der Balken entspricht 100 nm.

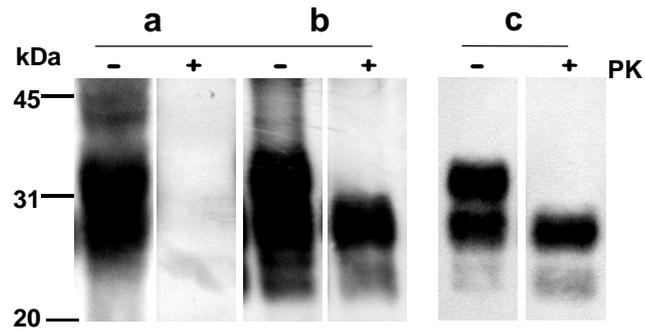
Im Gegensatz zu PrP<sup>Sc</sup>- und PrP27-30-Gehirnhomogenaten, bei denen eine Druckbehandlung bei 800 MPa und 60 °C für 120 min zum Verlust der Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau führt, zeigt isoliertes PrP27-30, das stark aggregiert in fibrillären Strukturen vorliegt, eine ausgeprägte Druckresistenz. Aus dem Immunoblot der druckbehandelten iPrP27-30-Proben (Abb. 5.10) ist ersichtlich, dass eine Behandlung bei 800 MPa und 60 °C für 120 min in keiner der getesteten Matrizen zu einem Verlust der Proteinase K-Resistenz führt. Die Druckbehandlung der Prionrods in PBS führt dagegen zur Bildung größerer Prion-Aggregate, die erst nach Ultraschall- und Hitzebehandlung unter Zugabe von SDS dissoziieren und im Western-Blot nachweisbar werden (Abb. 5.10, PBS). Diese druckinduzierte Aggregation isolierter infektiöser Prionen ist bei Resuspension dieser in einem gesunden PK-verdaulichem PBS-Gehirnhomogenat nicht zu beobachten (Abb. 5.10 PBS-Homogenat). Das gleiche gilt für die Druckbehandlung in ddH<sub>2</sub>O und in Tris-Puffer. In allen untersuchten Fällen behält iPrP27-30 jedoch seine PK-Resistenz nach der Druckbehandlung bei. Da das isolierte Prion-Protein auch nach Resuspension in einem Gehirnhomogenat eine ausgeprägte Druckstabilität zeigt (Abb. 5.10 PBS-Homogenat), kann der Einfluss von Komponenten in der Gehirnmatrix auf die zuvor beobachtete Drucksensitivität von PrP<sup>Sc</sup> ausgeschlossen werden.



**Abbildung 5.10: Hochdruckbehandlung von iPrP27-30.**

Immunologischer Nachweis von gedrücktem iPrP27-30. iPrP27-30 wurde nach Resuspension in PBS, pH 7,4; PBS Gehirnhomogenat (gesundes, PK-verdautes Hamstergehirn), pH 7,4; H<sub>2</sub>O, pH 7,5 und in 50 mM Tris, pH 7,0 für 120 min bei 60 °C mit 800 MPa behandelt. PBS-Druckprobe wurde zur Detektion von iPrP27-30 nach der Druckbehandlung 30 min mit Ultraschall und anschließend mit 2 %iger SDS-Lösung bei 95 °C für 120 min behandelt.

Aufgrund des unterschiedlichen Druckverhaltens von PrP<sup>Sc</sup> bzw. PrP27-30 in Gehirnhomogenaten und iPrP27-30, sind diesbezüglich weitere Untersuchungen unternommen worden. Dazu wurde der Einfluss jedes einzelnen Behandlungsschritts (Abb. 4.1, S.44) auf das Druckverhalten des Prion-Proteins getestet. Die Proben wurden alle in PBS, pH 7,4 bei 800 MPa, 60 °C für 120 min gedrückt und anschließend immunologisch untersucht. In Abbildung 5.11 ist der Einfluss einer Detergensbehandlung (a) und der Einfluss einer Ultrazentrifugation (b) auf die Drucksensitivität von PrP<sup>Sc</sup> zu sehen. Die Versuche zeigten, dass die Behandlung mit Detergens (10 %iges Sarkosyl) und die anschließende Zentrifugation bei 22.000 g, keinen Einfluss auf das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup> nimmt, da auf dem Immunoblot der druckinduzierte Verlust der PK-Resistenz zu sehen ist. Hochdruckbehandlung von ultrazentrifugiertem und resuspendiertem PrP<sup>Sc</sup> führt jedoch zu keinem Verlust der PK-Resistenz. Das Prion-Protein ist nach diesem Schritt weitaus resistenter gegenüber Druck als zuvor. Das gleiche Ergebnis erhält man bei der Ultrazentrifugation von unbehandeltem PrP<sup>Sc</sup> (Abb. 5.11, c). Damit konnte gezeigt werden, dass durch die Ultrazentrifugation während der Aufreinigung von PrP27-30, das zuvor in Gehirnhomogenaten drucksensitive PrP<sup>Sc</sup> in eine druckresistente Form überführt werden kann. Die vorausgegangene Detergensbehandlung spielt dabei keine Rolle, da der Effekt sowohl bei der Ultrazentrifugation von Gehirnhomogenat, das mit Detergens behandelt wurde (Abb. 5.11, b), als auch bei solchem, das nicht mit Detergens behandelt wurde (Abb. 5.11, c), zu beobachten war.



**Abbildung 5.11: Hochdruckbehandlung von PrP<sup>Sc</sup> nach Ultrazentrifugation.**

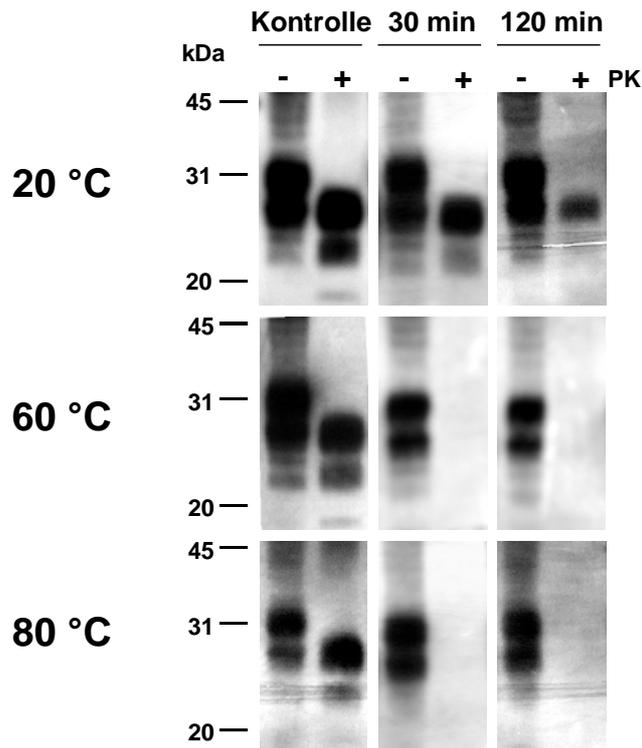
Hochdruckbehandlung von PrP<sup>Sc</sup> nach den einzelnen Bearbeitungsschritten zur Isolierung von PrP<sup>27-30</sup>. (a) hochdruckbehandeltes PrP<sup>Sc</sup> nach Detergensbehandlung und anschließender Zentrifugation bei 22.000 g für 10 min. (b) hochdruckbehandeltes PrP<sup>Sc</sup> (aus Überstand der 1. Zentrifugation) nach Zentrifugation bei 540.000 g für 20 min. (c) hochdruckbehandeltes PrP<sup>Sc</sup> nach Zentrifugation bei 540.000 g für 20 min ohne vorherige Detergensbehandlung. Alle Proben wurden in PBS, pH 7,4 bei 800 MPa und 60 °C für 120 min behandelt und anschließend mit und ohne PK inkubiert.

## 5.4 Einfluss verschiedener Faktoren auf das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup>

Die bisherigen Versuche konnten zeigen, dass Druck eine PK-Sensitivität bei PrP<sup>Sc</sup> bzw. PrP<sup>27-30</sup> in Gehirnhomogenaten induzieren kann, die gleichzeitig mit einer Reduktion der Infektiosität dieser Prion-Proteine einhergeht. Dagegen lies sich die PK-Resistenz von aufgereinigten und isolierten Prion-Proteinen durch Druck nicht beeinflussen. Im Folgenden wurden nun weitere Untersuchungen zum Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup> angestellt. Dazu sind mehrere Faktoren die Einfluss auf das Druckverhalten und damit auf die PK-Resistenz und Infektiosität von druckbehandelten Prion-Proteinen nehmen können, untersucht worden.

### 5.4.1 Einfluss der Temperatur und der Druckhaltezeit

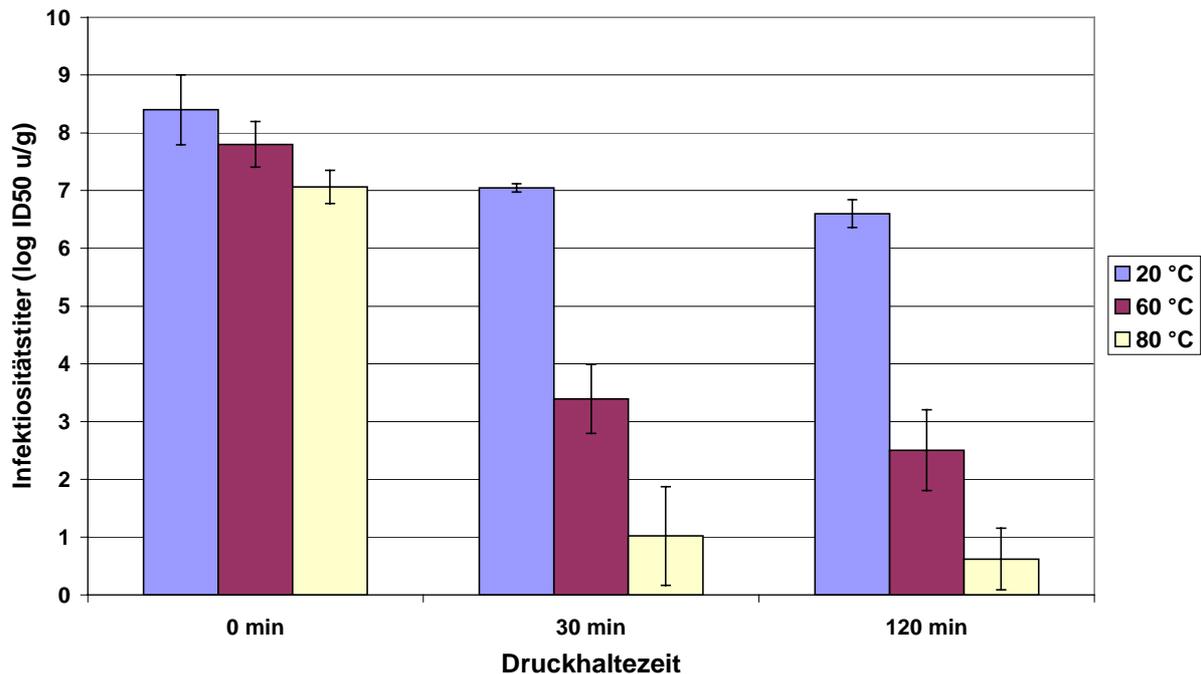
Der wohl wichtigste Einflussfaktor der Druckinaktivierung von Prionen ist die Temperatur. Aufgrund dessen wurden zunächst die Temperaturabhängigkeit und die Kinetik der PrP<sup>Sc</sup>-Inaktivierung unter Druck untersucht. Hierfür wurden bei einem konstanten Druck von 800 MPa die Temperatur und die Druckhaltedauer variiert. Abbildung 5.12 zeigt die Immunoblots von bei 20 bis 80 °C für 30 bzw. 120 min gedrücktem infektiösen Gehirnhomogenat. Daraus geht eine deutliche Temperaturabhängigkeit der Reduktion der PK-Resistenz hervor. Während bei einer Druckbehandlung von 800 MPa bei 20 °C nur ein geringer Effekt auf die PK-Resistenz zu sehen ist, sind die zuvor PK-resistenten Proben nach einer Druckbehandlung bei 60 bzw. 80 °C PK-sensitiv. Bereits nach einer 30-minütigen Druckbehandlung liegt die Konzentration des PK-resistenten Materials unterhalb der Nachweisgrenze. Bei den 20 °C Proben ist eine Abnahme in der Intensität der PrP<sup>Sc</sup>-Bande der 120 min-Probe im Vergleich zur 30 min-Probe zu sehen.



**Abbildung 5.12: Temperatur- und Zeitabhängigkeit der druckinduzierten PK-Sensitivität von PrP<sup>Sc</sup>.**

Hochdruckbehandlung von PrP<sup>Sc</sup> bei 800 MPa und 20 °C bis 80 °C für 30 bis 120 min. Alle Druckversuche wurden mit 10 %igem Gehirnhomogenat in PBS, pH 7,4 durchgeführt. Proben wurden nach der Behandlung mit PK inkubiert und immunologisch nachgewiesen.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass der Verlust der PK-Resistenz mit einer Reduktion der Infektiosität verbunden ist. Diejenigen Proben, die im Immunoblot negativ waren, zeigten im Tierversuch auch eine geringere Infektiosität, als die positiven Proben. Inwieweit die hier gezeigte temperatur- und zeitabhängige Reduktion der PK-Resistenz von PrP<sup>Sc</sup> mit einer Inaktivierung verbunden ist, wurde anhand von Tierversuchen untersucht. Wie aus Abbildung 5.13 zu entnehmen ist, zeigen die Tierversuche ebenfalls eine deutliche Temperatur- und Zeitabhängigkeit der PrP<sup>Sc</sup>-Druckinaktivierung. Damit konnte erneut bestätigt werden, dass PK-Resistenz und Infektiosität von PrP<sup>Sc</sup> eng miteinander verbunden sind. Des Weiteren bestätigten die Tierversuche die bereits zuvor beschriebene mangelhafte Sensitivität der immunologischen Prionen-Nachweismethode. Obwohl in den Druckproben bei 60 °C und 80 °C kein PK-resistentes Material nachgewiesen werden konnte, waren die Proben im Tierversuch infektiös.

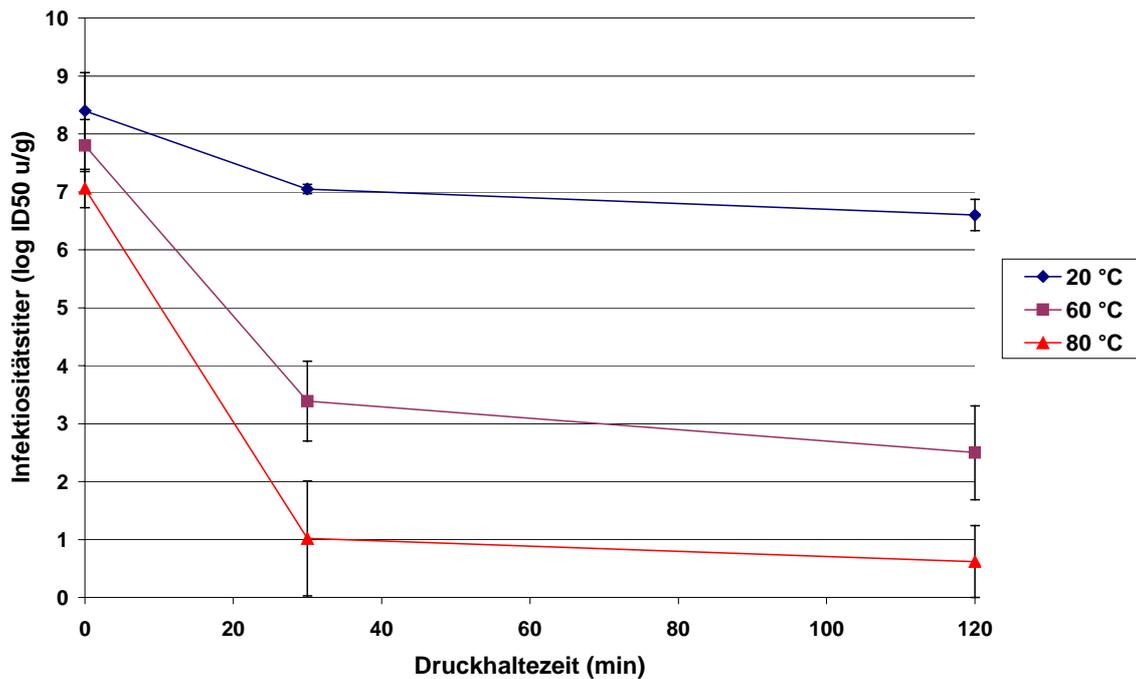


**Abbildung 5.13: Einfluss der Temperatur und Druckhaltezeit auf die Druckinaktivierung von PrP<sup>Sc</sup>.**

Intrazerebrale Inokulation von hochdruckbehandeltem PrP<sup>Sc</sup> in Hamster. Alle Druckversuche wurden mit 10 %igem Gehirnhomogenat in PBS, pH 7,4 bei 800 MPa durchgeführt. Bei den 60 °C und 80 °C Temperaturkontrollen war zwischen der 30- und der 120-minütigen Behandlung kein Unterschied bezüglich der Titerreduktion zu sehen, daher wurde für die Abbildung Mittelwerte beider Behandlungen herangezogen. Infektiositätstiter wurde nach der Formel von Prusiner et al. 1982a berechnet und in log ID<sub>50</sub> Einheiten (u) pro g Gehirnmateriale angegeben.

Wie aus der Abbildung 5.13 entnommen werden kann, ist die Inaktivierung der Prionen bei Druckbehandlungen mit höheren Temperaturen und mit längeren Haltezeiten am effektivsten. Dabei ist der Unterschied der Titerreduktion bei 30- und 120-minütiger Behandlung bei gleicher Temperatur deutlich geringer, als der bei unterschiedlichen Temperaturen und gleicher Druckhaltezeit. So wird der Infektiositätstiter nach einer 120-minütigen Druckbehandlung bei 800 MPa und 60 °C nur um weitere 0,9 log ID<sub>50</sub> u/g von 3,4 log ID<sub>50</sub> u/g auf 2,5 log ID<sub>50</sub> u/g im Vergleich zur 30-minütigen Behandlung gesenkt. Bei den 80 °C Druckproben beträgt der Unterschied in der Titerreduktion zwischen den Druckbehandlungen bei 30 min und 120 min nur 0,4 log ID<sub>50</sub> u/g (30 min: 1,0 log ID<sub>50</sub> u/g; 120 min: 0,6 log ID<sub>50</sub> u/g).

Abbildung 5.14 verdeutlicht den Effekt der Temperatur bzw. den der Druckhaltezeit auf die Titerreduktion. Die effektivste Wirkung des Druckes entfaltet sich demnach zwischen dem Zeitpunkt Null, d.h. unmittelbar nach Beginn des Druckaufbaus, und 30 min. Eine Druckbehandlung über diese Zeitspanne hinaus führt dagegen zu keiner deutlich größeren Titerreduktion.

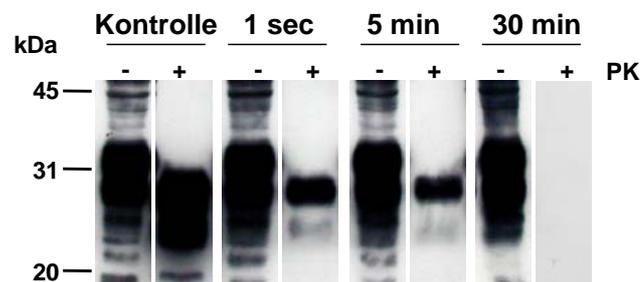


**Abbildung 5.14: Temperatur- und Zeitabhängigkeit der PrP<sup>Sc</sup>-Druckinaktivierung.**

Intrazerebrale Inokulation von hochdruckbehandeltem PrP<sup>Sc</sup> in Hamster. Alle Druckversuche wurden mit 10 %igem Gehirnhomogenat in PBS, pH 7,4 bei 800 MPa durchgeführt. Infektiositätstiter wurde nach der Formel von Prusiner et al. 1982a berechnet und in log ID<sub>50</sub> Einheiten (u) pro g Gehirnmateriale angegeben.

Zudem zeigten diese Versuche, dass eine Druckbehandlung bei Raumtemperatur zu einer ähnlichen PrP<sup>Sc</sup>-Inaktivierung führt, wie eine Hitzebehandlung bei 80 °C unter Normaldruck. Dagegen weisen Druckbehandlungen bei 60 °C und 80 °C eine deutliche Inaktivierung auf. Diese Ergebnisse verdeutlichen damit, dass eine effektive Inaktivierung von Prionen unter Druck nur in Kombination mit Temperatur beobachtet werden kann.

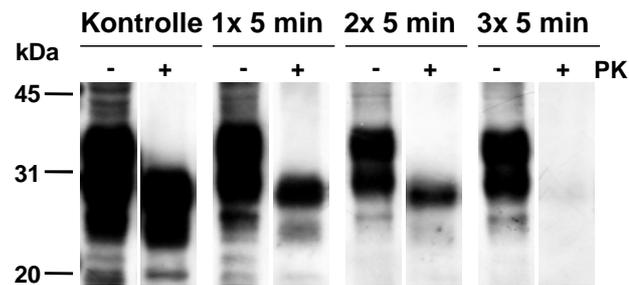
Da bereits nach einer 30-minütigen Druckbehandlung von 800 MPa bei 60 °C kein PrP<sup>Sc</sup> mehr im Immunoblot nachweisbar war und zudem eine deutliche Inaktivierung stattgefunden hat, wurden zusätzlich kürzere Druckhaltezeiten untersucht. In Abbildung 5.15 ist die zeitabhängige Drucksensitivität von PrP<sup>Sc</sup> sehr gut erkennbar. Die Intensitäten der Protein-Banden nehmen mit zunehmender Druckhaltezeit von 1 sec (Dekompression unmittelbar nach Erreichen von 800 MPa) über 5 min bis zur 30 min Probe ab. Schon während der Aufbauphase des Druckes, die ca. 150 s beträgt, ist ein Effekt auf die PK-Resistenz von PrP<sup>Sc</sup> zu sehen.



**Abbildung 5.15: Einfluss der Druckhaltezeit auf die PK-Resistenz von PrP<sup>Sc</sup>.**

Hochdruckbehandlung von PrP<sup>Sc</sup> bei 800 MPa und 60 °C für 1 sec (Druckabbau unmittelbar nach Erreichen von 800 MPa, ca. nach 150 sec), 5 min und 30 min. Alle Druckversuche wurden mit 10 %igem Gehirnhomogenat in PBS, pH 7,4 durchgeführt. Proben wurden nach der Behandlung mit PK inkubiert und immunologisch nachgewiesen.

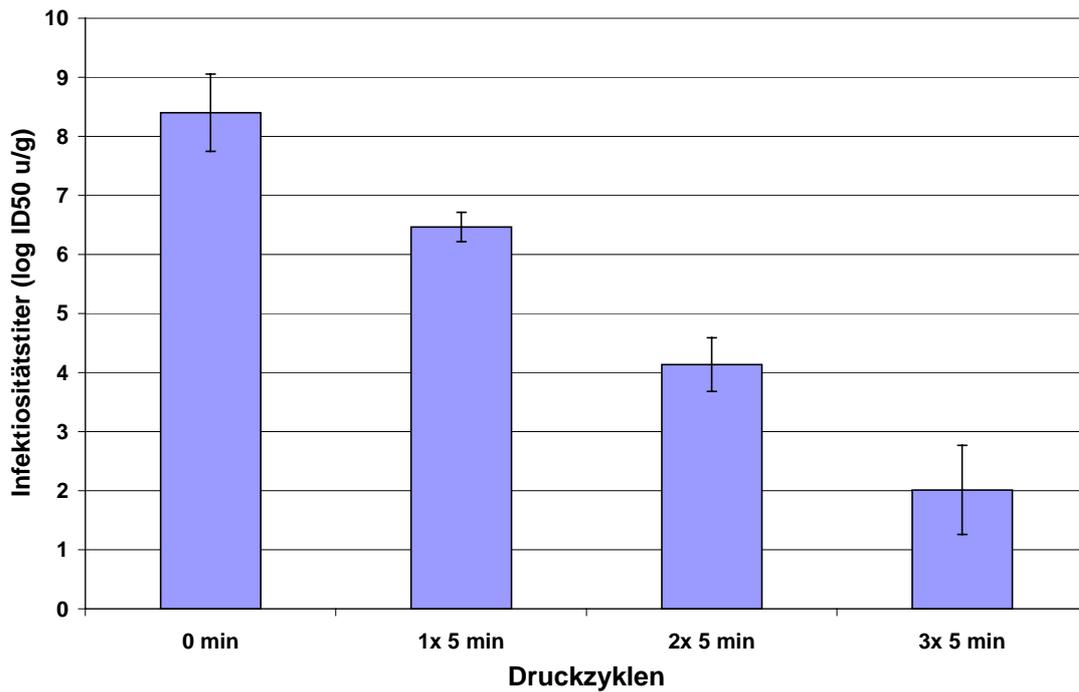
Alleinig der Druckaufbau zeigt Auswirkungen auf die PK-Resistenz von PrP<sup>Sc</sup>, so dass weitere Untersuchungen zum Einfluss der Kompression und Dekompression unternommen worden sind. Dazu wurde infektiöses Gehirnhomogenat dreimal hintereinander für je 5 Minuten bei 800 MPa und 60 °C behandelt. Die Ruhezeit zwischen den einzelnen Druckaufbauphasen betrug 3 Minuten. Die Versuche zeigten, dass jede Druckaufbauphase zu einem weiteren Verlust der PK-Resistenz von PrP<sup>Sc</sup> führt (Abb. 5.16). Nach dreimaligem Druckaufbau und jeweils 5-minütigem Halten des Druckes, ist kein PrP<sup>Sc</sup> mehr im Immunoblot nachweisbar. Somit konnte nach insgesamt 15-minütiger Druckhaltezeit die Konzentration des PK-resistenten PrP<sup>Sc</sup> unterhalb der Nachweisgrenze gesenkt werden.



**Abbildung 5.16: Einfluss von Druckimpulse auf die PK-Resistenz von PrP<sup>Sc</sup>.**

Hochdruckbehandlung von PrP<sup>Sc</sup> in 10 %igem Gehirnhomogenat in PBS, pH 7,4 bei 800 MPa und 60 °C. Proben wurden dabei 1- bis 3-mal für 5 min gedrückt. Zwischen den einzelnen Druckimpulsen wurde die Probe 3 min bei 60 °C inkubiert. Proben wurden nach der Behandlung mit PK inkubiert. PK-resistente Prionen wurden mittels 3F4 Antikörper im Western-Blot nachgewiesen.

Die Immunoblot-Ergebnisse aus Abbildung 5.16 konnten im Tierversuch bestätigt werden, da analog der Reduktion der PK-Resistenz auch eine Verringerung der Infektiosität der Prionen nach jedem Druckimpuls zu beobachten war. Ein Druckimpuls setzt sich zusammen aus der Kompressionsphase (ca. 150 sec), der Druckhaltezeit (5 min) und der Dekompressionsphase (ca. 3 sec). Dreimaliges wiederholen dieses Druckimpulses führt zu einer linearen Abnahme der Infektiosität um jeweils ca. 2 log ID<sub>50</sub> u/g (Abb. 5.17). Aber auch bei dieser Druckbehandlung behält ein Teil der Prionen ihre Infektiosität bei. Die Restinfektiosität in Höhe von 2,0 log ID<sub>50</sub> u/g ist jedoch geringer als einmaliges Drücken für 30 min (Titer = 3,4 log ID<sub>50</sub> u/g) und vergleichbar mit einer 120-minütiger Druckbehandlung (2,5 log ID<sub>50</sub> u/g). Dieser Versuch konnte zeigen, dass durch wiederholte kurze Druckimpulse die Druckhaltezeit insgesamt deutlich reduziert werden kann.



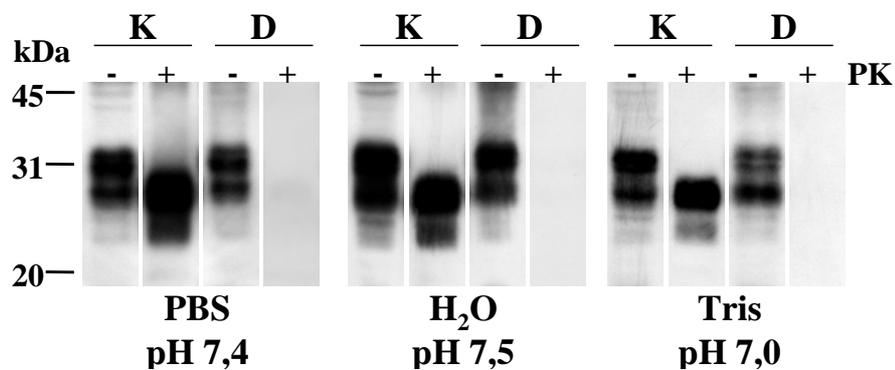
**Abbildung 5.17: Einfluss von Druckimpulse auf die Inaktivierung von PrP<sup>Sc</sup>.**

Intrazerebrale Inokulation von hochdruckbehandeltem PrP<sup>Sc</sup> in Hamster. Alle Druckversuche wurden mit 10 %igem Gehirnhomogenat in PBS, pH 7,4 bei 800 MPa und 60 °C durchgeführt. Proben wurden dabei 1- bis 3-mal für 5 min gedrückt. Zwischen den einzelnen Druckimpulsen wurde die Probe 3 min bei 60 °C inkubiert. Kontrolle zeigt unbehandeltes Material. Infektiositätstiter wurde nach der Formel von Prusiner et al. 1982a berechnet und in log ID<sub>50</sub> Einheiten (u) pro g Gehirnmaterial angegeben.

### 5.4.2 Einfluss des Puffermediums

Weitere Einflussgrößen, die untersucht worden sind, waren die Zusammensetzung und der pH-Wert des Puffermediums, mit dem das homogenisierte infektiöse Gehirnmateriale gedrückt wurde.

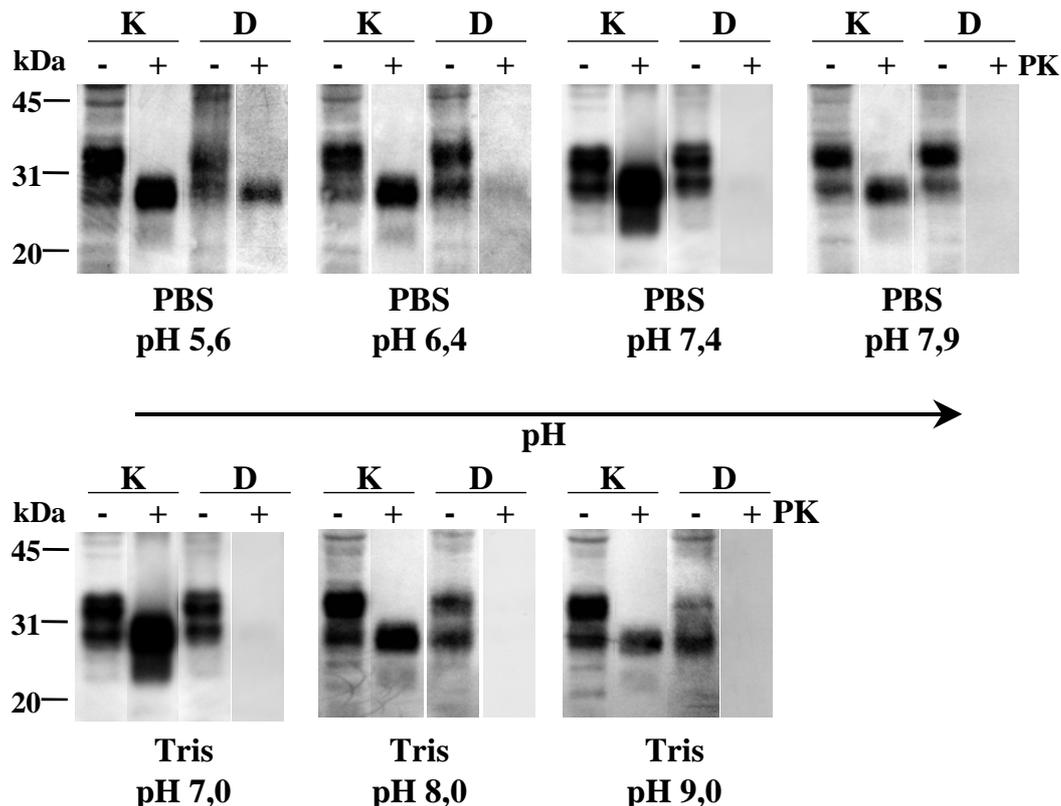
Abbildung 5.18 zeigt die Immunoblots druckbehandelter Gehirnextrakte, die in Phosphat- und Tris-Puffer sowie in Wasser homogenisiert wurden. Da bei allen Proben eine druckinduzierte PK-Sensitivität zu sehen ist, weist PrP<sup>Sc</sup> in allen hier getesteten neutralen Medien dasselbe Druckverhalten auf.



**Abbildung 5.18: Einfluss des Puffermediums auf das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup>.**

Hochdruckbehandlung von PrP<sup>Sc</sup> in 10 %igem Gehirnhomogenat in PBS, pH 7,4; H<sub>2</sub>O, pH 7,5 und in Tris/HCl-Puffer, pH 7,0. (D) bei 800 MPa, 60 °C für 120 min druckbehandelte Proben. (K) unbehandelte Proben. Proben wurden nach der Behandlung mit PK inkubiert und immunologisch nachgewiesen.

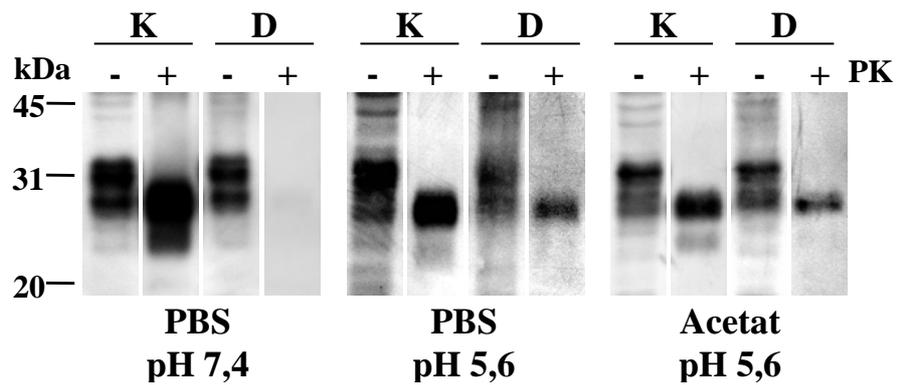
Im nächsten Versuch wurde das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup> über einen größeren pH-Bereich, vom schwach sauren bis in den schwach alkalischen Bereich, getestet. Wie aus Abbildung 5.19 ersichtlich ist, stellte sich das Prion-Protein im schwach sauren pH-Bereich (in PBS, pH 5,6) als deutlich druckstabiler heraus, als im neutralen oder schwach alkalischen Bereich. Aufgrund dessen wurde das Druckverhalten des Prion-Proteins im schwach sauren Medium näher untersucht.



**Abbildung 5.19: Einfluss des pH-Wertes auf das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup>.**

Hochdruckbehandlung von PrP<sup>Sc</sup> in 10 %igem Gehirnhomogenat in PBS, pH 5,6-7,9 und in Tris/HCl-Puffer pH 7,0-9,0. (D) bei 800 MPa, 60 °C für 120 min druckbehandelte Proben. (K) unbehandelte Proben. Proben wurden nach der Behandlung mit PK inkubiert und immunologisch nachgewiesen.

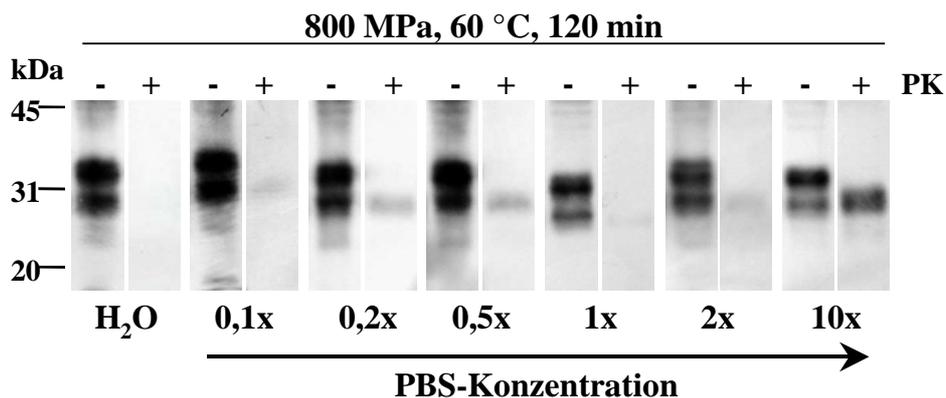
Die Druckresistenz von PrP<sup>Sc</sup> in schwach saurem PBS-Puffer konnte auch, wie aus Abbildung 5.20 zu entnehmen ist, in Acetatpuffer bestätigt werden. In beiden Fällen behält ein Teil der Prionen ihre PK-Resistenz nach einer Behandlung mit 800 MPa und 60 °C. Demnach ist davon auszugehen, dass es bei einem pH von 5,6 zu Änderungen in der Protein-Struktur kommt, die in eine erhöhte Druckstabilität des PrP<sup>Sc</sup> resultieren.



**Abbildung 5.20: Einfluss von schwach saurem pH-Wert auf das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup>.**

Hochdruckbehandlung von PrP<sup>Sc</sup> in 10 %igem Gehirnhomogenat in PBS, pH 7,4, pH 5,6 und in Acetat-Puffer, pH 5,6. (D) bei 800 MPa, 60 °C für 120 min druckbehandelte Proben. (K) unbehandelte Proben. Proben wurden nach der Behandlung mit PK inkubiert und immunologisch nachgewiesen.

In Abbildung 5.21 ist der Effekt der Ionenstärke auf das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup> dargestellt. Infektiöses Gehirnmaterial wurde in PBS-Puffer mit verschiedenen Konzentrationen an Salz und Phosphat homogenisiert und bei 800 MPa und 60 °C für 120 min gedrückt. Proben, die in geringer konzentriertem PBS-Puffer (0,1-0,5-fach konz. PBS) gedrückt wurden, zeigten einen schwachen PrP<sup>Sc</sup>-Anteil, der während der Druckbehandlung PK-resistent blieb. Die Immunoblots der mit physiologischen PBS-Konzentrationen gedrückten Proben (1- und 2-fach konz. PBS) zeigen dagegen keine PK-resistente Prionen. Wird PrP<sup>Sc</sup> jedoch in 10-fach konzentriertem PBS-Puffer hochdruckbehandelt, verbleibt nahezu das gesamte PrP<sup>Sc</sup> PK-resistent. Die Druckresistenz von PrP<sup>Sc</sup> in Puffer mit hoher Ionenstärke ist vergleichbar mit der in schwach saurem pH-Bereich. Unter diesen Bedingungen und in isolierter Form zeigen infektiöse Prionen ein deutlich stabileres Druckverhalten, das auf eine stabilere Proteinkonformation unter diesen Bedingungen hindeutet.

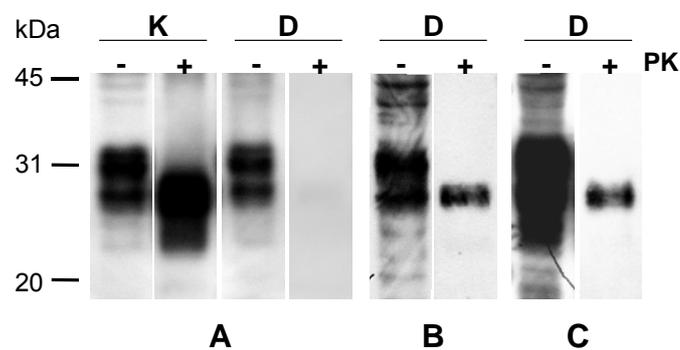


**Abbildung 5.21: Einfluss der Ionenstärke auf das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup>.**

Hochdruckbehandlung von PrP<sup>Sc</sup> in 10 %igem Gehirnhomogenat in H<sub>2</sub>O und in 0,01- bis 10-fach konzentriertem PBS. Alle Proben wurden für 120 min bei 800 MPa und 60 °C behandelt und anschließend mit PK inkubiert und immunologisch nachgewiesen.

### 5.4.3 Einfluss der Homogenisierung infektiöser Gehirne

Als letzter Einflussfaktor auf das Verhalten von PrP<sup>Sc</sup> unter Druck ist die Rolle der Homogenisierung der infektiösen Gehirne genauer untersucht worden. Gehirne von terminal an Scrapie erkrankten Hamstern sind mit einem Skalpell grob zerkleinert oder mit einem Homogenisierungsinstrument fein zerkleinert und ohne Medium bei 800 MPa und 60 °C für 120 min behandelt worden. In Abbildung 5.22 sind die Immunoblots dieser Druckproben im Vergleich zu einer in PBS, pH 7,4 homogenisierten und gedrückten Probe dargestellt.

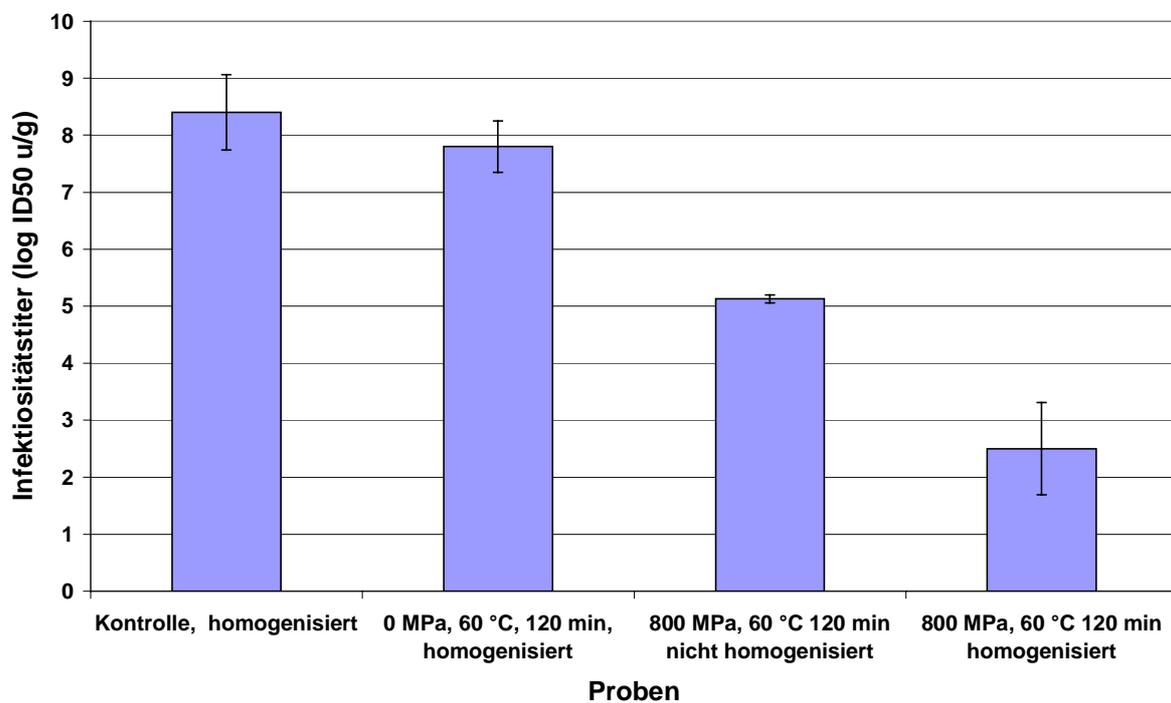


**Abbildung 5.22: Einfluss der Homogenisierung infektiöser Gehirne auf die PK-Resistenz von gedrücktem PrP<sup>Sc</sup>.**

Hochdruckbehandlung von PrP<sup>Sc</sup> bei 800 MPa, 60 °C für 120 min. (A) Hochdruckbehandlung eines in PBS homogenisierten infektiösen Gehirnes. (B) Hochdruckbehandlung eines grob zerkleinerten, nicht homogenisierten Gehirnes. (C) Hochdruckbehandlung eines fein zerkleinerten, nicht homogenisierten Gehirnes. Die Proben (B) und (C) wurden nach der Hochdruckbehandlung in PBS homogenisiert (10 % w/v) und anschließend mit PK inkubiert und immunologisch nachgewiesen.

Erstaunlicherweise zeigt PrP<sup>Sc</sup> in den ohne Medium gedrückten nicht homogenisierten Proben eine deutlich größere Stabilität gegenüber Druck auf als in wässrigen Medien homogenisierten Proben. Ein nachweisbarer Anteil der infektiösen Prionen bleibt nach der Druckbehandlung PK-resistent. Dieses unterschiedliche Druckverhalten der Prion-Proteine weist darauf hin, dass der Hydratationsgrad des Proteins für dessen Druckverhalten mit verantwortlich ist. Zudem vermittelt möglicherweise das wässrige Medium, von dem die Prion-Proteine im Homogenat umgeben sind, den Druckeffekt auf die Proteinstruktur.

Abbildung 5.23 zeigt die Druckinaktivierung von infektiösem Gehirnmateriale, das grob zerkleinert und ohne Medium gedrückt wurde, im Vergleich zu in PBS homogenisiertem und gedrücktem Material. Bei der nicht homogenisierten Druckprobe ist eine Reduktion der Infektiosität von 8,4 log ID<sub>50</sub> u/g auf 5,1 log ID<sub>50</sub> u/g um 3,3 log ID<sub>50</sub> u/g zu beobachten. Die Druckbehandlung einer in PBS homogenisierten Probe erreicht dagegen eine Reduktion um 5,9 log ID<sub>50</sub> u/g. Liegt PrP<sup>Sc</sup> bei der Druckbehandlung in wässriger Umgebung vor, so wirkt sich dies günstig auf die Inaktivierung aus.



**Abbildung 5.23: Einfluss der Homogenisierung infektiöser Gehirne auf die Druckinaktivierung von PrP<sup>Sc</sup>.**

Intrazerebrale Inokulation von hochdruckbehandeltem PrP<sup>Sc</sup> in Hamster. Druckversuche wurden mit nicht homogenisiertem, grob zerkleinertem infektiösem Gehirn und mit in PBS homogenisiertem infektiösem Gehirn bei 800 MPa, 60 °C für 120 min durchgeführt. Infektiositätstiter wurde nach der Formel von Prusiner et al. 1982a berechnet und in log ID<sub>50</sub> Einheiten (u) pro g Gehirnmateriale angegeben.

## 6 Diskussion

Mittels hydrostatischen Hochdrucks können Faktoren beeinflusst werden, die zur Stabilität eines Proteins und somit zu dessen Struktur maßgeblich beitragen. Dazu zählen insbesondere die Spaltung und Neuausbildung schwacher, nicht-kovalenter Bindungen die zu Störungen im Gleichgewicht intra- und intermolekularer Wechselwirkungen, sowohl zwischen den Polypeptidketten als auch zwischen dem Protein und dem Lösungsmittel führen. Ein weiterer wichtiger Faktor, der Änderungen in der Proteinkonformation induzieren kann, sind Modifikationen in der Hydratisierung eines Proteins. Aufgrund dieser Eigenschaften können mit diesem thermodynamischen Parameter Proteinstrukturen systematisch geändert werden. Die Untersuchung des Verhaltens von Proteinen unter Druck ist daher Gegenstand vieler Studien, die das Ziel haben, Kenntnisse über die Faltung von Proteinen zu erlangen, die anhand von Temperaturstudien nicht erreichbar sind. Zur Untersuchung der physiko-chemischen Eigenschaften von Proteinen ist eine Druckanwendung damit unabdingbar. Die Hochdruckbehandlung infektiöser Prion-Proteine kann somit nicht nur eine potentielle Inaktivierungsmethode darstellen, sondern auch zur Aufklärung bzw. dem Verständnis der komplexen Faltung dieses Proteins dienen

Studien mit Amyloid-bildenden Proteinen zeigten, dass Druck die Faltung dieser Proteine beeinflussen kann. So induziert Druck z. B. Strukturänderungen in Lysozym (Akasaka et al. 1997), Transthyretin (Ferrao-Gonzales et al. 2000, Dirix et al. 2005) und Amyloid-A Protein (Dubois et al. 1999), die je nach den gewählten Bedingungen zu Aggregationen oder Disaggregationen der Proteine führen können. Dagegen ist über die Wirkung von Druck auf die Faltung des infektiösen Prion-Proteins PrP<sup>Sc</sup> nichts bekannt. Es existieren lediglich einige Studien über das Verhalten des zellulären Prion-Proteins PrP<sup>C</sup> unter Druck. Kuwata et al. (2002) konnte ein metastabilen Umfaltungs-Konformer des PrP<sup>C</sup> anhand von NMR-Messungen unter Druckeinwirkungen bis 250 MPa identifizieren. Die Drucksensitivität von PrP<sup>C</sup> konnte auch von Torrent et al. (2003) gezeigt werden, indem es ihnen gelang, PrP<sup>C</sup> mittels Druck in eine aggregierte und Proteinase K-resistente Form mit erhöhtem  $\beta$ -Faltblattanteil zu überführen. In Tierversuchen konnte jedoch keine Infektiosität des druck-induzierten Intermediats nachgewiesen werden. Bisher gibt es nur eine Arbeit die über die Druckbehandlung von infektiösem TSE-Material berichtet (Brown et al. 2003). Bei der dabei angewandten Methode handelt es sich jedoch um eine

---

druckunterstützte Hitzesterilisation. Bei diesem Prozess macht man sich den Effekt der adiabatischen Erwärmung zu nutze, indem durch sehr schnelle Kompression des Probenmaterials die Ausgangstemperatur von 90 °C innerhalb von Sekunden auf 135-142 °C erhöht wird. Bei dieser Methode kann daher davon ausgegangen werden, dass die unter diesen Bedingungen erzielten Wirkungen auf das PrP<sup>Sc</sup>-Molekül eher auf die Temperatur als auf den angewandten Druck zurückzuführen sind. Mehrere Studien belegen, dass Druck in der Lage ist, Proteine umzufalten bzw. aggregierte Proteine zu dissoziieren (zusammengefasst in Silva und Weber 1993). Bisher gibt es keine Studien über das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup> bei Raumtemperatur bzw. bei Temperaturen deutlich unterhalb der Sterilisationsbedingungen, daher werden in dieser Arbeit die ersten Ergebnisse über das Druckverhalten infektiöser Prion-Proteine diskutiert.

## 6.1 Druckeffekte auf die Struktur infektiöser Prion-Proteine

Zur Untersuchung des Effektes von Druck auf die Struktur infektiöser Prion-Proteine wurden Experimente am kompletten PrP<sup>Sc</sup> und am N-terminal verkürztem PrP<sup>Sc</sup> (PrP27-30) in Gehirnhomogenaten an Scrapie erkrankten Hamstern sowie an isolierten Prion-Proteinen (iPrP27-30, Prionrods) durchgeführt.

### 6.1.1 Druckeffekte auf das native infektiöse Prion-Protein (PrP<sup>Sc</sup>)

Zunächst wurde das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup> unter physiologischen Bedingungen untersucht. Dazu wurden Gehirne von mit Scrapie infizierten Hamstern in PBS-Puffer, pH 7,4, homogenisiert (10 % w/v) und bei Temperaturen von 20 bis 80 °C mit Drücken von 100 bis 1000 MPa behandelt. Es konnte gezeigt werden, dass ab 500 MPa bis 800 MPa bei einer gleichzeitigen Temperatureinwirkung von 60 °C und einer Druckdauer von 120 min kein PK-resistentes PrP<sup>Sc</sup> immunologisch mehr nachweisbar ist. Bei einem Druck von 800 MPa und unter gleichzeitigem Erhitzen auf 60 °C bzw. 80 °C ist bereits nach 30-minütiger Behandlung kein PK-resistentes Material mehr im infektiösen Hirnextrakt detektierbar. Die negativen Immunoblots deuten an, dass das hochdruckbehandelte PrP<sup>Sc</sup> seine charakteristische Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau verloren hat. Druckbehandlungen bei 20 °C zeigten dagegen keinen deutlichen Effekt auf die PK-Resistenz von PrP<sup>Sc</sup>. Folglich kann Druck nur in Kombination mit erhöhter Temperatur (60-80 °C) bei PrP<sup>Sc</sup> eine PK-Sensitivität induzieren. Tierversuche konnten zudem bestätigen, dass die beobachtete Abnahme der PK-Resistenz im Immunoblot gleichzeitig mit einer Verringerung der Infektiosität einhergeht. Druckproben, bei denen im Western-Blot nach PK-Verdau kein PrP<sup>Sc</sup> mehr nachweisbar war, d.h. PrP<sup>Sc</sup> wurde bis unterhalb der Nachweisgrenze verdaut, zeigten auch im Tierversuch eine deutliche Reduktion der Infektiosität (3-8 log ID<sub>50</sub> u/g). Die Tatsache, dass trotz negativen *in vitro*-Befundes die Proben *in vivo* infektiös waren, verdeutlicht zum einem die bekannte geringere Sensitivität des immunologischen Nachweises von Prionen (Schmerr et al. 1994, Wadsworth et al. 2001) und zum anderem deren hohe Infektiosität. Selbst in geringen Mengen kann PrP<sup>Sc</sup> bei den Versuchstieren Scrapie auslösen. Der Vergleich der Immunblotergebnisse mit den Daten aus den Tierversuchen zeigte, dass infektiöses Material mit einem Titer > 5 log ID<sub>50</sub> u/g mittels Detektion PK-resistenter Proteinbanden immunologisch

nachweisbar ist. In infektiösem Material, das einen Titer  $< 5 \log ID_{50}$  u/g aufweist ist die PK-Resistenz des infektiösen Prion-Proteins dagegen nur schwach oder gar nicht mehr im Immunoblot detektierbar. Folglich sagt der mittels der Immunoblot-Analyse nachgewiesene Verlust der PK-Resistenz von Hamster-Scrapie-Material (bei einem Ausgangstiter von  $8-9 \log ID_{50}$  u/g) eine Infektiositätsreduktion um mindestens  $3-4 \log ID_{50}$  u/g auf mindestens  $5 \log ID_{50}$  u/g aus.

Inwieweit PK-Resistenz und Infektiosität von PrP<sup>Sc</sup> zusammenhängen, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. In der Literatur existieren sowohl Berichte über PK-resistentes Material, das keine Infektiosität besitzt (Shaked et al. 1999), als auch über PK-sensitives Material, das im Tierversuch infektiöses Potential aufwies (Hsiao et al. 1990, Telling et al. 1996). Trotz allem gilt jedoch seit der Charakterisierung des Prion-Proteins als infektiöses Agens der TSE-Erkrankungen die Annahme, dass Protease-Resistenz und Infektiosität eng miteinander verbunden sind (McKinley et al. 1983b, Bolton et al. 1984), so dass der Nachweis von PK-Resistenz nach wie vor als Marker für Infektiosität angesehen wird. Die hier bei der Druckbehandlung infektiöser Prionen beobachtete gleichzeitige Reduktion der PK-Resistenz und Infektiosität sprechen für einen eindeutigen Zusammenhang beider Eigenschaften.

Für das charakteristische Verhalten infektiöser Prionen, zu dem u.a. das amyloid-ähnliche Verhalten (Prusiner et al. 1983), die enorme Hitzeresistenz (Safar et al. 1993b) und die Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau (McKinley et al. 1983b) zählen, wird dessen Sekundärstruktur mit dem hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblattelementen (Bolton et al. 1987) und der damit verbundenen starken Tendenz zur Aggregation verantwortlich gemacht. Das zelluläre Prion-Protein, das überwiegend aus  $\alpha$ -helikalen Strukturen besteht, weist diese Eigenschaften dagegen nicht auf. Daher kann angenommen werden, dass die kombinierte Druck/Temperaturbehandlung die Reduktion der PK-Resistenz und die damit verbundene Infektiositätsabnahme mittels Konformationsänderungen im Prion-Protein induziert hat. Welche Änderungen der Proteinstruktur dabei genau abgelaufen sind, ist nur schwer zu beurteilen. Eine mögliche Erklärung wäre eine Reduktion des Struktur- und Eigenschaften bestimmenden  $\beta$ -Faltblattanteils. Prusiner's Protein-only-Hypothese geht bei der Propagation infektiöser Prionen von einer Umfaltung  $\alpha$ -helikaler Strukturen zu  $\beta$ -Faltblattstrukturen aus. Demnach müsste eine Rückfaltung von  $\beta$ - zu  $\alpha$ -Strukturen zu einem Verlust der Infektiosität führen. In der Tat konnten Safar et al. (1993b) zeigen, dass der Verlust an Infektiosität mit einer Abnahme an  $\beta$ -Faltblattstrukturelementen

und einer gleichzeitigen Zunahme von  $\alpha$ -helikalen Strukturkomponenten korreliert. Spektroskopische Untersuchungen von iPrP27-30, das mit Hitze und verschiedenen Denaturierungsmitteln behandelt worden ist, konnten bestätigen, dass die  $\beta$ -Faltblattstruktur eine entscheidende Rolle bei der physikalischen Stabilität infektiöser Prionen spielt. Demnach führen Behandlungen, die in einer irreversiblen Umfaltung des Prion-Proteins unter Reduktion des  $\beta$ -Faltblattanteils resultieren, gleichzeitig zu einer Infektiositätsabnahme. Andererseits gelten  $\beta$ -Faltblattstrukturen jedoch allgemein als extrem druckstabil (Balny und Masson 1993, Heremans 2000, Ly-Nguyen et al. 2003). Die Druckstabilität Amyloid-bildender Proteine konnte zudem anhand des Hefe-Prion-Proteins Ure2, welches *in vitro* amyloide Eigenschaften besitzt, bestätigt werden (Zhou et al. 2001). Drücke bis 600 MPa zeigten bei Raumtemperatur keine Auswirkungen auf die Proteinstruktur von Ure2. Eine kombinierte Druckbehandlung mit dem Denaturierungsmittel Guanidinhydrochlorid (Gnd-HCL) induzierte dagegen eine irreversible Umfaltung des Proteins. Dabei sind nicht denaturierende Konzentrationen von Gnd-HCl eingesetzt worden. Dieser Versuch verdeutlichte, dass Drücke unterhalb 600 MPa allein nicht in der Lage sind, die Struktur des aggregierten Ure2-Proteins zu beeinflussen. Die hier durchgeführte Behandlung von Hamster-Prion-Proteinen mit Drücken bis 1000 MPa bei Raumtemperatur zeigten ebenfalls keinen bzw. nur einen sehr geringen Effekt auf die Struktur von PrP<sup>Sc</sup>. Fand die Druckbehandlung jedoch bei Temperaturen von 60 °C bis 80 °C statt, so konnten bereits ab 500 MPa deutliche irreversible Effekte auf die PrP<sup>Sc</sup>-Struktur, die zur Reduktion der PK-Resistenz und Infektiosität führten, beobachtet werden. Aus dem pT-Phasendiagramm für Proteine (Abb. 2.3, S. 17) ist ersichtlich, dass bei bestimmten Druck/Temperatur-Bedingungen Proteine denaturieren. Bei 20 °C liegen in der Regel die meisten monomeren Proteine bei einem Druck ab 500 MPa denaturiert vor. Nach den hier vorliegenden Daten ist im Falle des infektiösen Prion-Proteins jedoch eine Temperatur von 60 °C notwendig, um bei einem Druck oberhalb von 500 MPa zu denaturieren. Dies bedeutet, dass das thermodynamisch sehr stabile Prion-Protein eine hohe Aktivierungsenergie benötigt, um unter Druck umfalten zu können. Demnach verschiebt sich die in Abbildung 2.3 (S.17) dargestellte Funktion im Falle des Prion-Proteins nach rechts zu höheren Temperaturen.

Da Druck kovalente Bindungen nicht beeinflussen kann, sind die irreversiblen Druckeffekte auf die PrP<sup>Sc</sup>-Struktur höchst wahrscheinlich auf die Destabilisierung inter- und intramolekularer Wechselwirkungen zurückzuführen. Denkbar wäre eine Beeinflussung der Stabilität der als Amyloid-Plaques vorliegenden PrP<sup>Sc</sup>-Aggregate. Die Dissoziation dieser Aggregate könnte zu einer Sensitivitätserhöhung gegenüber PK-Verdau führen. Ähnliche Effekte wurden von Riesner et al. (1996) berichtet, die zeigen konnten, dass das Detergensmittel SDS die als regelmäßige Stäbchen angeordnete Prionrods spalten kann. Die dabei gebildeten Protein-Partikel besitzen einen hohen Anteil an  $\alpha$ -helikalen Strukturelementen und weisen gleichzeitig eine geringere Infektiosität auf. Dies würde jedoch wiederum auf die bereits erwähnte druckinduzierte Reduktion des  $\beta$ -Faltblattanteils zu Gunsten  $\alpha$ -helikaler Strukturelementen hindeuten. Viele experimentelle Daten sprechen jedoch für eine außergewöhnliche Druckresistenz von Sekundärstrukturen die auf  $\beta$ -Faltblätter basieren. So dissoziiert z.B. aggregiertes Amyloid-A Protein erst unter extremer Druckeinwirkung bei 1200 MPa. Der extreme Druck bewirkt dabei eine Umfaltung des Proteins unter Reduzierung des  $\beta$ -Faltblattanteils in  $\alpha$ -helikalen und ungeordneten Strukturelementen (Dubois et al. 1999). Die Berücksichtigung der existierenden Ansichten über das limitierte Potential von Druck, konformationelle Änderungen in  $\beta$ -Faltblattstrukturen zu induzieren, macht die hier beobachtete bemerkenswerte Wirkung von 500-800 MPa bei moderaten Temperaturen von 60-80 °C auf die extrem stabile PrP<sup>Sc</sup>-Struktur nur schwer erklärbar. Die gefundenen Ergebnisse sprechen für eine irreversible druckinduzierte Denaturation der  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Folglich wäre die hier beobachtete Reduktion der PK-Resistenz und Infektiosität Scrapie infizierter Gehirnhomogenate einfacher anhand struktureller Änderungen im Bereich der Quartär- und Tertiärstruktur zu erklären. Diese Proteinstrukturen werden überwiegend durch elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert, die im Allgemeinen als sehr drucklabil gelten (zusammengefasst in Balny 2004). Durch die Destabilisierung dieser Wechselwirkungen kommt es bereits bei relativ moderaten Drücken von 50 bis 200 MPa zur Dissoziation oligomerer Proteine (Silva und Weber 1993), während kleine monomere Proteine meist bei einer Druckeinwirkung von 400 bis 800 MPa umfalten (Heremans 1982, Gross und Jaenicke 1994). Da diese Effekte für gewöhnlich aber reversibel sind (Heremans 1982, Silva und Weber 1993), erklären sie die hier beschriebenen irreversiblen Modifikationen in der PrP<sup>Sc</sup>-Struktur nicht hinreichend. Druckinduzierte Änderungen in der Tertiärstruktur

können sich jedoch auf die gesamte Funktionalität eines Proteins auswirken (Mozhaev et al. 1996). Daher wäre es vorstellbar, dass eine druckinduzierte Destabilisierung der Quartär- bzw. Tertiärstruktur des Prion-Proteins gleichzeitig auch zu einer Destabilisierung dessen Sekundärstruktur führt. Damit wäre eine irreversible druckinduzierte Modifikation der  $\beta$ -Faltblattstruktur erklärbar.

Obwohl die Druckstabilität von  $\beta$ -Strukturen an mehreren Proteinen gezeigt werden konnte, existieren Zweifel darüber, Druckeffekte, die bei der Druckbehandlung eines bestimmten Proteins unter ganz bestimmten Bedingungen beobachtet worden sind, für alle Proteine zu generalisieren (Royer 2005). Es ist schwierig, wenn nicht sogar nahezu unmöglich allgemein gültige Gesetzmäßigkeiten über die Auswirkung von Druck auf die Proteinstruktur aufzustellen. Die einzige Regel die aufgestellt werden kann und die für alle Proteine unter allen Bedingungen gültig ist, folgt dem *Prinzip von LeChatelier und Braun*, das besagt, dass unter Druck jene Konformation eines Proteins bevorzugt wird, die mit einer Verminderung des Volumens einhergeht. Welche Konformation ein Protein dabei unter den gewählten Temperatur-, Druck- und Pufferbedingungen einnimmt, hängt von den Enthalpien und Entropien, den spezifischen Volumina, den Wärmekapazitäten und den thermischen Ausdehnungskoeffizienten aller einzelner möglicher Proteinkonfigurationen ab. Eine Konformationsänderung wird durch die energetische Begünstigung eines Übergangs in einen anderen Zustand, z.B. ungefaltet, intermediat oder aggregiert, ermöglicht. Konformationsänderungen, die mit Volumenvermindernungen verbunden sind, können meist auf Änderungen in der Hydratation des Proteins zurückgeführt werden (Heremans 2005, Royer 2005). Obwohl Proteine sehr dicht gepackt sind, befinden sich in ihrem Innern nicht solvatisierte Hohlräume. Die Freilegung nicht hydratisierter Regionen führt zu Änderungen im Hydratationsgrad, da das entfaltete Protein eine größere Angriffsfläche für das Lösungsmittel bietet. Der Grad und die Art der Hydratation führen zu Volumenänderungen. Die Basis druckinduzierter Strukturänderung von Proteinen resultiert aus diesem Grund aus Änderungen innerhalb der Solvatisierung. Die Eliminierung von nicht hydratisierten Hohlräumen und die damit verbundene Hydratation der freigelegten Aminosäurenreste führen zu einer Volumenabnahme. Daher tragen Hohlräume, Packungsfehler und Änderungen in der Hydratation am meisten zu negativen Volumenänderungen bei. Schlussfolgernd sind Proteine, die diese Eigenschaften aufweisen, empfänglicher für eine Druck-

Umfaltung bzw. -Dissoziation als dichtgepackte Proteinstrukturen, in denen Wasser ausgeschlossen ist. Unter Berücksichtigung dieser Aspekte müsste das hier als drucksensitiv charakterisierte infektiöse Prion-Protein PrP<sup>Sc</sup> Hohlräume und nicht hydratisierte Regionen besitzen, die einen Angriff von Druck ermöglichen.

### 6.1.2 Druckeffekte auf das N-terminal verkürzte Prion-Protein (PrP27-30)

Experimente zum Druckverhalten des am N-Terminus verkürzten PrP<sup>Sc</sup> in homogenisierten Hamsterhirnextrakten zeigten zunächst dieselben Ergebnisse, wie das komplette Prion-Protein. Der resistente und infektiöse Teil von PrP<sup>Sc</sup> stellte sich auch ohne den N-Terminus als drucksensitiv heraus, da unter Einwirkung von Druck (800 MPa) und Hitze (60 °C) bei einer Dauer von 120 min die Resistenz gegenüber proteolytischem Abbau vermindert wurde. Nach der Druckbehandlung war immunologisch kein PK-resistentes PrP27-30 mehr nachweisbar. PK-unbehandeltes, gedrücktes PrP27-30 zeigte im Immunoblot eine eindeutig nachweisbare Proteinbande, deren Muster sich nicht vom druckunbehandeltem, PK-verdautem PrP27-30 unterscheidet (Abb. 5.6, S. 64). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass infektiöse Prionen zum Einem unter Druck große, elektrophoretisch nicht nachweisbare Aggregate bilden und zum Anderen konnte gezeigt werden, dass Druck keinen Einfluss auf das Epitop des Prion-Proteins nimmt, da es auch nach der Druckbehandlung vom verwendeten PrP-Antikörper erkannt wird. Damit konnte bestätigt werden, dass Druck eine Strukturänderung bei Prionen, die aufgrund des hohen  $\beta$ -Faltblattanteils druckstabil sein sollten, induzieren kann, die zur deren Destabilisierung führt.

Bei der Inaktivierung von PrP27-30 sind jedoch im Vergleich zu PrP<sup>Sc</sup> deutliche Unterschiede zu sehen. Während die Infektiosität des kompletten PrP<sup>Sc</sup> durch eine Druckbehandlung bei 800 MPa, 60 °C für 120 min um 5,9 log ID<sub>50</sub> u/g auf 2,5 log ID<sub>50</sub> u/g gesenkt wird, ist bei der um den N-Terminus verkürzten Form bei gleichen Bedingungen nur eine Reduktion um 3,4 log ID<sub>50</sub> u/g auf 4,9 log ID<sub>50</sub> u/g zu beobachten. Obwohl bei beiden Proben im Western-Blot keine PK-Resistenz nachweisbar war, sind im Tierversuch große Unterschiede erkennbar. Diese Unterschiede sind auf die bereits schon erwähnte begrenzte Sensitivität des Immunoblot-Testsystems zurückzuführen.

Es konnte jedoch ein eindeutiger Zusammenhang zwischen PK-Resistenz und Infektiosität festgestellt werden, indem beide Parameter durch eine Druckeinwirkung bei 60 °C reduziert worden sind. Dass ein Großteil der PrP27-30-Moleküle ihre PK-Resistenz während der Druckbehandlung nicht verloren haben, kann mehrere Gründe haben. So wäre beispielsweise denkbar, dass PrP27-30 aufgrund der Abspaltung der N-terminalen 67 Aminosäuren im Vergleich zum kompletten Prion-Protein PrP<sup>Sc</sup> eine andere Konformation einnimmt, die eine größere Resistenz gegenüber Druck besitzt, vermutlich aufgrund von Ausbildung stabilerer Aggregate. In der Tat spielt der N-Terminus des Prion-Proteins sowohl bei der Umfaltung als auch bei der Aggregation eine zentrale Rolle (Frankenfield et al. 2005, Cordeiro et al. 2005). Des Weiteren zeigten Umfaltungsstudien mit Guanidinhydrochlorid, dass PrP27-30 eine höhere thermodynamische Stabilität besitzt als PrP<sup>Sc</sup> (Safar et al. 1993b), womit die hier beobachteten Unterschiede in der Druckresistenz zwischen dem kompletten PrP<sup>Sc</sup> und dem N-terminal verkürzten PrP<sup>Sc</sup> erklärbar wären.

### 6.1.3 Druckeffekte auf das isolierte Prion-Protein (iPrP27-30)

Wie gezeigt induziert Druck bei infektiösen nativen Prionen (mit und ohne N-Terminus, in Gehirnhomogenaten) eine Konformationsänderung, die zu einem teilweisen Verlust der PK-Resistenz und Infektiosität führt. Hochdruckbehandlungen von aufgereinigten und in wässriger Lösung resuspendierten infektiösen Prion-Proteinen, iPrP27-30, zeigten dagegen unter gleichen Bedingungen (800 MPa, 60 °C, 120 min) erstaunlicherweise keinen Einfluss auf deren PK-Resistenz. Im Gegensatz zu dem bisher beobachteten Druckeffekt auf die Struktur nativer Prionen, erwies sich iPrP27-30 als druckstabil. Die Konformation isolierter Prion-Proteine kann demnach nicht durch eine kombinierte Hochdruck/Temperatur-Behandlung destabilisiert werden. Eine plausible Erklärung für diese Druckstabilität basiert auf dem hohen  $\beta$ -Faltblattanteil dieses Proteins. Spektroskopische Untersuchungen an isoliertem PrP27-30 bestätigten einen Anteil an  $\beta$ -Faltblätter von ca. 54 % (Safar et al. 1993a, Pan et al. 1993). Aufgrund der in der Literatur beschriebenen und bereits zuvor diskutierten extremen Druckstabilität von  $\beta$ -Faltblattstrukturen wäre von iPrP27-30 auch kein anderes Druckverhalten zu erwarten. Druck bewirkt hier im Gegenteil eher eine Stabilisierung von Sekundärstrukturen, die einen hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen aufweisen (Balny und Masson 1993). Und in der Tat ist bei der Druck-

behandlung von iPrP27-30 in PBS eine weitere Aggregation in Form von größeren und stabileren Aggregaten beobachtet worden (Abb. 5.10, S. 69). Somit könnte die Druckstabilität der Prionrods auf das charakteristische Druckverhalten von  $\beta$ -Faltblättern zurückgeführt werden. Gleiches Druckverhalten konnte auch nach der Resuspension von iPrP27-30 in Gehirnhomogenaten von gesunden, nicht mit Scrapie infizierten Hamstern beobachtet werden (Abb. 5.10, S. 69). Aufgrund dieser Tatsache konnte ein Einfluss von Komponenten aus der Gehirnhomogenatmatrix auf das Druckverhalten nativer Prion-Proteine ausgeschlossen werden, so dass letztendlich allein die Konformation des Proteins ausschlaggebend für dessen Druckverhalten ist.

Weitere Untersuchungen bezüglich der Diskrepanz zwischen dem Druckverhalten nativer und isolierter Prionen führten zum Ergebnis, dass die Ultrazentrifugation bei der Isolierung die beobachtete Druckresistenz induziert (Abb. 5.11, S. 70). Bei einer Zentrifugation eines Proteins bei 540.000 g sind mehrere Aspekte zu beachten. Einerseits verursacht die hohe Zentrifugalkraft auf dem Boden kleiner Zentrifugationsgefäße Drücke von mehreren Hundert MPa, die zur Inaktivierung der infektiösen Prionen beitragen könnten. Andererseits kann es aufgrund der höheren Dichte von Proteinen im Vergleich zu Wasser zur Agglomeration hydrophober Proteine kommen. Sehr hohe Zentrifugalkräfte könnten die Zusammenballung hydrophober Proteine unter Bildung eines hydrophoben Kerns, in dem die Proteine stark aggregiert und dehydriert vorliegen, ermöglichen. Daher wäre es denkbar, dass hydrophobe Proteine unter der Einwirkung hoher Zentrifugalkräfte semikristalline Strukturen ausbilden können. In der Tat wird in der Literatur über eine kristalline Struktur von isoliertem PrP27-30 berichtet (Wille et al. 2002). Die Aufklärung dieser Kristalle mittels Elektronen-Kristallographie führte zu einem Modell der Struktur infektiöser Prionen. Bisher wird angenommen, dass sich die Strukturen des isolierten (iPrP27-30) und des nativen Prion-Proteins gleichen (Baskakov et al. 2002). Bis heute ist jedoch ohne eine vorherige Aufreinigung, die mindestens einen Ultrazentrifugationsschritt beinhaltet, keine spektroskopische Untersuchung von PrP<sup>Sc</sup> bzw. PrP27-30 möglich, so dass die Daten über die Zusammensetzung der Sekundärstruktur aus CD- und FTIR-Untersuchungen von dehydrierten, isolierten Prionen stammen. Das gegensätzliche Druckverhalten nativer und isolierter Prionen deutet auf Unterschiede in den Strukturen dieser beider Isoformen hin. Die Druckresistenz isolierter Prionen ist bei der Aufarbeitung mittels Ultrazentrifugation

induziert worden. Da bisher zur Aufreinigung infektiöser Prionen ein solcher Schritt zwingend notwendig ist, kann folglich nicht ausgeschlossen werden, dass das isolierte infektiöse Prion-Protein eine andere Struktur als das native PrP<sup>Sc</sup> einnimmt. Die starke Aggregation und der Mangel an Hydratation sind mögliche Faktoren, die zu einer Konformationsänderung führen könnten. Prionen mit dieser Konformation sind zwar PK-resistent und infektiös, verhalten sich jedoch unter Druck anders als native Prionen. Unterschiedliche thermodynamische Stabilität nativer und dehydrierter Prionen wurde bereits in der Literatur diskutiert (Safar et al. 1993b). Die Arbeiten dieser Gruppe zeigten, dass der Verlust an freiem Wasser zu einem Anstieg an  $\beta$ -Faltblattsrukturen führt, der gleichzeitig eine abnormale Resistenz der dehydrierten Prionen gegenüber Hitze mit sich führt. Folglich erhöht sich die Stabilität infektiöser Prionen mit zunehmendem  $\beta$ -Faltblattanteil und steigender Dehydrierung. Beides kann bei der Isolierung infektiöser Prionen durch die Ultrazentrifugation induziert worden sein, was die Druckstabilität von iPrP27-30 erklären könnte. Die Hydratation hat einen wesentlichen Einfluss auf die Druckstabilität eines Proteins. Arbeiten mit rekombinanten Prion-Proteinen bestätigten die wichtige Rolle des Hydratations- und Aggregationsgrades auf die Drucksensitivität dieser Proteine (Cordeiro et al. 2004). Demnach zeigen verschieden stark *in-vitro* aggregierte rekombinante Prion-Proteine unterschiedliche Druckresistenz, wobei die gereiften Aggregate am druckstabilsten sind. Gleiches Verhalten zeigen amyloide Fibrillen des Transthyretin-Peptids (105-115), die im frühen Bildungsstadium drucksensitiv sind, während gereifte, dehydrierte und dichtgepackte Fibrillen eine extreme Druckstabilität aufweisen (Dirix et al. 2005).

Wie bereits in Kapitel 6.1.1 erwähnt, trägt neben der Hydratisierung eines Proteins auch das Vorhandensein interner Hohlräume einen entscheidenden Beitrag zum Druckverhalten eines Proteins bei. Unter Berücksichtigung aller dargelegten Fakten, müssten isolierte Prionen weniger interne Hohlräume und einen geringeren Hydratationsgrad besitzen, als native. Das Fehlen komprimierbarer Hohlräume und die geringere Hydratation könnten demnach die Unterschiede in der Konformation zwischen isolierten und nativen Prionen ausmachen und für die extreme Druckstabilität von iPrP27-30 verantwortlich sein.

#### 6.1.4 Einflussfaktoren auf das Druckverhalten des infektiösen Prion-Proteins

##### *Einfluss des Puffermediums*

Die Wahl des Puffermediums spielt bei der Druckbehandlung von Proteinen eine wichtige Rolle. Druck beeinflusst die Dissoziation von Wasser und in Puffern gelösten Salzen. Daher kommt es unter Druckeinwirkung bei Phosphatpuffern zu einer Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich (Ludwig 2000, Funtenberger et al. 1995, Butz et al. 1997). Dies kann bis zu 0,3 Einheiten pro 100 MPa ausmachen (Funtenberger et al. 1995). Im Falle von PBS, pH 7,4, würde dies bei einer Druckanwendung von 800 MPa eine Reduktion des pH-Wertes auf ca. 5 bedeuten. Auch Wasser zeigt sich nicht unbeeinflusst vom Druck. Aufgrund seines negativen Ionisationsvolumens kommt es unter Druckeinwirkung zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung  $\text{H}_3\text{O}^+$ - und  $\text{OH}^-$ -Ionen (Tauscher 1995). Zu den Puffern, die druckstabil sind und ihren pH-Wert unter Druck konstant halten können, zählen Tris-Puffer (Funtenberger et al. 1995). Um einen Einfluss des Puffermediums auf das Druckverhalten infektiöser Prionen ausschließen zu können, wurden Druckversuche mit infektiösen Prionen sowohl in drucksensitiven Medien (in PBS und Wasser), als auch in druckstabilen Medium (in Tris/HCL) unter neutralen Bedingungen unternommen. Infektiositätsversuche konnten jedoch aufgrund der intrazerebralen Inokulation des gedrückten Probenmaterials nur mit physiologischen PBS-Lösungen durchgeführt werden, so dass die Beurteilung über den Einfluss des Puffermediums auf das Druckverhalten nativer Prionen auf den Untersuchungen des Druckeffektes auf die Proteinase K-Resistenz beruhen.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Dissoziation des PBS-Puffers und des Wassers unter Druck keinen Einfluss auf die Drucksensitivität von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  nimmt, da dessen PK-Resistenz sowohl in drucksensitiven, als auch in druckstabilen Medien bis unterhalb der Nachweisgrenze reduziert werden konnte. Unterschiede in der verbleibenden Infektiosität können jedoch nicht ausgeschlossen werden, da wie bereits erwähnt, TSE-Materialien mit negativem Immunoblot-Befund immer noch eine Infektiosität bis ca. 5 log  $\text{ID}_{50}$  u/g aufweisen können. Da immunologisch keine Unterschiede zwischen den getesteten Medien zu sehen sind, muss der Effekt von Druck auf den pH-Wert des Mediums gleichzeitig mit dem Effekt auf die Proteinstruktur erfolgen. Eine Druckbehandlung bei anfänglich neutralen Bedingungen führt somit unabhängig vom gewählten Medium zu einer Reduktion der PK-Resistenz infektiöser Prionen.

### ***Einfluss des pH-Wertes***

Bei einer Druckbehandlung in anfänglich schwach sauren Lösungen (PBS, pH 5,6 und Acetat-Puffer, pH 5,6) ist jedoch ein gegensätzliches Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup> zu beobachten, da in diesem Fall die PK-Resistenz erhalten bleibt. Demnach induzieren niedrige pH-Werte beim infektiösen Prion-Protein eine Druckstabilität. Unter Berücksichtigung der Druckinstabilität von PBS, kann mit einem tatsächlichen pH-Wert von ca. 3,2 bei 800 MPa gerechnet werden. Die Immunoblot-Ergebnisse sprechen für eine Stabilisierung der Proteinstruktur während der Druckeinwirkung. Dieser protektive Effekt könnte auf eine pH-induzierte Aggregation der Prion-Proteine zurückgeführt werden, die vermutlich ausreichend war, um die Wirkung des Druckes zu inhibieren. Es ist bekannt, dass Prion-Proteine im schwach sauren Milieu (pH < 6) unter Beibehaltung ihrer Infektiosität aggregieren (Prusiner et al. 1981, Cai et al. 2002). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das PK-resistente und neurotoxische PrP-Peptid (106-126) bei niedrigen pH-Werten einen höheren  $\beta$ -Faltblattanteil besitzt als bei neutralen Bedingungen (Selvaggini et al. 1993). Angenommen es ist bereits vor der Druckbehandlung durch den sauren pH zu einer Erhöhung des  $\beta$ -Faltblattanteils gekommen, dann könnte dies die erhöhte Druckresistenz erklären. Ein höherer Anteil an  $\beta$ -Strukturen könnte auch die unter sauren Bedingungen beobachtete (Prusiner et al. 1981, Cai et al. 2002) Erhöhung des Aggregationsgrades erklären. Daraus lässt sich schließen, dass saure pH-Bedingungen Konformationsänderungen im Prion-Protein induzieren, die mit einer erhöhten Druckresistenz einhergehen.

Das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup> unter sauren Bedingungen zeigt Parallelitäten mit dem Verhalten von isolierten Prionen unter Druck, in beiden Fällen ist allem Anschein nach durch Konformationsänderungen die beobachtete Druckstabilität induziert worden. In beiden Fällen könnte diese Druckstabilität auf eine stärkere Aggregation der Prion-Proteine, verursacht durch einen erhöhten  $\beta$ -Faltblattanteil, zurückgeführt werden. Dies würde dann wiederum im Einklang mit der in der Literatur berichteten Druckstabilität von Proteinen mit hohem  $\beta$ -Faltblattanteil stehen.

### ***Einfluss der Ionenstärke***

Die Ergebnisse zeigten, dass auch die Ionenstärke des Druckmediums einen entscheidenden Einfluss auf das Druckverhalten infektiöser Prionen nimmt. Während eine Druckbehandlung in Puffern mit geringen Salzkonzentrationen ähnliche

Ergebnisse lieferte, wie eine in reinem Wasser, zeigte es sich, dass PrP<sup>Sc</sup> in höher konzentriertem PBS druckstabil ist. Die höhere Konzentration an Ionen im Druckmedium könnte Einfluss auf die elektrostatischen Wechselwirkungen des Prion-Proteins nehmen. Wie bereits in Kapitel 6.1.1 diskutiert, spielen diese Wechselwirkungen aufgrund ihrer Druckinstabilität vermutlich eine wichtige Rolle beim drucksensitiven Verhalten nativer Prionen. Denkbar wären lokale Effekte auf geladene Aminosäurereste, die durch Stärkung elektrostatischer Wechselwirkungen zur Stabilisierung der Proteinstruktur führen. Bekräftigt wird diese These anhand von Berichten über die Stabilisierung intermolekularer  $\beta$ -Faltblattstrukturen durch elektrostatische Wechselwirkungen (Goossens et al. 2003). Die Stabilisierung der  $\beta$ -Faltblattstrukturen könnte daher für die beobachtete Druckstabilität von PrP<sup>Sc</sup> in PBS mit hoher Ionenstärke verantwortlich sein. Dies deutet erneut auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Stabilisierung bzw. der Erhöhung von  $\beta$ -Faltblattelementen und der damit verbundenen induzierten Druckresistenz infektiöser Prionen hin.

Ein weiterer Aspekt der bei der Druckstabilität von PrP<sup>Sc</sup> in PBS mit hoher Ionenstärke berücksichtigt werden muss, ist die aufgrund der Hydratationsneigung der Ionen herabgesetzte Löslichkeit von Proteinen in solch einem Puffer. Daher kann es zu einer verringerten Hydratation des PrP<sup>Sc</sup>-Moleküls kommen. Da der Hydratationsgrad eines Proteins einen entscheidenden Einfluss auf dessen Druckverhalten ausübt, können Änderungen in der Hydratation auch zu relevanten Änderungen im Druckverhalten von Proteinen führen.

### ***Einfluss der Homogenisierung***

Druckstudien an nicht homogenisierten, grob zerkleinerten infektiösen Hamstergehirnen und an in wässriger Lösung homogenisierten infektiösen Gehirnen zeigten deutliche Unterschiede bezüglich der PK-Resistenz und Infektiosität. Nur wenn das infektiöse Prion-Protein nach der Homogenisierung von Scrapie-Hamstergehirnen in wässriger Lösung vorliegt kann der Druck seine Wirkung auf dessen Konformation entfalten. Die Hochdruckbehandlung von in PBS homogenisiertem Material resultiert in einer Infektiositätsreduktion von 5,9 log-Einheiten, dagegen verliert nicht homogenisiertes Gehirngewebe nur 3,3 log-Einheiten an Infektiosität. Eine wichtige Rolle spielt dabei vermutlich die Hydratisierung des Prion-Proteins, die wie bereits erwähnt, das Druckverhalten eines Proteins entscheidend mitbestimmt. Es kann angenommen werden, dass das native Prion-Protein nach der Homogenisierung des

Gehirns in wässriger Lösung stärker hydratisiert vorliegt, als es in grob zerkleinertem Gehirngewebe der Fall ist. Um eine druckinduzierte Umfaltung des Proteins und die damit verbundene Reduktion der Proteinase K-Resistenz und Infektiosität zu erreichen, muss das infektiöse Prion-Protein in einer wässriger Lösung vorliegen.

### 6.1.5 Zusammenfassung der Druckeffekte auf das infektiöse Prion-Protein

Das im Gehirn Scrapie erkrankter Hamster vorkommende pathogene Prion-Protein PrP<sup>Sc</sup> erwies sich in seiner nativen Form (nach Homogenisierung in Wasser und in physiologischen Puffern) als drucklabil. Die Ergebnisse deuten eindeutig auf eine druckinduzierter Konformationsänderung hin, die zum Verlust der PK-Resistenz und Infektiosität führt. Auch das teilverdaute Prion-Protein PrP 27-30 verliert nach einer Druckbehandlung unter physiologischen Bedingungen im Gehirnhomogenat einen Teil seiner PK-Resistenz. Dagegen ist das mittels Ultrazentrifugation isolierte PrP 27-30 druckstabil. Gleiches Verhalten weist PrP<sup>Sc</sup> in Gehirnhomogenaten unter nicht physiologischen Bedingungen (saurer pH, hohe Ionenstärke) auf. Diese Diskrepanz im Druckverhalten zwischen nativen (unter physiologischen Bedingungen) und aufgereinigten bzw. nicht-nativen Prion-Proteinen (unter nicht physiologischen Bedingungen) deutet auf unterschiedliche Konformationsmöglichkeiten dieser Proteine hin. Allem Anschein nach existieren neben drucklabilen auch druckstabile Prion-Konformationen. Bekräftigt wird diese These durch die Tatsache, dass das Verhalten eines Proteins unter Druck durch dessen Struktur und Hydratisierung bestimmt wird. Druckempfindliche Proteine sind hydratisiert und besitzen komprimierbare Hohlräume und so genannte „packing defects“, während druckstabile Proteine sich als äußerst dicht gepackt und dehydriert auszeichnen. Die Bedeutung der Hydratisierung kann durch die Ergebnisse bezüglich des Einflusses der Homogenisierung infektiöser Gehirne auf das Druckverhalten des infektiösen Prion-Proteins bestätigt werden. In wässrigen Gehirnhomogenaten ist PrP<sup>Sc</sup> drucklabil während es in nicht homogenisierten Gehirnen druckstabil ist. Von großer Bedeutung sind zudem die Wechselwirkungen die zur Stabilisierung der Proteinstruktur beitragen. Hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen sind drucklabil und daher eher bei drucksensitiven Proteinstrukturen stabilitätsbestimmend. Die druckresistenten Wasserstoffbrückenbindungen spielen dagegen bei der Stabilisierung druckstabiler Proteinstrukturen die vorherrschende Rolle. Bezieht man nun all diese Fakten auf die

erhaltenen Ergebnisse über das Druckverhalten nativer und nicht-nativer Prion-Proteine, so kommt man zu dem Schluss, dass die Konformation des als drucksensitiv charakterisierten native Prion-Protein ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ ), wie es in Gehirnhomogenaten unter physiologischen Bedingungen hydratisiert vorliegt, vermutlich durch druck-sensitive hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert wird. Des Weiteren kann angenommen werden, dass diese Konformation interne nicht-solvatisierte Hohlräume und „packing defects“ besitzt. Das in grob zerkleinerten (nicht homogenisierten) Gehirnen vorliegende Prion-Protein weist vermutlich einen deutlich geringeren Hydratationsgrad auf als es im wässrigen Homogenat der Fall ist, wodurch sich die Konformation als druckstabiler auszeichnet. Die Konformation des druckstabilen isolierten Prion-Proteins (iPrP27-30) muss dagegen überwiegend aus dicht gepackten Strukturelementen, bei denen Wasser ausgeschlossen ist, bestehen und vorwiegend durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert werden. Diese Eigenschaften weisen die als druckstabil geltenden  $\beta$ -Faltblattstrukturen auf. Daher kann die Druckresistenz von isoliertem PrP27-30 auf dessen, spektroskopisch nachgewiesenen, hohen Anteil an  $\beta$ -Faltblattstrukturen (Pan et al. 1993) zurückgeführt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ultrazentrifugation des Prion-Proteins die entscheidende Konformationsänderung induziert hat. Dabei ist es nicht relevant, ob das komplette Protein,  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ , oder das N-terminal verkürzte Protein, PrP27-30, zentrifugiert wird, da in beiden Fällen eine Druckstabilität induziert worden ist (Abb. 5.11, S. 70). Es ist zwar bekannt, dass isoliertes  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  mit 43 % einen geringeren Anteil an  $\beta$ -Faltblattelementen beinhaltet als isoliertes PrP27-30, das einen Anteil von 54 % aufweist (Pan et al. 1993). Dieser Unterschied kann jedoch nicht das unterschiedliche Druckverhalten erklären, da in beiden Fällen die Aufreinigung mittels Ultrazentrifugation erfolgte, so dass es vermutlich in beiden Fällen zu einer Konformationsänderung kam. Bisher wurde angenommen, dass Studien am isolierten PrP27-30 relevant sind für das in Gehirnen an Scrapie erkrankter Tiere vorkommende  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ . Die Ergebnisse zeigen jedoch aufgrund der gravierenden Unterschiede im Druckverhalten beider Isoformen ernste Zweifel an dieser Annahme. Bisher sind aufgrund der physikalischen Eigenschaften von  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  keine spektroskopischen Studien an nativen infektiösen Prionen möglich. Ebenso ist bis heute die Tertiärstruktur dieses Proteins nicht bekannt. Die Daten die zu Modellen der Tertiärstruktur führten und die Daten über die Zusammensetzung der Sekundärstruktur stammten allesamt aus Untersuchungen an isolierten Prionen. Spektros-

kopische Untersuchungen von isoliertem PrP<sup>Sc</sup>, das nach der Aufreinigung wieder in Liposomen eingesetzt wurde zeigte einen um 9 % verringerten  $\beta$ -Faltblattanteil (Safar et al. 1993a). Dies bestätigt die Vermutung, dass das infektiöse Prion-Protein PrP<sup>Sc</sup> in unterschiedlich stabilen Konformationen vorliegen kann, deren Hauptunterschiede im  $\beta$ -Faltblattanteil und/oder in der Stabilisierung dieses Strukturelements zu suchen sind. Das Druckverhalten infektiöser Prionen in sauren Lösungen, bzw. in Puffern mit hoher Ionenstärke bekräftigen diese These, da unter diesen Umständen eine Erhöhung bzw. eine Stabilisierung der  $\beta$ -Faltblätter stattfinden kann. Der Anteil an  $\beta$ -Faltblattelementen und deren Anordnung beeinflusst wiederum den Aggregationsgrad der Prion-Proteine, der auch einen Einfluss auf das Druckverhalten nimmt. Ebenso begrenzt wie das Wissen über die native Struktur des PrP<sup>Sc</sup>, sind die Kenntnisse über den tatsächlichen Aggregationszustand von PrP<sup>Sc</sup> in Gehirnen Scrapie erkrankter Tiere. Sowohl die in präparierten Gehirnen erkrankter Tiere beobachteten SAF (scrapie-associated fibrils) als auch die bei der Aufreinigung von Scrapie-Gehirnen mittels Detergensextraktion und PK-Verdau gebildeten Prionrods sind infektiös und zeigen trotz gleichem biochemischen Verhalten morphologische Unterschiede (Barry et al. 1985, Merz et al. 1987). Es scheint so, als ob Prion-Fibrillen, die auf verschiedene Art und Weise erhalten worden sind, einen unterschiedlichen Aggregationszustand desselben Proteins darstellen. Ihre Morphologie scheint dabei von der Präparations- und Aufreinigungsprozedur abzuhängen. Ob die natürliche Prion-Proteinaggregate, die in amyloiden Plaques in Gehirnen erkrankter Tiere vorkommen, fibrilläre oder amorphe Strukturen zeigen, konnte bis heute nicht endgültig geklärt werden, man geht jedoch davon aus das sie von diffuser Struktur sind (Appel et al. 2001). Dies zeigt, dass Aufreinigungsprozeduren (pH-Änderungen, Chemikalien, Ultrazentrifugation) die Struktur nativer Prion-Proteine nachhaltig verändern kann, und dass daher die gegenwärtigen Modelle für die Proteinstruktur der Prionen, die allesamt aus aufgereinigten und somit nicht-nativen Prion-Proteinen basieren, nicht auf das tatsächliche, native Prion-Protein übertragbar sind. Für das hier beobachtete und diskutierte unterschiedliche Druckverhalten nativer und nicht-nativer Prion-Proteine dürften wohl Unterschiede in der Tertiär- und Quartärstruktur verantwortlich sein: Prionen mit fibrillären Strukturen (z.B. Aufreinigungsartefakte) sind druckstabil, dagegen ist das vermutlich in amorpher Struktur vorliegende native Prion-Protein in wässriger Lösung drucksensitiv (Abb. 6.1).

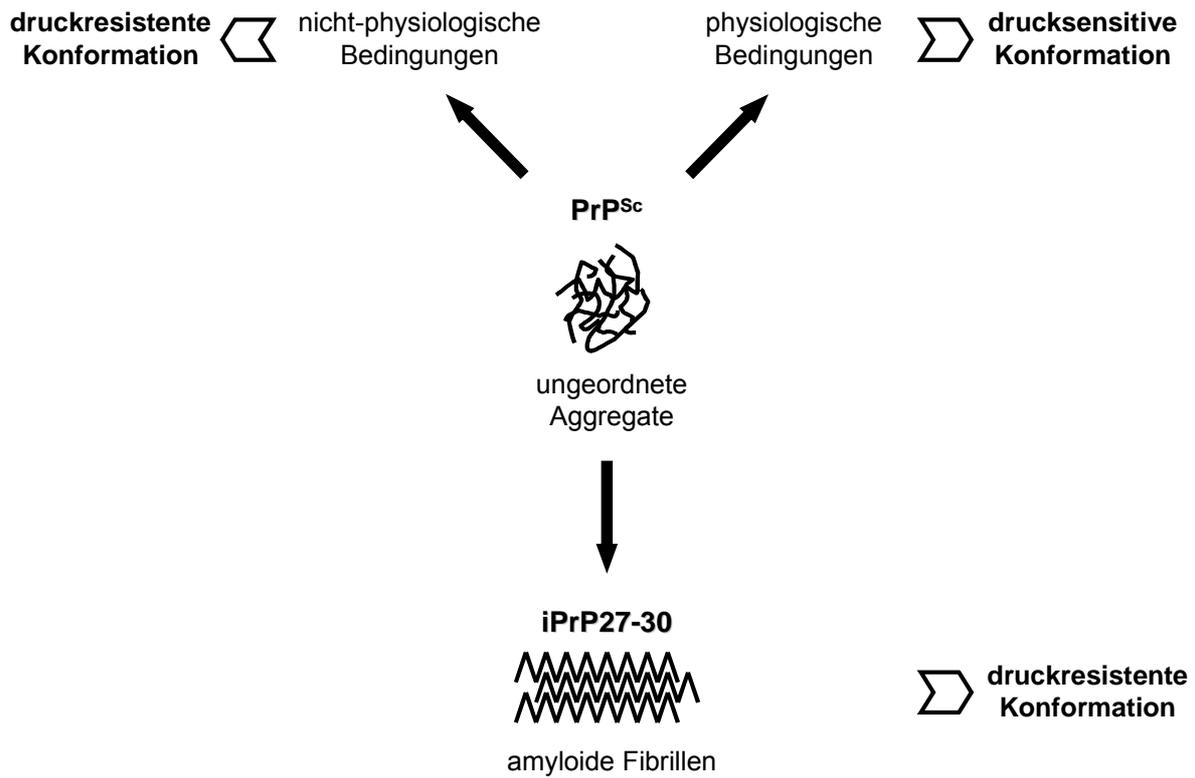


Abbildung 6.1: Druckverhalten unterschiedlicher Prion-Protein-Isoformen in wässriger Lösung.

## 6.2 Druckinaktivierung infektiöser Prion-Proteine

Da Prionen sämtliche Standardinaktivierungsprozesse, wie z.B. konventionelles Autoklavieren, ohne hohen Verlust an Infektiosität überstehen, gehören sie unter allen pathologischen Agenzien zu den resistantesten. Empfohlene Methoden zur Inaktivierung infektiöser Prionen sind u.a. Dampfsterilisation bei 133 °C für mind. 20 min und die Behandlung mit 1 M Natriumhydroxid-Lösung für 1 h bei Raumtemperatur. Derartige Behandlungen führen jedoch zur Unbrauchbarkeit des behandelten Materials. Eine Hochdruckbehandlung bei milden Temperaturen könnte dagegen eine schonende Inaktivierungsmethode darstellen. Die mögliche Anwendung von Hochdruck zur Inaktivierung Lebensmittel relevanter pathogener Mikroorganismen wurde bereits intensiv erforscht (zusammengefasst in Raso und Barbosas-Canovas 2003). Selbst die als äußerst persistent geltenden Bakterien sporen können durch kombinierte Temperatur/Druckbehandlung (400-700 MPa bei 40-70 °C) inaktiviert werden (zusammengefasst in Raso und Barbosas-Canovas 2003). Eine mögliche Inaktivierung infektiöser Prionen mittels Druck und Temperaturen unterhalb Sterilisationsbedingungen wurde bisher nicht untersucht. Daher liegen diesbezüglich keine Vergleichswerte vor, so dass hier die ersten Ergebnisse über die Hochdruckinaktivierung infektiöser Prionen vorgestellt werden.

Die Ergebnisse aus den durchgeführten Tierversuchen konnten zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen eine deutliche Reduktion der Infektiosität von Prionen unter Druckeinwirkung möglich ist. Als besonders effektiv stellte sich dabei eine zweistündige Behandlung bei 60 °C mit Drücken von 800 bis 1000 MPa heraus. Unter diesen Bedingungen konnte eine Reduktion der Infektiosität um ca. 6-7 log ID<sub>50</sub> u/g beobachtet werden. Bei einer Druckanwendung von 800 MPa unter gleichzeitiger Temperatureinwirkung von 80 °C konnte die Reduktion des Titers sogar auf ca. 8 log ID<sub>50</sub> u/g erhöht werden. Bereits nach einer 30-minütigen Druckeinwirkzeit bei 800 MPa und 80 °C ist eine Titerreduktion von ca. 7 log ID<sub>50</sub> u/g zu beobachten. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei wiederholtem Auf- und Abbauen des Druckes auf 800 MPa und 60 °C die Druckhaltezeit von 120 min auf insgesamt 15 min (3 mal 5 min) reduziert werden kann. Sowohl eine dreimalige Druckbehandlung von jeweils 5-minütiger Dauer, als auch eine einmalige 120-minütige Behandlung führen zu einer Reduktion der Infektiosität um ca. 6 log-Einheiten. Da die Wiederholung der Kompressions- und Dekompressionsphasen kombiniert mit einer relativ kurzen

Druckhaltezeit zu vergleichbaren Inaktivierungsraten führt wie eine lange Druckeinwirkzeit, scheinen die Kompressions- und Dekompressionsphasen von größerer Bedeutung zu sein, als die Druckhaldedauer. Vermutlich widerfahren dem Prion-Protein schon während des Druckaufbaus (ca. 150 sec bei 800 MPa) irreversible Strukturänderungen, die durch die schnelle Dekompression (wenige Sekunden) verstärkt werden. Dass eine längere Druckhaltezeit nicht unbedingt zu einer deutlich besseren Inaktivierungsrate führt, verdeutlicht Abbildung 5.14 (S.74). Daraus ist ersichtlich, dass der Großteil der infektiösen Prionen innerhalb der ersten 30 min inaktiviert wird. In der Zeitspanne von 30-120 min findet jeweils nur noch eine weitere Infektiositätsreduktion  $< 1$  log-Stufe statt. Aus der Abbildung kann ebenfalls entnommen werden, dass die Temperatur neben der Druckhöhe eine entscheidende Rolle bei der Inaktivierung infektiöser Prionen spielt. Nur bei einer Druckbehandlung unter erhöhter Temperatur ist eine Reduktion der Infektiosität zu beobachten gewesen. Die dabei zurückgebliebene Restinfektiosität fiel bei einer Druckbehandlung mit 800 MPa für 120 min je nach angewandter Temperatur mit Werten von 0,6 bis 2,5 log ID<sub>50</sub> u/g relativ gering aus (Tab. 6.1). Dabei ist zu berücksichtigen, dass bei der 80 °C-Behandlung nur 55 % der Versuchstiere an Scrapie erkrankten. Unterschiede in der Druckinaktivierung konnten zwischen Maus- (RML6-Stamm) und Hamster-Prion-Proteinen (263K-Stamm) beobachtet werden. Gleiche Druckbedingungen (800 MPa, 60 °C, 120 min) führten bei dem Hamster-Scrapie-Stamm (263K) zu einer um ca. 2 log ID<sub>50</sub> u/g besseren Inaktivierung. Obwohl bei der Dampfsterilisation (134 °C, 18 min, 3 bar) von TSE-Material aus Rinder-, Hamster- oder Mäusegehirnen ähnliche Inaktivierungsraten beobachtet wurden (Taylor 1996b), besitzen Maus- und Hamster-Prion-Proteine unterschiedliches Druckverhalten. Vermutlich resultiert dieser Unterschied aus Differenzen in der Proteinkonformation und im Aggregations- und Hydratationsgrad.

Die hier beschriebene Druckinaktivierung infektiöser Prionen zeigt große Ähnlichkeiten mit der Inaktivierung mittels Dampfsterilisation. In beiden Fällen kann die Inaktivierung mit steigender Temperatur und zunehmender Dauer erhöht werden. Ab einer 30-minütigen Druckbehandlung ist wie bei der Dampfsterilisation jedoch keine deutlich größere Titerreduktion mehr zu beobachten. Daher kann, wie in Abbildung 5.14 (S.74) angedeutet, von einem exponentiellen Verlauf der Druckinaktivierung infektiöser Prionen ausgegangen werden. Die Kinetik der Druckinaktivierung kann

analog zur Dampfsterilisation (Rohwer 1984a) mit einer Zerfallsreaktion 1. Ordnung beschrieben werden. Eine weitere Gemeinsamkeit ist die Tatsache, dass ein Teil der infektiösen Prion-Proteine die Prozedur unbeschadet überstehen. Kinetische Inaktivierungsstudien mit dem Scrapie-Erreger bestätigten, dass die Resistenz dieses TSE-Erregers gegenüber vielen Inaktivierungsmitteln auf eine kleine Fraktion beschränkt ist (Rohwer 1984b). Die Hauptfraktion der Infektiosität ist dagegen sensitiv gegenüber Inaktivierung. Die hier erhaltenen Ergebnisse zur Druckinaktivierung stimmen mit den Schlussfolgerungen von Rohwer überein, da selbst nach einer Druckbehandlung mit 800 MPa und 80 °C für 120 min noch ein kleiner Teil an infektiöse Prionen detektiert werden konnte. Zurückzuführen ist dies vermutlich auf eine heterogene Population der Prionen, die unterschiedliches Inaktivierungsverhalten aufzeigen. Des Weiteren könnte ein Verklumpen der Prionen eine Schutzwirkung besitzen. Es gibt Vermutungen, dass die enorme Resistenz eines Teils des Scrapie-Erregers gegenüber Hitze und Chemikalien auf einen schützenden Effekt durch Aggregation zurückzuführen ist (Taylor 1991). Im Kapitel zuvor wurde bereits über die Auswirkung des Verlustes an freiem Wasser auf den  $\beta$ -Faltblattanteil von isolierten Prionen diskutiert. Safar et al. (1993b) beobachtete in diesem Fall eine erhöhte Aggregation und thermische Resistenz des Prion-Proteins, die auf den gestiegenen  $\beta$ -Faltblattanteil zurückzuführen waren. Das Vorhandensein einzelner stark aggregierter Prion-Fractionen, die eine ausgeprägte Druckresistenz aufzeigen, könnte somit für die beobachtete Restinfektiosität verantwortlich sein. Einen weiteren wichtigen Einflussfaktor stellt vermutlich die Hydratation des Prion-Proteins dar. Im vorausgegangenen Kapitel wurde bereits der Einfluss der Hydratation auf das Druckverhalten des Prion-Proteins diskutiert. Die Inaktivierungsversuche deuten nun darauf hin, dass sie auch bei der Inaktivierung der Prionen von wesentlicher Bedeutung ist. Es ist bekannt, dass auf Oberflächen (z.B. Metall oder Glas) verschmiertes und angetrocknetes infektiöses Gehirnmateriale weitaus schwieriger zu inaktivieren ist als in Wasser mazeriertes oder homogenisiertes Gehirngewebe (Asher et al. 1986, Taylor et al. 1994, Taylor et al. 1998). Es wird angenommen, dass es zur Dehydratation des auf der Oberfläche verschmierten Gewebes kommt. Das Antrocknen und Dehydrieren infektiösen Gewebes könnte daher auch für die beobachtete geringere Druckinaktivierung von zerkleinertem und nicht homogenisiertem Scrapie-Gehirngewebe verantwortlich sein. Vermutlich kommt es bei der Hochdruckbehandlung des nicht homogenisierten Gehirngewebes zur

---

Dehydratation und Fixierung des PrP<sup>Sc</sup>, dessen Druckstabilität dadurch erhöht wird und somit vor einer Inaktivierung geschützt wird.

Die Hochdruckbehandlung infektiöser Gehirnhomogenate zeigte einen eindeutigen Effekt von Hochdruck auf die Infektiosität des Hamster-adaptierten Scrapie-Stammes 263K. Je nach gewählten Druckbedingungen (Temperatur, Zeit) zeigt eine Druckanwendung von 800 MPa ähnliche und zum Teil bessere Inaktivierungsraten als die zur Inaktivierung infektiöser TSE-Materialien empfohlenen Inaktivierungsmethoden (Tab. 6.1). Die dabei angewandten maximalen Temperaturen liegen mit 60-80 °C deutlich unterhalb konventioneller Sterilisationsbedingungen. So liefert beispielsweise eine Hochdruckbehandlung bei 800 MPa und 60 °C für 30 min eine ähnliche Inaktivierungsrate wie die Dampfsterilisation bei 134 °C für 30 min oder wie eine einstündige Behandlung mit 1M Natronlauge. Beim Vergleich dieser Methoden muss jedoch hervorgehoben werden, dass die Druckbehandlung weitaus materialchonender ist, und daher eine Weiterverarbeitung des behandelten Materials ermöglicht. Selbst die sehr effektiven Inaktivierungsraten, die mittels „Porous-load“-Autoklavierung (Autoklav zieht vor und nach dem Sterilisationsprozess Vakuum, daher für Fluide nicht geeignet) erhalten werden, können mittels Hochdruckbehandlung bei 800 MPa und 80 °C für 30 min erreicht werden. Die Inaktivierungsdaten der Hochdruckbehandlung zeigen jedoch wie die der Dampfdrucksterilisation ein uneinheitliches Bild. Da es sich hierbei um einen komplexen Vorgang handelt, bei dem viele Einflussgrößen eine Rolle spielen, gestaltet sich die Ursachensuche schwierig. Mögliche Gründe für unterschiedliche Ergebnisse können in der Unzulänglichkeit des Mediums liegen (z.B. Verteilung auf Fettphase) oder auch durch unterschiedliche Anteile an besonders resistenten Prion-Subpopulationen. Ein entscheidender Faktor spielt jedoch die Vorbehandlung des infektiösen Materials (intaktes, zerkleinertes, mazeriertes oder homogenisiertes Gehirngewebe) und die Versuchsdurchführung (z.B. ruhendes oder rührendes Medium). So erwies sich beispielsweise auf Oberflächen verschmiertes und angetrocknetes infektiöses Gehirngewebe als besonders resistent (Tabelle 6.1).

**Tabelle 6.1: Inaktivierung des Hamster-Scrapie-Stammes 263K.**

Vergleich unterschiedlicher Inaktivierungsmethoden zur Dekontamination infektiöser Prionen. PL, „Porous-Load“-Autoklavierung: Evakuierung der Luft mittels Vakuum. <sup>1)</sup> Ernst und Race 1993, <sup>2)</sup> Brown et al. 1990a; <sup>3)</sup> Taylor et al. 1998, <sup>4)</sup> Taylor et al. 1994. \* nicht homogenisiertes, grob zerkleinertes Gehirngewebe.

Inaktivierungsmethode	Gehirnmaterial	Titerreduktion (log ID <sub>50</sub> u/g)	Restinfektiosität (log ID <sub>50</sub> u/g)
800 MPa, 60 °C, 120 min	zerkleinertes Gewebe*	3,3	5,1
800 MPa, 60 °C, 120 min	Homogenat (10 % w/v)	5,9	2,5
800 MPa, 60 °C, 3x5 min	Homogenat (10 % w/v)	6,4	2,0
800 MPa, 60 °C, 30 min	Homogenat (10 % w/v)	5,0	3,4
800 MPa, 80 °C, 30 min	Homogenat (10 % w/v)	7,4	1,0
121 °C, 60 min <sup>1)</sup>	Homogenat (10 % w/v)	5,4	4,0
134 °C, 60 min <sup>1)</sup>	Homogenat (10 % w/v)	6,7	2,7
134 °C, 30 min <sup>2)</sup>	mazeriert	5,3	3,5
PL: 134 °C, 18 min <sup>3)</sup>	mazeriert, angetrocknet	3,3	5,0
PL: 134 °C, 18 min <sup>4)</sup>	mazeriert	7,2	2,1
1 M NaOH, 60 min <sup>4)</sup>	Homogenat (10 % w/v)	5,5	3,8

## 7 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Verantwortlich für das Druckverhalten von Proteinen ist deren Konformation, die durch viele Faktoren beeinflusst werden kann (z. B. Pufferbedingungen, pH-Wert, Salzkonzentration; Temperatur, Detergentien). Welche Konformation ein Protein dabei unter den gewählten Bedingungen einnimmt, hängt vom „energy landscape“ des Proteins ab. Konformationsänderungen werden ermöglicht, wenn der Übergang in einen anderen Zustand (z. B. gefaltet → intermediat → ungefaltet) energetisch begünstigt wird. Druck begünstigt Konformationen mit geringerem Volumen. Damit ein Protein unter Druck umfalten kann, muss es eine Konformation mit kleinerem Volumen als zuvor einnehmen können. Daher sollte es interne, nicht-solvatisierte Hohlräume und Packungsdefekte aufweisen. Des Weiteren sollten die stabilitätsbestimmenden Wechselwirkungen elektrostatischer und hydrophober Natur sein. Zeigt nun ein und dasselbe Protein bei unterschiedlichen Umgebungsbedingungen verschieden druckstabiles Verhalten, so können Unterschiede bzgl. der Faltung, der stabilisierenden Wechselwirkungen und dem Hydratations- und Aggregatzustandes angenommen werden, da all diese Faktoren die Druckstabilität eines Proteins bestimmen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass das infektiöse Hamster-Prion-Protein je nach Umgebungsbedingung (pH-Änderung, hohe Salzkonzentration) und Aufarbeitung (Homogenisierung, Ultrazentrifugation) verschiedene Druckstabilitäten besitzt. Die unterschiedliche Druckempfindlichkeit geht höchstwahrscheinlich auf verschieden gefaltete Protein-Konformere zurück. Besonders deutliche Unterschiede im Druckverhalten konnten zwischen nativen Prion-Proteinen in infizierten Gehirnhomogenaten und isolierten, resuspendierten Prion-Proteinen gezeigt werden. Da angenommen wird, dass beide Formen überwiegend  $\beta$ -Faltblattstrukturelemente enthalten und dass diese Strukturelemente für das charakteristische Verhalten der Prion-Proteine (extrem resistent gegenüber Hitze und Proteolyse) verantwortlich sind, muss es Unterschiede in der Stabilisierung dieser Strukturen bei nativen und isolierten Prion-Proteinen geben. Natives PrP<sup>Sc</sup> besitzt den Ergebnissen zufolge drucksensitive  $\beta$ -Faltblattstrukturen, die durch Druck destabilisiert werden, wodurch die PK-Resistenz und die, vermutlich daran gekoppelte, Infektiosität der Prionen deutlich reduziert werden kann. Dagegen weist isoliertes PrP27-30 äußerst druckstabile  $\beta$ -Faltblattstrukturen auf. Für die unterschiedlichen Stabilitäten der  $\beta$ -Faltblatt-

strukturen könnten Differenzen in der Tertiär- und Quartärstruktur mit einer Rolle spielen. Isolierte Prion-Proteine bilden Aufreinigungsartefakte die fibrilläre Strukturen (SAF, Prionrods) besitzen. Da Proteine mit fibrillären Struktureigenschaften (dicht gepackt, überwiegend Wasserstoffbrückenbindungen) als extrem druckstabil gelten, ist die beobachtete Druckresistenz von isolierten Prion-Proteinen nicht überraschend. Viel erstaunlicher ist dagegen die nachgewiesene Drucksensitivität nativer Prion-Proteine in Gehirnhomogenaten. Bisher existieren nur Modellvorstellungen über die Struktur von PrP<sup>Sc</sup>, sowohl Tertiär- als auch Quartärstruktur sind nicht bekannt. Bis heute wird angenommen, dass die Strukturanalysen isolierter Prion-Proteine auf native übertragen werden können, daher basieren alle Strukturmodelle auf Untersuchungen an isolierten Prion-Proteinen. Das im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesene unterschiedliche Druckverhalten deutet jedoch auf bisher nicht in Betracht gezogene Unterschiede in der Konformation isolierter und nativer Prion-Proteine hin. Die Diskrepanzen zwischen PrP<sup>Sc</sup> und iPrP27-30 legt die Vermutung nahe, dass native Prion-Proteine weniger dicht gepackt sind und mehr interne Hohlräume aufweisen als nach der Aufreinigungsprozedur. Weiter deuten die Ergebnisse auf eine Stabilisierung der Tertiär- und Quartärstruktur von PrP<sup>Sc</sup> durch drucksensitive hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen hin, während bei iPrP27-30 vermutlich druckstabile Wasserstoffbrückenbindungen überwiegen. Es könnte daher möglich sein, dass Druck eine Destabilisierung der Tertiär- bzw. Quartärstruktur induziert, die in eine Schwächung der Sekundärstruktur resultiert. Dass Druck letztendlich die Sekundärstruktur modifiziert, kann durch die Tatsache belegt werden, dass eine Reduktion des  $\beta$ -Faltblattanteils die thermodynamische Stabilität verringert und gleichzeitig zu einer Infektiositätsverminderung führt (Safar et al. 1993b). Zudem konnte gezeigt werden, dass die hitzeresistenteste Prion-Protein-Konformation, nämlich die von dehydrierten isolierten Prionen (Safar et al. 1993b) auch die druckstabilste ist. Dies verdeutlicht die wichtige Rolle der Hydratation infektiöser Prion-Proteine, sowohl bei deren Faltung als auch bei deren Inaktivierung.

Die Hochdruckbehandlung infektiöser Hamster-Prion-Proteine lieferte nicht nur Informationen über die Komplexe und bis heute nicht geklärte Faltung dieser Proteine. Sie bietet sich zudem als durchaus ernst zunehmende Alternative zur Inaktivierung infektiöser TSE-Materialien an. Im Vergleich zu den herkömmlichen Inaktivierungsmethoden (133 °C, 20 min, 3 bar; 1 M NaOH, 60 min) für infektiöse

Prionen schneidet die Druckbehandlung (800 MPa, 60-80 °C, 30-120 min bzw. 3-mal 5 min) dabei sehr gut ab und ist zudem weitaus schonender, so dass eine Weiterverarbeitung des behandelten Materials gewährleistet wäre. Dabei ist jedoch zu beachten, dass das infektiöse Material homogenisiert in wässriger Phase vorliegen muss und dass die Hochdruckbehandlung in Kombination mit Hitze stattfindet. Unter der Berücksichtigung, dass von den empfohlenen Standard-Dekontaminationsmethoden auch keine in der Lage ist die Infektiosität gänzlich zu zerstören, und dass eine orale Infektion im Vergleich zu der hier angewandten intrazerebralen Inokulation laut Diringer et al. (1994)  $10^5$ -fach bzw. laut Prusiner et al. (1985)  $10^9$ -fach schwächer ist, kann die erhaltene Infektiositätsreduktion (7-8 log ID<sub>50</sub> u/g, Restinfektiosität < 1 log ID<sub>50</sub> u/g) durchaus als gut beurteilt werden. Dennoch ist eine Weiterverarbeitung (z.B. als Tiermehl) von druckinaktiviertem Material mit Vorsicht zu genießen, da ein kleiner Teil der Infektiosität unbeschadet die Behandlungen überstanden hat, so dass von einem, wenn auch sehr geringen Restrisiko ausgegangen werden muss. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass mittels der Hochdrucktechnologie infektiöse Prionen (hier am Beispiel von Hamster-Prion-Proteinen gezeigt) bei Temperaturen deutlich unterhalb Sterilisationsbedingungen effektiv inaktiviert werden können. Die hier diskutierten Ergebnisse der Druckinaktivierung der Scrapie-Erreger geben Anlass zu weiteren Optimierungsversuchen. Bisher konnte nur nach einstündigem Autoklavieren bei 121 °C bei vorausgegangener einstündiger Natronlaugebehandlung (1M) bzw. nach Autoklavieren (121 °C, 30 min) in 1M Natronlauge keine Infektiosität mehr nachgewiesen werden. (Taylor 2001). Derartige Behandlungen führen jedoch zur vollständigen Vernichtung des zu dekontaminierenden Materials so dass die Frage einer möglichen Weiterverarbeitung erst gar nicht aufkommt.

Inwieweit das Druckverhalten der hier untersuchten Hamster-Scrapie-Prionen auf die für die Lebensmittelsicherheit relevanten BSE-Prionen übertragbar ist, müssen Druckversuche mit BSE-Material zeigen. Da der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Hamster-Scrapie-Stamm 263K jedoch einer der resistentesten TSE-Stränge darstellt (Brown et al. 2000), besteht Hoffnung, dass auch der BSE-Erreger mittels Hochdruck inaktiviert werden kann. Zu beachten ist, dass es zudem Faktoren gibt, die sich negativ auf das Druckverhalten und somit auf die Druckinaktivierung infektiöser Prion-Proteine auswirken können (z. B. saure pH-Bedingungen; hohe

Salzkonzentrationen; dehydriertes oder getrocknetes Gewebe), sind Druckversuche mit BSE-infiziertem Tiermehl bzw. BSE-infizierten Lebensmitteln (z.B. Rindfleisch, Wurst) von besonderem Interesse.

## 8 Literaturverzeichnis

- Akasaka, K., Tezuka, T., Yamada, H. (1997). Pressure induced changes in the folded structure of lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, 271, 671-678.
- Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., Clarke, M.C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, 214, 764-766.
- Alper, T., Haig, D.A., Clarke, M.C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 22, 278-284.
- Appel, T.R., Wolff, M., von Rheinbaben, F., Heinzl, M., Riesner, D. (2001). Heat stability of prion rods and recombinant prion protein in water, lipid and lipid-water mixtures. *Journal of General Virology*, 82, 465-473.
- Asher, D.M., Pomeroy, K.I., Murphy, L., Rohwer, R.G., Gibbs, C.J., Gajdusek, D.V. (1986). Practical inactivation of scrapie agent on surfaces. *Abstracts of the IX<sup>th</sup> International Congress of Infectious and Parasitic Diseases*, Munich, 20-26 July.
- Balny, C., (2004). Pressure effects on weak interactions in biological systems. *Journal of Physics Condensed Matter*, 16, 1245-1253.
- Balny, C., Masson, P. (1993). Effects of high pressure on proteins. *Food Reviews International*, 9, 611-628.
- BArbBl, 2003. Biologische Arbeitsstoffe, Beschluss 603. *Bundesarbeitsblatt*, Heft 3, 2003, S.55-67.
- Barry, R.A., McKinley, M.P., Bendheim, P.E., Lewis, G.K., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. (1985). Antibodies to the scrapie protein decorate prion rods, *Journal of Immunology*, 135, 603-613.
- Baskakov, I.V., Legname, G., Baldwin, M.A., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. (2002). Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 21140-21148.
- Belay, E.D. (1999). Transmissible spongiforme encephalopathies in humans. *Annual Review of Microbiology*, 53, 283-314.
- Belitz, H.-D., Grosch, W. (1992). 1.4.2.4. Denaturierung, in *Lehrbuch der Lebensmittel-chemie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York London Paris Tokyo Hong Kong Barcelona Budapest. p. 54.
- Bolton, D.C., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. (1984). Molecular characteristics of the major scrapie prion protein. *Biochemistry*, 23, 5898-5906.
- Bolton, D.C., Bendheim, P.E., Marmorstein, A.D., Potempska, A. (1987). Isolation and structural studies of the intact scrapie agent protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 258, 579-590.

- Bolton, D.C., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, 218, 1309-1311.
- Bolton, D.C., Meyer, R.K., Prusiner, S.B. (1985). Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *Journal of Virology*, 53, 596-606.
- Bridgman, P.W. (1914). The coagulation of Albumen by pressure. *Journal of Biological Chemistry*, 19, 511-512.
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., Kretzschmar, H. (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, 390, 684-687.
- Brown, D.R., Wong, B.S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S.J., Jones, I.M. (1999). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochemical Journal*, 344, 1-5.
- Brown, P. (1998). BSE: the final resting place. *Lancet*, 351, 1146-1147.
- Brown, P., Rohwer, R.G., Green, E.M., Gajdusek, D.C. (1982a). Effect of chemicals, heat, and histopathologic processing on high-infectivity hamster-adapted scrapie virus. *Journal of Infectious Diseases*, 145, 683-687.
- Brown, P., Gibbs, C.J., Amyx, H.L., Kingsbury, D.T., Rohwer, R.G., Sulima, M.P., Gajdusek, D.C. (1982b). Chemical Disinfection of Creutzfeldt-Jakob Disease virus. *New England Journal of Medicine*, 306, 1279-1282.
- Brown, P., Meyer, R., Cardone, F., Pocchiari, M. (2003). Ultra-high-pressure inactivation of prion infectivity in processed meat: a practical method to prevent human infection. *Proceedings of the National Academic Science of USA*, 100, 6093-6097.
- Brown, P., Rohwer, R.G., Gajdusek, D.C. (1986). Newer data on the inactivation of scrapie virus or Creutzfeld-Jakob Disease virus in brain-tissue. *Journal of Infectious Diseases*, 153, 1145-1148.
- Brown, P., Will, R.G., Bradley, R., Asher, D.M., Detwiler, L. (2001). Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeld-Jakob disease: background, evolution, and current concerns. *Emerging Infectious Diseases*, 7, 6-16.
- Brown, P., Liberski, P.P., Wolff, A., Gajdusek, D.C. (1990a). Resistance of scrapie infectivity to steam autoclaving after formaldehyde fixation and limited survival after ashing at 360 degrees C: practical and theoretical implications. *Journal of Infectious Diseases*, 161, 467-472.
- Brown, P., Wolff, A., Gajdusek, D.C. (1990b). A simple and effective method for inactivating virus infectivity in formalin-fixed tissue samples from patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, 40, 887-90.

- Brown, P., Rau, E.H., Johnson, B.K., Bacote, A.E., Gibbs, Jr., C.J., Gajdusek, D.C. (2000). New studies on the heat resistance of hamster-adapted scrapie agent: Threshold survival after ashing at 600 °C suggest an inorganic template of replication. *Proceedings of the National Academic Science of USA*, 97, 3418-3421.
- Bruce, M.E., Dickinson, A.G. (1987). Biological evidence that scrapie agent has an independent genome. *Journal of General Virology*, 68, 79-89.
- Budka, H., Aguzzi, A., Brown, P., Brucher, J.M., Bugiani, O., Collinge, J., Diringier, H., Gullotta, F., Haltia, M., Hauw, J.J. (1995). Tissue handling in suspected Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathology*, 5, 319-322.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.A., Autenried, P., Aguet, M., Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73, 1339-47.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H.P., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Aguet, M., Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, 356, 577-582.
- Butz, P., Fernandez Garcia, A., Fister, H., Tauscher, B. (1997). Influence of high hydrostatic pressure on aspartame: instability at neutral pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 302-303.
- Cai, K., Miller, J.L., Stenland, C.J., Gilligan, K.J., Hartwell, R.C., Terry, D.C. (2002). Solvent-dependent precipitation of prion protein. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1597, 28-35.
- Castilla, J., Saá, P., Hetz, C., Soto, C. (2005). In Vitro Generation of Infectious Scrapie Prions. *Cell*, 121, 195-206.
- Caughey, B., Kocisko, D.A., Raymond, G.J., Lansbury, P.T. Jr. (1995). Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chemical Biology*, 2, 807-817.
- Chandler, R.L. (1961). Encephalopathy in mice produced by oculation with Scrapie brain material. *Lancet*, 1, 1378-1379.
- Chiesa, R., Piccardo, P., Ghetti, B., Harris, D.A. (1998). Neurological illness in transgenic mice expressing a prion protein with an insertional mutation. *Neuron*, 21, 1339-1351.
- Cohen, F.E., Prusiner, S.B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 67, 793-819.
- Collinge, J. (1999). Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 354, 317-323.

- Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annual Review of Neuroscience*, 24, 519-550.
- Collinge, J., Rossor, M. (1996). A new variant of prion disease. *Lancet*, 247, 916-917.
- Come, J.H., Fraser, P.E., Lansbury, P.T. Jr. (1993). A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 59-63.
- Cordeiro, Y, Kraineva, J., Winter, R., Silva, J.L. (2005). Volume and energy folding landscape of prion protein revealed by pressure. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 1195-1201.
- Cordeiro, Y., Kraineva, J., Ravindra, R., Lima, L.M., Gomes, M.P., Foguel, D., Winter, R., Silva, J.L. (2004). Hydration and packing effects on prion folding and beta-sheet conversion. High pressure spectroscopy and pressure perturbation calorimetry studies. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 32354-32359.
- Creutzfeld, H.G. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 57, 1-18.
- Cuillé, J., Chelle, J.P. (1936). La maladie dite tremplante du mouton est-elle inoculable ? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 203, 1552-1554.
- DeArmond, S.J., Ironside, J.W. (1999). Neuropathology of Prion Diseases. In *Prion Biology and Diseases*, Prusiner, S.B. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 585-652.
- Dickinson, A.G., Outram, G.W. (1988). Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Foundation Symposia*, 135, 63-83.
- Diener, T.O. (1972). Is the scrapie agent a viroid ? *Nature New Biology*, 235, 218-219.
- Dill, K.A., (1985). Theory for the folding and stability of globular proteins. *Biochemistry* 24,1501-1509.
- Diringer, H., Beekes, M., Oberdieck, U. (1994). The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Annals of the New York Academy of Science*, 724, 246-258.
- Dirix, C., Meersmann, F., MacPhee, C.E., Dobson, C.M., Heremans, K. (2005). High hydrostatic pressure dissociates early aggregates of TTR105-115, but not the mature amyloid fibrils. *Journal of Molecular Biology*, 347, 903-909.
- Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Wright, P.E., Dyson, H.J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 13452-13457.

- Dormont, D. (2002). Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *FEBS Letter*, 529, 17-21.
- Dubois, J., Ismail, A.A., Chan, S.L., Ali-Khan, Z. (1999). Fourier transform infrared spectroscopic investigation of temperature- and pressure-induced disaggregation of amyloid A. *Scandinavian Journal of Immunology*, 49, 376-380.
- Eigen, M. (1996). Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophysical Chemistry*, 63, 1-18.
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S.B., Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry*, 28, 8380-8388.
- Ernst, D.R., Race, R.E. (1993). Comparative analysis of scrapie agent inactivation methods. *Journal of Virological Methods*, 41, 193-202.
- EU-Entscheidung vom 18. Juli 1996 über die Zulassung alternativer Verfahren zur Hitzebehandlung von tierischen Abfällen im Hinblick auf die Inaktivierung der Erreger der spongiformen Enzephalopathien. Entscheidung 96/449/EG, *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaft*, Brüssel, 1996.
- Ferguson, N.M., Ghani, A.C., Donnelly, C.A., Hagensars, T.J., Anderson, R.M. (2002). Estimating the human health risk from possible BSE infection of the British sheep flock. *Nature*, 410, 165-166.
- Ferrao-Gonzales, A.D., Souto, S.O., Silva, J.L., Foguel, D. (2000). The pre-aggregated state of an amyloidogenic protein: hydrostatic pressure converts native transthyretin into the amyloidogenic state. *Proceedings of the National Academic Science of USA*, 97, 6445-6450.
- Fischer, M., Rulicke, T., Raeber, A., Sailer, A., Moser, M., Oesch, B., Brandner, S., Aguzzi, A., Weissmann, C. (1996). Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO Journal*, 15, 1255-1264.
- Frankenfeld, K.N., Powers, E.T., Kelly, J.W. (2005). Influence of the N-terminal domain on the aggregation properties of the prion protein. *Protein Science*, 14, 2154-2166.
- Funtenberger, S., Dumay, E., Cheftel, J.C. (1995). Pressure-induced aggregation of  $\beta$ -lactoglobulin in pH 7.0 buffers. *Lebensmittelwissenschaft und Technologie*, 28, 410-418.
- Gajdusek, D.C. (1977). Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science*, 197, 934-960.
- Gibson, R.A., Hunter, G.D. (1967). Nature of the scrapie agent. *Nature*, 215, 1041-1043.

- Goossens, K., Haelewyn, J., Meersmann, F., De Ley, M., Heremans, K. (2003). Pressure- and temperature-induced unfolding and aggregation of recombinant human interferon- $\gamma$ : a Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biochemical Journal*, 370, 529-535.
- Griffith, J.S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, 215, 1043-1044.
- Groschup, M.H., Hörnlimann, B., Buschmann, A. (2001). Die „natürliche“ und iatrogene Übertragbarkeit der Prionkrankheiten. In *Prionen und Prionkrankheiten*. Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar H. (Hrsg.), De Gruyter, Berlin, 361-377.
- Gross, M., Jaenicke, R. (1994). Proteins under Pressure. *European Journal of Biochemistry*, 221, 617-630.
- Grünewald, K (1994). *Handbuch des Tierkörperbeseitigungsrechts*. Richard Boorberg Verlag, Stuttgart.
- Hamann, S.D. (1980). The Role of Electrostriction in High-Pressure Chemistry. *Review of Physical Chemistry of Japan*, 50, 147-168.
- Hawley, S.A. (1971). Reversible pressure/temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry*, 10, 2436-2442.
- Heremans, K. (2005). Protein dynamics: hydration and cavities. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 1157-1165.
- Heremans, K. (1982). High pressure effects on proteins and other biomolecules. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 11, 1-21.
- Heremans, K., Meersman, F., Pfeiffer, H., Rubens, P., Smeller, L., (2000). Pressure effects on biopolymer structure and dynamics. *High Pressure Research*, 19, 623-630.
- Hill, A.F., Antoniou, M., Collinge, J. (1999). Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *Journal of General Virology*, 80, 11-14.
- Hilmert, H. und Diring, H. (1984). A rapid and efficient method to enrich SAF-protein from scrapie brains of hamsters. *Bioscience Report*, 4, 165-170.
- Hörnlimann, B. (2001). Historische Einführung Prionen und Prionkrankheiten. In *Prionen und Prionkrankheiten*. Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar H. (Hrsg.), De Gruyter, Berlin, 4-21.
- Hsiao, K.K., Scott, M., Foster, D., Groth, D.F., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. (1990). Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein. *Science*, 250, 1587-1590.
- Huang, Z., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. (1996). Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Folding and Design*, 1, 13-19.

- 
- Hundt, C., Peyrin, J.M., Haik, S., Gauczynski, S., Leucht, C., Rieger, R., Riley, M.L., Deslys, J.P., Dormont, D., Lasmezas, C.I., Weiss, S. (2001). Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO Journal*, 20, 5876-5886.
- Hunter, G.D., Millson, G.C. (1964). Studies on the heat stability and chromatographic behaviour of the scrapie agent. *Journal of General Microbiology*, 37, 251-258.
- Ironside, J.W. (1998). Neuropathological findings in new variant CJD and experimental transmission of BSE. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 21, 91-95.
- Jakob, A. (1921). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudoklerose – Encephalo-myelopathie mit disseminierten Degenerationsherden. *Zeitschrift für die Gesamte Neurologie und Psychiatrie*, 64, 147-228.
- James, T.L., Liu, H., Ulyanov, N.B., Farr-Jones, S., Zhang, H., Donne, D.G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. (1997). Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94, 10086-10091.
- Jarrett, J.T., Lansbury, P.T. Jr. (1993). Seeding „one-dimensional crystallization“ of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie ? *Cell*, 73, 1055-1058.
- Kaneko, K., Peretz, D., Pan, K.M., Blochberger, T.C., Wille, H., Gabizon, R., Griffith, O.H., Cohen, F.E., Baldwin, M.A., Prusiner, S.B. (1995). Prion protein (PrP) synthetic peptides induce cellular PrP to acquire properties of the scrapie isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 11160-11164.
- Kaerber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologische Reihenversuche. *Archives of Experimental Pathology and Pharmacology*, 162, 480-483.
- Klatzo, I, Gajdusek, D.C., Zigas, V. (1959). Pathology of Kuru. *Laboratory Investigation*, 8, 799-847.
- Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T., Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, 370, 471-474.
- Kretzschmar, H.A., Prusiner, S.B., Stowring, L.E., DeArmond, S.J. (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *American Journal of Pathology*, 122, 1-5.

- Kuwata, K., Hua, L., Yamada, H., Legname, G., Prusiner, S., Akasaka, A., James, T.L. (2002). Locally disordered conformer of the hamster prion protein: a crucial intermediate to PrP<sup>Sc</sup>? *Biochemistry*, 41, 12277-12283.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lange, R., Mombelli, M., Torrent, J., Connelly, J., Afshar, M., Balny, C. (2002). Structural features and dynamics of protein unfolding. *Progress in Biotechnology*, 19, 7-16.
- Lasmézas, C.J., Deslys, J.P., Demaimay, R., Adjou, K.T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J., Hauw, J.J. (1996). BSE transmission to macaques. *Nature*, 381, 743-744.
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. (2004). Synthetic mammalian prions. *Science*, 305, 673-676.
- Ludwig, H. (2000). Allgemeine Prinzipien bei der Erzeugung und Anwendung von hydrostatischem Druck. *Hochschulkurs „Hochdruckpasteurisierung“*, September 2000, Universität Heidelberg.
- Ly-Nguyen, B., Van Loey, A.M., Smout C., Eren Ozcan, S., Fachin, D., Verlent, I., Vu Truong, S., Duvetter, T., Hendrickx, M.E. (2003). Mild-heat and high-pressure inactivation of carrot pectin methylesterase: a kinetic study. *Journal of Food Science* 68, 1377-1383.
- Makita, T. (1992). Application of high pressure and thermophysical properties of water to biotechnology. *Fluid Phase Equilibria*, 76, 87-95.
- Manson, J., West, J.D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M.H., Hope, J. (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*, 115, 117-122.
- Manson, J.C., Clarke, A.R., Hooper, M.L., Aitchison, L., McConnell, I., Hope, J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Molecular Neurobiology*, 8, 121-127.
- Manuelidis, L. (1997). Decontamination of Creutzfeldt-Jakob Disease and other transmissible agents. *Journal of Neurovirology*, 3, 62-65.
- Marsh, R.F., Kimberlin, R.H. (1975). Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. Clinical signs, pathology and pathogenesis. *Journal of Infectious Diseases*, 131, 104-110.
- Martins, V.R., Linden, R., Prado, M.A., Walz, R., Sakamoto, A.C., Izquierdo, I., Brentani, R.R. (2002). Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Letter*, 512, 25-28.
- McGowan, J.P. (1922). Scrapie in Sheep. *Scottish Journal of Agriculture*, 5, 365-375.

- 
- McKinley, M.P., Bolton, D.C., Prusiner, S.B. (1983b). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, 35, 57-62.
- McKinley, M.P., Masiarz, F.R., Isaacs, S.T., Hearst, J.E., Prusiner, S.B. (1983a). Resistance of the scrapie agent to inactivation by psoralens. *Photochemistry and Photobiology*, 37, 539-545.
- McKinley, M.P., Meyer, R.K., Kenaga, L., Rahbar, F., Cotter, R., Serban, A., Prusiner, S.B. (1991b). Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *Journal of Virology*, 65, 1340-1351.
- McKinley, M.P., Taraboulos, A., Kenaga, L., Serban, D., Stieber, A., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Gonatas, N. (1991a). Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Laboratory Investigation*, 65, 622-630.
- Merz, P.A., Kascsak R.J., Rubenstein, R., Carp, R.I., Wisniewski, H.M. (1987). Antisera to scrapie-associated fibril protein and prion protein decorate scrapie associated fibrils. *Journal of Virology*, 61, 42-49.
- Merz, P.A., Somerville, R.A., Wisniewski, H.M., Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta of Neuropathology*, 54, 63-74.
- Miura, T., Hori-i, A., Mototani, H., Takeuchi, H. (1999). Raman spectroscopic study on the copper(II) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence. *Biochemistry*, 38, 11560-11569.
- Mobley, W.C., Neve, R.L., Prusiner, S.B., McKinley, M.P. (1988). Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 9811-9815.
- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J.L., Lehmann, S., Launay, J.M., Kellermann, O. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science*, 289, 1925-1928.
- Mozhaev, V.V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., Balny, C (1994). Exploiting the effects of high hydrostatic pressure in biotechnological applications. *Trends in Biotechnology*, 12, 493-501.
- Mozhaev, V.V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., Balny, C. (1996). High Pressure Effects on Protein Structure and Function. *Proteins*, 24, 81-91.
- Narang, H. (2002). A critical review of the nature of spongiform encephalopathy agent: prion theory versus virus theory. *Experimental Biology and Medicine*, 227, 4-19.

- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B., Weissmann, C. (1985). A cellular gene encodes Scrapie PrP<sup>27-30</sup> Protein. *Cell*, 40, 735-746.
- Ostertag von, R. (1958). *Die Tierkörperverwertung*. Paul Parey, Berlin.
- Palmer, M.S., Collinge, J. (1993). Mutations and polymorphisms in the Prion protein gene. *Human Mutation*, 2, 168-173.
- Pan, K.M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 10962-10966.
- Pattison, I.H., Jones, K.M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *The Veterinary Record*, 80, 2-9.
- Pattison, I.H., Millson, G.C. (1961). Experimental transmission of Scrapie to goats and sheep by the oral route. *Journal of Comparative Pathology*, 71, 171-176.
- Peuschel, K.E. (2000). Pitfalls in prion research. *Medical Hypotheses*, 54, 698-700.
- Post, K., Brown, D.R., Groschup, M., Kretzschmar, H.A., Riesner, D. (2000). Neurotoxicity but not infectivity of prion protein can be induced reversibly in vitro. *Archives of Virology*, Suppl. 16, 265-273.
- Prusiner, S.B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216, 136-144.
- Prusiner, S.B. (1990). Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252, 1515-1522.
- Prusiner, S.B. (1997). Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278, 245-251.
- Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 13363-13383.
- Prusiner, S.B. (2001). Die Geschichte der Erforschung von Prionen. In *Prionen und Prionenkrankheiten*. Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar H. (Hrsg.), De Gruyter, Berlin, 36-49.
- Prusiner, S.B., Cochran, S.P., Groth, D.F., Downey, D.E., Bowman, K.A., Martinez, H.M. (1982a). Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Annals of Neurology*, 11, 353-358.
- Prusiner, S.B., Bolton, D.C., Groth, D.F., Bowman, K.A., Cochran, S.P., McKinley, M.P. (1982b). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry*, 21, 6942-6950.

- 
- Prusiner, S.B., Cochran, S.P., Alpers, M.P. (1985). Transmission of scrapie in hamsters. *Journal of Infectious Diseases*, 152, 971-978.
- Prusiner, S.B., Groth, D., Serban, A., Stahl, N., Gabizon, R. (1993). Attempts to restore scrapie prion infectivity after exposure to protein denaturants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90, 2793-2797.
- Prusiner, S.B., Groth, D.F., Cochran, S.P., Masiarz, F.R., McKinley, M.P., Martinez, H.M. (1980). Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry*, 19, 4883-4891.
- Prusiner, S.B., Groth, D.F., McKinley, M.P., Cochran, S.P., Bowman, K.A., Kasper, K.C. (1981). Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78, 4606-4610.
- Prusiner, S.B., McKinley, M.P., Bowman, K.A., Bolton, D.C., Bendhim, P.E., Groth, D.F., Glenner, G.G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, 35, 349-358.
- Prusiner, S.B., Scott, M., Foster, D., Pan, K.M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S.L., Serban, D., Carlson, G.A. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, 63, 673-686.
- Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J., Cohen, F.E. (1998). Prion protein biology. *Cell*, 93, 337-48.
- Ptitsyn, O.B. The molten globule state. In „*Protein Folding*“ Creighton, T.E. (ed.) New York; Freeman, 1992, 243-300.
- Race, R.E., Fadness, L.H., Chesebro, B. (1987). Characterization of scrapie infection in mouse neuroblastoma cells. *Journal of General Virology*, 68, 1391-1399.
- Raso, J., Barbosas-Canovas, G.V. (2003). Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 265-285.
- Reed, L.J., Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, 27, 493-497.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature*, 382, 180-182.
- Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, H., Groth, D., Baldwin, M.A., Prusiner, S.B. (1996). Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high  $\alpha$ -helical content and lacking scrapie infectivity. *Journal of Virology*, 70, 1714-1722.

- Rohwer, R.G. (1984a). Virus like sensitivity of the scrapie agent to heat inactivation. *Science*, 223, 600-602.
- Rohwer, R.G. (1984b). Scrapie infectious agent is virus-like in size and susceptibility to inactivation. *Nature*, 308, 658-662.
- Royer, C.A. (2005). Insights into the role of hydration in protein structure and stability obtained through hydrostatic pressure studies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 1167-1173.
- Royer, C.A. (1995). Application of pressure to biochemical equilibria: the other thermodynamic variable. *Methods in Enzymology*, 259, 357-377.
- Royer, C.A. (2002). A discussion of the physical basis of pressure unfolding of proteins. *Progress in Biotechnology*, 19, 17-26.
- Rubenstein, R., Carp, R.I., Callahan, S.M. (1984). *In vitro* replication of scrapie agent in a neuronal model: infection of PC12 cells. *Journal of General Virology*, 65, 2191-2198.
- Rudd, P.M., Endo, T., Colominas, C., Groth, D., Wheeler, S.F., Harvey, D.J., Wormald, M.R., Serban, H., Prusiner, S.B., Kobata, A., Dwek, R.A. (1999). Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 13044-13049.
- Safar, J., Roller, P.P., Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J. Jr. (1993b). Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity. *Protein Science*, 2, 2206-2216.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nature Medicine*, 4, 1157-1165.
- Safar, J., Roller, P.R., Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J. Jr. (1993a). Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *Journal of Biological Chemistry*, 268, 20276-20284.
- Schätzl, H.M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. (1995). Prion protein gene variation among primates. *Journal of Molecular Biology*, 245, 362-374.
- Schmerr, M.J., Goodwin, K.R., Cutlip, R.C. (1994). Capillary electrophoresis of the scrapie prion protein from sheep brain. *Journal of Chromatography*, 680, 447-453.
- Schreuder, B.E. (1994). Animal spongiform encephalopathies – an update. Part 1. Scrapie and lesser known animal spongiform encephalopathies. *Veterinary Research*, 16, 174-181.

- Schröter, W., Lautenschläger, K.-H., Bibrack, H. (1998). Prinzip des kleinsten Zwanges, in *Taschenbuch der Chemie*. Harri Deutsch: Thun, Frankfurt/Main: p. 278.
- Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S.J. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*, 59, 847-857.
- Selvaggini, C., De Gioia, L., Cantu, L., Ghibaudi, E., Diomede, L., Passerini, F., Forloni, G., Bugiani, O., Tagliavini, F., Salmona, M. (1993). Molecular characteristics of a protease-resistant, amyloidogenic and neurotoxic peptide homologous to residues 106-126 of the prion protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 194, 1380-1386.
- Shaked, G.M., Fridlander, G., Meiner, Z., Taraboulos, A., Gabizon, R. (1999). Protease-resistant and detergent-insoluble prion protein is not necessarily associated with prion infectivity. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 17981-17986.
- Sigurdsson, B., Rida, A. (1954). A Chronic Encephalitis of Sheep. *British Veterinary Journal*, 110, 341-354.
- Silva, J.L., Weber, G. (1993). Pressure stability of Proteins. *Annual Review of Physical Chemistry*, 44, 89-113.
- Soto, C., Castilla, J. (2004). The controversial protein-only hypothesis of prion propagation. *Nature Medicine*, 10, 63-67.
- Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L., Prusiner, S.B. (1993). Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*, 32, 1991-2002.
- Stöckel, J., Safar, J., Wallace, A.C., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. (1998). Prion protein selectively binds copper(II) ions. *Biochemistry*, 37, 7185-7193.
- Suzuki, K. (1960). *Review of Physical Chemistry of Japan*, 29, 91
- Tauscher, B. (1995). Pasteurization of food by hydrostatic high-pressure – chemical aspects. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und –forschung*, 200, 3-13.
- Taylor, D.M. (1991). Impaired thermal inactivation of ME7 scrapie agent in the presence of carbon. *Veterinary Microbiology*, 27, 403-405.
- Taylor, D.M., McConnell, I., Fernie, K. (1996a). The effect of dry heat on the ME7 strain of mouse-passaged scrapie agent. *Journal of General Virology*, 77, 3161-3164.
- Taylor, D.M. (1996b). Creutzfeld-Jakob disease. *Lancet*, 347, 1333.

- 
- Taylor, D.M. (1999a). Inactivation of prions by physical and chemical means. *Journal of Hospital Infection*, 43 Suppl., 69-76.
- Taylor, D.M. (1999b). Transmissible degenerative encephalopathies. Inactivation of the causal agents. In *Principles and Practice of Disinfection Preservation and Sterilisation*. Russel, A.D., Hugo, W.B. Ayliffe, G.A.J. (eds), Blackwell Scientific, Oxford, 222-236.
- Taylor, D.M., Fraser, H., McConnell, I., Brown, D.A., Lamza, K.A., Smith, G.R.A. (1994). Decontamination studies with the agents of Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie. *Archives of Virology*, 139, 313-326.
- Taylor, D.M., Woodgate, S.L., Atkinson, M.,J. (1995). Inactivation of the bovine spongiform encephalopathy agent by rendering procedures. *Veterinary Record*, 137, 605-610.
- Taylor, D.M., Fernie, K., McConnell, I., Steele, P.J. (1998). Observations on thermostable subpopulations of the unconventional agents that cause transmissible degenerative encephalopathies. *Veterinary Microbiology*, 64, 33-38.
- Taylor, D.M. (2001). Resistance of Transmissible Spongiform Encephalopathy Agents to Decontamination. In *Prions. A Challenge for Science, Medicine and Public Health System*, vol 7, eds. Rabenau H.F., Cinatl J, Doerr H.W., Contribution Microbiology, Basel, pp 58-67.
- Telling, G.C., Haga, T., Torchia, M., Tremblay, P. DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. (1996). Interactions between wild-type and mutant prion proteins modulate neurodegeneration in transgenic mice. *Genes & Development*, 10, 1736-1750.
- Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell*, 83, 79-90.
- Torrent, J, Alvarez Martinez, M.T., Heitz, F., Liautard, J.-P., Balny, C., Lange, R. (2003). Alternative prion structural changes revealed by high pressure. *Biochemistry*, 42, 1318-1325.
- Turk, E., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *European Journal of Biochemistry*, 176, 21-30.
- Van Eldik, R., Asano, T., Le Noble, W.J. (1989). Activation and reaction volume in solution. *Chemical Reviews*, 89, 549-688.
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S.J., Smart, E.J., Anderson, R.G., Taraboulos, A., Prusiner, S.B. (1996). Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93, 14945-14949.

- Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E., Dyson, H.J. (1999). Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 2042-2047.
- Wadsworth, J.D., Joiner, S., Hill, A.F., Campbell, T.A., Desbruslais, M., Luthert, P.J., Collinge, J. (2001). Tissue distribution of protease resistant prion protein in variant Creutzfeld-Jakob disease using a highly sensitive immunoblotting assay. *Lancet*, 358, 171-180.
- Waggoner, D.J., Drisaldi, B., Bartnikas, T.B., Casareno, R.L., Prohaska, J.R., Gitlin, J.D., Harris, D.A. (2000). Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 7455-7458.
- Weber, G. Phenomenological description of the association of protein subunits subjected to conformational drift. Effect of dilution and hydrostatic pressure. *Journal of Physical Chemistry*, 97, 7108-7115
- Weissmann, C. (2004). The state of the prion. *Nature Reviews*, 2, 861-871.
- Weissmann, C., Bueler, H., Fischer, M., Sauer, A., Aguet, M. (1994). Susceptibility to scrapie in mice is dependent on PrP<sup>C</sup>. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 343, 431-433.
- Weissmann, C., Enari, M., Klohn, P.C., Rossi, D., Flechsig, E. (2002). Transmission of prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 16378-16383.
- Westaway, D., DeArmond, S.J., Cayetano-Canlas, J., Groth, D., Foster, D., Yang, S.L., Torchia, M., Carlson, G.A., Prusiner, S.B. (1994). Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell*, 76, 117-129.
- Wells, G.A., McGill, I.S. (1992). Recently described scrapie-like encephalopathies of animals. *Research in Veterinary Science*, 53, 1-10.
- Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunnig, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vetinary Record*, 121, 419-420.
- Wilesmith, J.W., Wells, G.A. (1991). Bovine spongiform encephalopathy. *Current Topics of Microbiology and Immunology*, 121, 21-38.
- Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., Smith, P.G. (1996). A new variant of Creutzfeld-Jakob disease in the UK. *Lancet*, 6, 921-925.

- 
- Wille, H., Michelitsch, M.D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F.E., Agard, D.A., Prusiner, S.B. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 3563-3568.
- Wilson, D.R., Anderson, R.D. , Smith W. (1950). Studies in scrapie. *Journal of Comparative Pathology*, 60, 267-282.
- Zhou, J.-M., Zhu, L., Balny, C., Perrett, S. (2001). Pressure denaturation of the yeast prion protein Ure2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 287, 147-152.
- Zigas, V., Gajdusek, D.C. (1957). Kuru: Clinical Study of a new Syndrome Resembling Paralysis Agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. *Medical Journal of Australia*, II, 745-754.

---

## 9 Anhang

### 9.1 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

#### Tabellen

Tabelle 2.1: Übersicht über die Wirkung von Druck auf intra- und intermolekulare Wechselwirkungen.

Tabelle 2.2: Übersicht über die Wirkung von Druck auf die Proteinstruktur (nach Balny 2004).

Tabelle 2.3: Prion-Krankheiten (nach Prusiner 1998).

Tabelle 2.4: Eigenschaften der unterschiedlichen PrP-Isoformen.

Tabelle 2.5: Wirkung chemischer Desinfektionsmittel auf Proteine und auf PrP<sup>Sc</sup>.

Tabelle 5.1: Inkubationszeiten und Infektiositätstiter von druckbehandeltem Hamster-PrP<sup>Sc</sup>.

Tabelle 5.2: Inkubationszeiten und Infektiositätstiter von druckbehandeltem Hamster-PrP<sup>Sc</sup> vor und nach PK-Verdau.

Tabelle 5.3: Inkubationszeiten und Infektiositätstiter von druckbehandeltem Maus-PrP<sup>Sc</sup>.

Tabelle 5.4: Inkubationszeiten und Infektiositätstiter von druckbehandeltem PrP27-30.

Tabelle 6.1: Inaktivierung des Hamster-Scrapie-Stammes 263K.

**Abbildungen**

- Abbildung 2.1: Druckaufbaumethoden (nach Ludwig 2000).
- Abbildung 2.2: Phasendiagramm von Eis.
- Abbildung 2.3: pT-Phasendiagramm von Proteinen (nach Suzuki 1960, Hawley 1971).
- Abbildung 2.4: Modelle zur Konversion von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> (nach Weissmann 2002).
- Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Primärstruktur von PrP<sup>C</sup>.
- Abbildung 2.6: Elektronenmikroskopische Darstellung der Prionrods (Prusiner 1998).
- Abbildung 2.7: NMR-Strukturanalyse des rekombinanten Hamster-Prion-Proteins (recSHaPrP 90-231, James et al. 1997).
- Abbildung 2.8: 3D-Strukturmodelle von PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 2.9: Inaktivierungskurve von PrP<sup>Sc</sup> (ME7-Stamm) im trockenen Zustand bei 160 °C (Taylor et al. 1996a).
- Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Aufreinigung von PrP<sup>27-30</sup>.
- Abbildung 4.2: Hochdruckapparatur U101 (Polish Academy of Sciences).
- Abbildung 4.3: Western-Blot von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 5.1: Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von Hamster-PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 5.2: Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz verschiedener Hamster-PrP<sup>Sc</sup>-Pools.
- Abbildung 5.3: Inkubationszeiten von druckbehandeltem Hamster PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 5.4: Immunologischer Nachweis von PrP<sup>Sc</sup> in Scrapie-Gehirnen.
- Abbildung 5.5: Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von Maus-PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 5.6: Einfluss von Hochdruck auf die PK-Resistenz von PrP<sup>Sc</sup> und PrP<sup>27-30</sup>.
- Abbildung 5.7: Schematische Darstellung der Vorgehensweise bei der Hochdruckbehandlung isolierter Prion-Proteine.
- Abbildung 5.8: PrP<sup>27-30</sup>-Isolation nach Druckbehandlung.
- Abbildung 5.9: Elektronenmikroskopischer Nachweis der Prionrods.
- Abbildung 5.10: Hochdruckbehandlung von iPrP<sup>27-30</sup>.
- Abbildung 5.11: Hochdruckbehandlung von PrP<sup>Sc</sup> nach Ultrazentrifugation.
- Abbildung 5.12: Temperatur- und Zeitabhängigkeit der druckinduzierten PK-Sensitivität von PrP<sup>Sc</sup>.

- 
- Abbildung 5.13: Einfluss der Temperatur und Druckhaltezeit auf die Druckinaktivierung von PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 5.14: Temperatur- und Zeitabhängigkeit der PrP<sup>Sc</sup>-Druckinaktivierung.
- Abbildung 5.15: Einfluss der Druckhaltezeit auf die PK-Resistenz von PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 5.16: Einfluss von Druckimpulse auf die PK-Resistenz von PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 5.17: Einfluss von Druckimpulse auf die Inaktivierung von PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 5.18: Einfluss des Puffermediums auf das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 5.19: Einfluss des pH-Wertes auf das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 5.20: Einfluss von schwach saurem pH-Wert auf das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 5.21: Einfluss der Ionenstärke auf das Druckverhalten von PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 5.22: Einfluss der Homogenisierung infektiöser Gehirne auf die PK-Resistenz von gedrücktem PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 5.23: Einfluss der Homogenisierung von infektiösen Gehirnen auf die Druckinaktivierung von PrP<sup>Sc</sup>.
- Abbildung 6.1: Druckverhalten unterschiedlicher Prion-Protein-Isoformen in wässriger Lösung.

## 9.2 Glossar

263K	Hamster-adaptierter Scrapie-Stamm (→)
A2G-Mäuse	Transgene Mäuse, die ein mutiertes SMN-Gen besitzen (das SMN-Protein ist der Auslöser der Spinalen Muskelatrophie).
BRVR-Mäuse	bacteria-resistant, virus-resistant (engl.); Mäuse die resistent gegenüber Salmonellen und Enzephalitis-Viren sind.
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie, schwammartige Hirndegeneration der Rinder, wird im Volksmund auch „Rinderwahnsinn“ genannt.
CWD	Chronic Wasting Disease (engl.), chronisch zehrende Krankheit der Hirsche.
fCJD	Familiäre CJD, ist auf eine Vererbung zurückzuführen.
FFI	Fatal Familiar Insomnia (engl.), tödliche familiäre Schlaflosigkeit, ist auf eine Vererbung zurückzuführen.
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie, schwammartige Hirndegeneration der Katzen.
FSI	Fatal Sporadic Insomnia (engl.), tödliche sporadische Schlaflosigkeit.
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom, ist auf eine Vererbung zurückzuführen.
iCJD	iatrogen bedingte CJD, durch einen „medizinischen Unfall“ übertragen.
ID <sub>50</sub> u/g	Infektiositätsdosis, gibt an, wieviel Einheiten pro Gramm (u/g) des infektiösen Agens nötig sind, um 50 % der Versuchstiere zu infizieren.
iPrP27-30	mittels Detergensextraktion und Ultrazentrifugation aufgereinigtes (isoliertes) PrP27-30 (→); Hauptkomponente der Prionrods (→). <b>hier:</b> isoliertes und in wässriger Lösung resuspendiertes PrP27-30.
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis, siehe ID <sub>50</sub> ; Da TSEs (→) stets tödlich verlaufenden kann die Infektiosität als ID <sub>50</sub> - und LD <sub>50</sub> -Wert angegeben werden.
ME7	Maus-adaptierter Scrapie-Stamm (→)

nvCJD	new variant Creutzfeld Jakob Disease (engl.), höchstwahrscheinlich durch BSE (→) verursacht.
PK	Proteinase K, sehr aggressives Eiweiß-spaltendes Enzym.
Prionrods	In Form amyloider Fibrillen vorliegende Aggregate PrP <sup>27-30</sup> (→), die nur bei der Aufreinigung unter gleichzeitiger Anwendung von Detergens-Extraktion und Proteinase K-Verdau entstehen.
PrP	Prion-Protein
PrP-(106-126)	Synthetisches Peptid, homolog zu den Aminosäureresten 106-126 des menschlichen PrP (→). Besitz neurotoxisches Potential und bildet <i>in vitro</i> amyloide Fibrillen.
PrP <sup>27-30</sup>	Infektiöser und Proteinase-resistenter Kern des PrP (→), Folgeprodukt von PrP <sup>Sc</sup> nach Abspaltung des N-Terminus (ca. 69 AS) durch PK (→), Reduktion des Molekulargewichts von 33-35 kDa auf 27-30 kDa, wobei die Infektion voll erhalten bleibt. Bei Einwirkung von PK und Detergentien bildet PrP <sup>27-30</sup> amyloide Strukturen aus (→ Prionrods). <b>hier:</b> Proteinase K-verdautes Gehirnhomogenat, das PrP <sup>27-30</sup> enthält.
PrP <sup>33-35</sup>	Synonym für PrP (Molekulargewicht von 33-35 kDa)
PrP <sup>BSE</sup>	Prion-Protein-BSE, pathogenes Prion-Protein der BSE (→).
PrP <sup>C</sup>	Prion-Protein-Cellular (engl.), zelluläre (normale), apathogene Isoform des PrP (→).
PrP <sup>res</sup>	Proteinase K-resistenter Teil von PrP <sup>Sc</sup> , Synonym für PrP <sup>27-30</sup> (→).
PrP <sup>Sc</sup>	Prion-Protein-Scrapie, pathogene (fehlgefaltete) Isoform des Prion-Proteins. Hauptbestandteil der Infektiosität und Auslöser von Prion-Krankheiten (TSE). Als Superfix wird unabhängig von Spezies und Krankheit meist „Sc“ verwendet, neuerdings auch PrP <sup>TSE</sup> (→). <b>hier:</b> native infektiöse Prionen (PrP <sup>Sc</sup> ) in Gehirnhomogenat (10 % w/v).
PrP <sup>TSE</sup>	infektiöses Prion-Protein, Auslöser der TSE (→); Synonym für PrP <sup>Sc</sup> (→)
recPrP	rekombinantes Prion-Protein
recSHaPrP 90-231	rekombinantes Prion-Protein des syrischen Goldhamsters mit den Aminosäureresten 90-231.

---

RML6	Maus-adaptierter Scrapie-Stamm (→)
SAF	<i>engl.</i> : scrapie-associated fibrils, nach der Aufarbeitung von Gehirnen von mit Scrapie infizierten Tieren gefundene Aggregate, die ähnlich wie die Prionrods fibrilläre Strukturen aufzeigen.
sCJD	sporadisch auftretende CJD, genaue Ursache unbekannt.
Scrapie-Stämme	Prion-Varianten, die unterschiedliche Krankheitsphänotypen hervorrufen. Sie unterscheiden sich in klinische Symptome, Histopathologie, Topologie der PrP <sup>Sc</sup> -Akkumulation und in der Form des glykosylierten und deglykosylierten PrP <sup>Sc</sup> im Western-Blot.
TME	Transmissible Mink Encephalopathy ( <i>engl.</i> ), übertragbare Hirndegeneration der Nerze.
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien, übertragbare schwammartige Hirndegenerationskrankheit, Synonym für Prion-Krankheiten.
Ure2	Hefe-Prion-Protein
vCJD	siehe nvCJD
wt-Mäuse	Wildtyp-Mäuse, gentechnisch nicht veränderte Mäuse.

### 9.3 Liste der verwendeten Chemikalien

<b>Bezeichnung:</b>	<b>Lieferant/Bezugsquelle:</b>
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung 37,5:1 (40 %)	Fluka (Buchs, Schweiz)
Ammoniumperoxidisulfat	Merck (Darmstadt)
Anti-Maus-Antikörper-Peroxidase-Konjugat	Calbiochem (Darmstadt)
Anti-Prion-Protein-Antikörper, Klon 3F4	Signet (Dedham, MA, USA)
Bromphenolblau	Fluka (Buchs, Schweiz)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Capronsäure	Merck (Darmstadt)
p-Cumarsäure	Merck (Darmstadt)
Diethylether	Merck (Darmstadt)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Aldrich (St.Louis, MO, USA)
ECL-Molekulargewichtsmarker	Amersham (Little Chalfont, UK)
Entwicklerlösung, Roentoroll	Tetenal (Norderstedt)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Fixierlösung, Superfix	Tetenal (Norderstedt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Hydrauliköl, Viskosität 32 (Nuto H 32)	Esso (Hamburg)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kalium-Dihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Luminol	Merck (Darmstadt)
Magermilchpulver	Merck (Darmstadt)

---

Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natrium-Dihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck (Darmstadt)
N-Lauroylsarcosin Natriumsalz	Merck (Darmstadt)
Petroleumether (Siedebereich 80-100 °C)	Merck (Darmstadt)
Prestained-Molekulargewichtsmarker	Peqlab (Erlangen)
Proteinase K	Sigma (St.Louis, MO, USA)
Rinderserumalbumin (BSA)	Merck (Darmstadt)
Salzsäure, 32 %ig	Merck (Darmstadt)
Sodium-Dodecylsulfat (SDS)	Merck (Darmstadt)
Streptavidin, Peroxidase gekoppelt	Amersham (Little Chalfont, UK)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt)
Triton-X100	Merck (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid, 30 %ig	Fluka (Buchs, Schweiz)
Phosphorwolframsäure Kaliumsalz	Aldrich (St.Louis, MO, USA)

Der POM1-Antikörper (Anti-Maus-Prion-Protein-Antikörper) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Lothar Stitz, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Institut für Immunologie, Tübingen zur Verfügung gestellt.

## 9.4 Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung:</b>	<b>Hersteller:</b>
Autoklav, LA-MCS-204	Sanoclav (Bad Überkingen)
Autoradiographiefilm, Hyperfilm™ ECL™	Amersham (Little Chalfont, UK)
Belichtungskassette	Dr.Goos-Suprema (Heidelberg)
Biofreezer, 86C	Forma (Philadelphia, PA, USA)
Digitalwaage, BP 221 S	Sartorius (Göttingen)
Digitalwaage, HL-200	A&D (Oxford, UK)
Druckmessgerät, MU101	Polish Acadademy of Science (Warschau, Polen)
Elektrophoresekammer	Peqlab (Erlangen)
Formvar®-Kohle-Kupfernetzchen	Plano (Wetzlar)
Gelgießkammer	Peqlab (Erlangen)
Heizplatte, RCT basic	IKA (Staufen)
Hochdruckapparatur, Hydraulic Press U101	Polish Acadademy of Science (Warschau, Polen)
Hochdruck-Dichtungsringe, LV 30/16	Polish Acadademy of Science (Warschau, Polen)
Homogenisierungs-System , FP 120	Qbiogene (Irvine, CA, USA)
Homogenisierungs-Tubes, Lysing Matrix D	Qbiogene (Irvine, CA, USA)
Mikrozentrifugentubes (1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Mini-Rocker, MR-1	Peqlab (Erlangen)
Netzgerät, Modell 1000/500	Biorad (München)
O-Ringe, 12+2	Polish Acadademy of Science (Warschau, Polen)

---

pH-Messgerät, pH 211	Hanna (Woonsocket, RI, USA)
Pipettenspitzen	Neolab (Heidelberg)
Polycarbonatgefäße, Polyallomer	Beckman (Fullerton, CA, USA)
Polyethylen-Einschweißfolie	Wiberg (Salzburg, Österreich)
Polyethylen-Gefäße, 0,25 ml	Biozym (Hessisch Oldendorf)
Probenschüttler, Reax Control	Heidolph (Schwabach)
PVDF-Membran	Biorad (München)
Rotor, TLA 100.3	Beckman (Fullerton, CA, USA)
Semidry-Blot-Apparatur	Peqlab (Erlangen)
Sterilbank, UVF 6.18 S	BDK (Sonnenbühl)
Teflonband	Bauhaus (Mannheim)
Teflonbehälter für Hochdruckapparatur U101	Polish Acadademy of Science (Warschau, Polen)
Thermomixer, Comfort	Eppendorf (Hamburg)
Thermostat, Polystat	Huber, Pfaffenhofen
Transmissions-Elektronenmikroskop, 910	Zeiss (Oberkochen)
Ultrazentrifuge, TL-100	Beckman (Fullerton, CA, USA)
Wasseraufreinigungssystem, Milli-Q	Millipore (Billerica, MA, USA)
Whattmann-Filterpapiere	Amersham (Little Chalfont, UK)
Zentrifuge, 5403	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge, 5415C	Eppendorf (Hamburg)

## 9.5 Verwendete Lösungen und Puffer

### Aufarbeitung des infektiösen Materials:

PBS (10 x), pH 7,4	1,4 M NaCl 27 mM KCl 65 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 15 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Acetat-Puffer, pH 5,6	0,1 M Essigsäure 0,1 M Natriumacetat
Detergenzlösung A	10 % N-Lauroylsarcosin Natriumsalz pH 7,4 mit 1 M Natrium-Dihydrogenphosphat einstellen
Detergenzlösung B	10 % NaCl 1 % N-Lauroylsarcosin Natriumsalz pH 7,2 mit 1 M Natrium-Dihydrogenphosphat einstellen
Proteinase K-Lösung	10 µg/ ml Proteinase K in Tris-Puffer, pH 7,0

### Hochdruckbehandlung:

Druckmedium	70 % Petroleumether, Siedebereich 80-100 °C 30 % Hydrauliköl, Viskosität 32
-------------	--

**Probenvorbereitung:**

Proteinase K-Lösung                      Stammlösung: 20 mg/ml in 20 mM Tris-Puffer, pH 7,0

Gebrauchslsg. für Hirnextrakte (1:25): 0,8 mg/ml

Gebrauchslsg. für isol. Material (1:100): 0,2 mg/ml

PK-Puffer                                      20 mM Tris-Puffer, pH 7,8

1 % SDS

2 mM CaCl<sub>2</sub>

**Elektrophorese und Western-Blot:**

Elektrophoresepuffer (4 x)              100 mM Tris

0,8 M Glycin

Elektrophoresepuffer (1 x)              0,25 x Elektrophoresepuffer (4 x)

0,1 % SDS

Sammelgelpuffer:                          1 M Tris, pH 6,8

Trenngelpuffer:                              1 M Tris, pH 8,8

Ladepuffer                                      1,0 ml Glycerin

0,5 ml Mercaptoethanol

3,0 ml SDS (10 %ig)

1,25 ml Sammelgelpuffer

0,5 ml Bromphenolblau (ges. in 0,1 % EtOH)

---

Kathodenpuffer	25 mM Tris 40 mM Capronsäure 20 % Methanol
Anodenpuffer-1	0,3 M Tris 20 % Methanol
Anodenpuffer-2	25 mM Tris 20 % Methanol
<b>Antikörperinkubation:</b>	
PBS-T	0,1 % Triton-X100 in PBS (1 x)
Blockierlösung	5 % Magermilchpulver 5 % Rinderserum-Albumin in PBS-T
1. Antikörperlösung	3 µl Anti-PrP-Antikörper 3F4 (1:5000, ca. 200 µl Antikörperlösung / cm <sup>2</sup> Membran) in 15 ml Blockierlösung
2. Antikörperlösung	4 µl Peroxidase Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:3000) 8 µl Streptavidin-Peroxidase (1:1500) in 12 ml PBS-T



## Publikationsliste

### Publikationen in Fachzeitschriften:

**Heindl P.**, Fernandez Garcia A., Butz P., Pfaff E. & Tauscher B. (2005): Protein conformation determines the sensibility to high pressure treatment of infectious scrapie prions. *Biochimica et Biophysica Acta*, zur Publikation akzeptiert.

**Heindl P.**, Fernandez Garcia A., Büttner M., Voigt H., Butz P., Tauscher B. & Pfaff E. (2005): Some physico-chemical parameters influencing the proteinase K resistance and infectivity of PrP<sup>Sc</sup> after high pressure treatments. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 1223-1231.

Fernandez Garcia A., **Heindl P.**, Voigt H., Büttner M., Butz P., Tauber N., Tauscher B. & Pfaff E. (2005): A dual nature of the infectious prion protein revealed by high pressure. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 9842-9847.

Fernandez Garcia A., **Heindl P.**, Voigt H., Büttner M., Wienhold D., Butz P., Stärke J., Tauscher B. & Pfaff E. (2004): Reduced proteinase K resistance and infectivity of prions after pressure treatment at 60 °C. *Journal of General Virology*, 85, 261-264.

### **Vorträge auf Fachtagungen:**

International conference on Trends in High Pressure Protein Sciences, 1.-3.09.2005,  
Montpellier, Frankreich

*Effects of high pressure on the infectivity and proteinase K resistance of the hamster prion protein PrP<sup>Sc</sup>.*

20<sup>th</sup> AIRAPT and 43<sup>rd</sup> EHPRG International Conference on Science and Technology  
of High Pressure, 27.06.-1.07.2005, Karlsruhe

*High pressure effects on the infectious prion protein.*

4. Nationaler Kongress der deutschen TSE-Forschungsplattform, 28.-29.10.2004,  
Düsseldorf

*Inaktivierung infektiöser Prionen mittels Hochdruck.*

3<sup>rd</sup> International Conference on High Pressure Bioscience and Biotechnology  
(HBBB), 26.-30.09.2004, Rio de Janeiro, Brasilien

*High pressure effects on the infectious prion protein.*

### **Posterbeiträge auf Fachtagungen:**

1<sup>st</sup> International Prion Conference, 8.-10.10.2003, München

*High pressure as a tool for investigating prion proteins.*

4. Nationaler Kongress der deutschen TSE-Forschungsplattform, 28.-29.10.2004,  
Düsseldorf

*Stabilität von isoliertem PrP27-30 nach einer Hochdruckbehandlung.*

# Lebenslauf

von Philipp Heindl

**geboren:** 30. Dezember 1975 in Ulm

## Schulbildung:

1982 – 1986 Sonnenbühl-Grundschule Lonsee  
1986 – 1992 Bühl-Realschule Dornstadt  
1992 – 1995 Ernährungswissenschaftliches Gymnasium  
Valckenburgschule Ulm

## Zivildienst:

1995 – 1996 Zivildienst beim ASB Ulm in der Abteilung der individuellen Schwerstbehindertenbetreuung

## Studium:

Oktober 1996 – März 1997 Studium der Lebensmittelchemie an der Fachhochschule NTA Isny

April 1997 – Juli 2002 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe

Juli 2002 Wissenschaftliche Abschlussarbeit am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Karlsruhe:  
*Einfluss von Selenverbindungen auf DNA-Reparaturproteine mit Zinkfingerstruktur.*

seit Oktober 2002 Promotion am Institut für Chemie und Biologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel, Standort Karlsruhe:  
*Einfluss einer Hochdruckbehandlung auf die Stabilität und Infektiosität von Prion-Proteinen.*