

Untersuchungen antioxidativer Eigenschaften des zellulären Prionproteins (PrP^c) und Auftreten oxidativen Stresses während der Prion Infektion anhand verschiedener transgener Mauslinien sowie einer Scrapie-Zeitverlaufsstudie

Von dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biochem. Inga Böll
geboren am 10. Februar 1974 in Essen

Referent: Prof. Dr. W. H. Müller

Korreferent: Prof. Dr. K. Resch

Tag der Promotion: 11.12.2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1999 bis Juni 2000 am Institut für Neuropathologie der Georg-August-Universität Göttingen und von Juli 2000 bis Oktober 2001 am Institut für Neuropathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. H.A. Kretschmar durchgeführt.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Andere als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen habe ich nicht benutzt. Diese Arbeit wurde so oder in ähnlicher Form weder als Diplomarbeit verwendet noch bei einer anderen Institution eingereicht.

München, im Oktober 2001

Inga Böll

Abstract

Prionkrankheiten sind neurodegenerative, tödlich verlaufende Erkrankungen, welche durch apoptotische Nervenzellverluste gekennzeichnet sind und sowohl bei Menschen (Creutzfeldt-Jakob) als auch bei Tieren (BSE) auftreten können. Die neurotoxischen Effekte könnten darin verankert sein, daß durch die PrP^{Sc}-induzierte Konformationsumwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} funktionsfähiges PrP^C verlorengelht. Des Weiteren ist es möglich, daß die Akkumulation des PrP^{Sc} direkt neurotoxische Wirkung hat oder durch die Umwandlung eine neue Funktion des Prionproteins aktiviert wird, welche mittelbar neurotoxisch ist. Diese beiden Aspekte werden als 'gain of function'- und 'loss of function'-Hypothese bezeichnet.

Das zelluläre Prionprotein (PrP^C) bindet Kupfer und besitzt eine potentielle antioxidative Eigenschaft, welche einen Schutzmechanismus vor oxidativen Schäden im Hirngewebe darstellen kann. Trifft es also zu, daß während der Prion Infektion funktionsfähiges, potentiell antioxidativ wirksames PrP^C durch die Konformationsumwandlung verloren geht, so ist im Sinne der 'loss of function'-Hypothese vermehrtes Auftreten oxidativen Stresses möglich. Des Weiteren konnte im Sinne der 'gain of function'-Hypothese ein neurotoxischer Effekt von PrP^{Sc} nachgewiesen werden und es wurde gezeigt, daß PrP^{Sc} Mikroglia aktiviert, welche vermehrt oxidativ wirksame Superoxid-Radikale freisetzen. Somit ist auch im Sinne der 'gain of function'-Hypothese das Auftreten vermehrten oxidativen Stresses während der Prion Infektion denkbar.

Oxidativer Stress wird durch freie Radikale bzw. reaktive Sauerstoffspezies, welche während der normalen zellulären Aktivität in der Atmungskette entstehen oder durch phagozytierende Zellen (Makrophagen, Mikroglia) gebildet werden, induziert. Die freien Radikale greifen biologische Verbindungen (Proteine, Lipide, DNA) oxidativ an und beeinträchtigen somit deren physiologische Funktion. Um diese Prozesse unter Kontrolle zu halten, besitzt die Zelle antioxidativ wirksame Enzyme (Superoxid Dismutase, Glutathion Peroxidase) sowie enzymatische Hilfsmechanismen (Glutathion Reduktase) und nicht enzymatische Antioxidantien (Glutathion, Vitamin C, Vitamin E). Zur Analyse antioxidativer Mechanismen des zellulären Prionproteins wurden verschiedene transgene Mauslinien mit unterschiedlich trunkiertem Prionprotein sowie PrP-defiziente und PrP-überexprimierende Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen untersucht. Das Auftreten vermehrten oxidativen Stresses während der Prion Infektion wurde in einer Scrapie-Zeitverlaufsstudie überprüft.

Um einen Überblick über den antioxidativen Status der Tiere zu erlangen, wurden die Aktivitäten der Superoxid Dismutase, der Glutathion Peroxidase sowie der Glutathion Reduktase überprüft und der Gehalt an nicht enzymatischen Antioxidantien (Glutathion, Vitamin C, Vitamin E) gemessen. Direkte oxidative Schäden wurden anhand der Messungen des Ausmaßes an Lipid Peroxidation, der Fettsäurezusammensetzung sowie des Gehalts an Protein Oxidation detektiert.

In den transgenen Tieren wurden keine signifikanten Unterschiede im oxidativen Status gefunden, so daß Hinweise auf eine antioxidative Funktion des zellulären Prionproteins nicht bestätigt werden konnten. Die Ergebnisse der Scrapie-Zeitverlaufsstudie weisen auf vermehrten oxidativen Stress während des Alterns hin. Des Weiteren wurden vermehrte oxidative Schäden (Lipid Peroxidation) während der Prion Infektion gemessen, welche die 'gain of function'-Hypothese unterstützen und weitere Hinweise für die PrP^{Sc}-vermittelte Neurotoxizität liefern.

Schlagworte: Prionprotein, Scrapie-Pathogenese, oxidativer Stress

Abstract

Prion diseases are fatal neurodegenerative disorders in humans (Creutzfeldt-Jakob) and animals (BSE). All of these disorders are characterized by the accumulation of an abnormally folded isoform of the cellular prion protein (PrP^{Sc}).

Neurotoxic effects can possibly be mediated by the accumulation of PrP^{Sc} or by a new yet unknown neurotoxic function of PrP^{Sc}. Furthermore it is conceivable that functioning cellular PrP^c is lost during conversion and neurotoxic effects follow.

These aspects are called 'gain of function'- and 'loss of function'- hypothesis.

Cellular prion protein binds copper and may have superoxide dismutase activity so that PrP^c might have protective function against oxidative stress. According to the 'loss of function'- hypothesis the loss of functioning, possibly antioxidative PrP^c during the conformational change can entail oxidative stress during prion infection.

Neurotoxic effects of PrP^{Sc} have been detected in neuronal cell culture and it is known that PrP^{Sc} activates microglia which release free superoxide radicals. As free radicals cause oxidative stress, an increase in oxidative damage during prion infection corresponding the 'gain of function'-hypothesis might be possible.

Free radicals arise during normal cellular activity or are produced from activated microglia and macrophages. Proteins, DNA and lipids can be attacked by reactive oxygen species which impair their biological function. To protect the cell against oxidative damage, antioxidative enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase) and non-enzymatic antioxidants (glutathione, α -Tocopherol and Ascorbate) are established.

To analyse the potential antioxidative effects of cellular prion protein, transgenic mice with different deleted forms of cellular prion protein were examined as well as PrP-knockout and PrP-overexpressing mice in comparison with wildtype animals. The existence of oxidative stress during prion infection was determined in scrapie-infected mice in different intervals (30, 60, 90, 120 and 150 days) after infection as well as in control mice.

To elucidate oxidative stress in animals, different antioxidative parameters (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione, Vitamine E and Vitamine C) and direct oxidative damage (lipid peroxidation, protein oxidation and the composition of fatty acids) were tested.

There are no hints for an antioxidative function of cellular prion protein in transgenic mice while in different time intervals after infection and in control mice, an increase of oxidative stress during ageing is detectable.

Additional oxidative damage during prion infection can be found in the levels of lipid peroxidation which can be advice for the 'gain of function'-hypothesis and for the mechanisms of PrP^{Sc} -mediated neurotoxicity.

Key words: Prion protein, Scrapie-Pathogenesis, oxidative stress

Inhaltsverzeichnis

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG.....</u>	<u>10</u>
1.1	ÜBERTRAGBARE SPONGIFORME ENCEPHALOPATHIEN (TSE).....	10
1.2	DIE PRIONHYPOTHESE	11
1.2.1	UNTERSUCHUNG DES INFEKTIOSEN AGENS	11
1.2.2	DIE PRIONHYPOTHESE.....	11
1.2.3	ZELLULÄRES PRIONPROTEIN (PRP ^C) UND PRP ^{Sc}	11
1.2.4	ZELLBIOLOGIE DES PRIONPROTEINS	12
1.2.5	PHYSIOLOGISCHE SPALTSTELLEN DES PRIONPROTEINS	13
1.2.6	KUPFERBINDUNG DES PRIONPROTEINS	13
1.2.7	DAS PRIONPROTEIN UND DIE SUPEROXID DISMUTASE.....	14
1.3	PRP-STRUKTURUMWANDLUNG.....	14
1.3.1	MODELLE ZUR STRUKTURUMWANDLUNG	15
1.4	UNTERSCHIEDLICHE ERREGERSTÄMME.....	16
1.5	OXIDATIVER STRESS UND ANTIOXIDATIVE MECHANISMEN	17
1.5.1	NICHT-ENZYMATISCHE ANTIOXIDANTIEN	18
1.5.1.1	Glutathion	18
1.5.2	ENZYMATISCHE ANTIOXIDANTIEN.....	18
1.5.2.1	Superoxid Dismutase (SOD).....	18
1.5.2.2	Katalase	19
1.5.2.3	Glutathion Peroxidase (GPx).....	19
1.5.3	ENZYMATISCHE HILFSMECHANISMEN	19
1.5.3.1	Glutathion Reduktase	19
1.5.4	OXIDATIVE SCHÄDEN	20
1.5.4.1	DNA-Schäden.....	20
1.5.4.2	Lipid Peroxide.....	20
1.5.4.3	Protein Oxidation	21
1.5.5	GLUTAMIN SYNTHETASE	22
1.6	PATHOGENESE DES NERVENZELLUNTERGANGS BEI PRIONKRANKHEITEN.....	23
<u>2</u>	<u>ZIELSETZUNG.....</u>	<u>25</u>
<u>3</u>	<u>MATERIAL</u>	<u>27</u>
3.1	GERÄTE.....	27
3.2	SONSTIGE MATERIALIEN.....	28
3.3	ENZYME	28
3.4	ANTIKÖRPER	28
3.4.1	PRIMÄRANTIKÖRPER	28
3.4.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	29
3.5	KITS.....	29
3.6	ZUSÄTZE/ MEDIEN	29
3.7	LÄNGENSTANDARDS FÜR WESTERN BLOT	29
3.8	CHEMIKALIEN	30
3.9	VERWENDETE PUFFER UND LÖSUNGEN	32
3.10	TRANSGENE TIERE.....	35
3.11	INFIZIERTE TIERE	36
3.12	VERWENDETE ZELLINIEN	36

4	<u>METHODEN.....</u>	<u>37</u>
4.1	HERSTELLUNG KUPFERFREIER LÖSUNGEN	37
4.2	HERSTELLUNG DER HIRNHOMOGENATE	37
4.3	PROTEINBESTIMMUNG MIT DEM BCA-ASSAY KIT NACH SIGMA	38
4.4	PROTEINASE-K VERDAU	38
4.5	IMMUNPRÄZIPITATION	38
4.6	WESTERN BLOT	39
4.6.1	PROBENVORBEREITUNG	39
4.6.2	SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE.....	39
4.6.3	WESTERN- BLOT (SEMI-DRY).....	39
4.6.4	IMMUNFÄRBUNG MIT CDP-STAR (TROPIC)	40
4.6.5	FÄRBUNG MIT NBT/BCIP	40
4.7	SOD-ASSAY NACH OBERLEY UND SPITZ	40
4.8	SOD-ASSAY MITTELS R&D SOD-KIT	41
4.9	PROTEINFÄLLUNG MIT 10 % TRICHOLORESSIGSÄURE.....	42
4.10	GLUTATHION.....	42
4.10.1	GESAMT GLUTATHION	42
4.10.2	OXIDIERTES GLUTATHION	42
4.11	GLUTATHION REDUKTASE ASSAY	43
4.12	GLUTATHION PEROXIDASE ASSAY KIT	43
4.13	LIPID PEROXIDATION	44
4.14	PROTEIN OXIDATION	44
4.15	GLUTAMIN SYNTHETASE	45
4.16	ZELLKULTUR.....	45
4.16.1	PASSAGIEREN VON N2A-ZELLEN	45
4.16.2	BEHANDLUNG VON N2A-ZELLEN MIT WASSERSTOFFPEROXID.....	46
4.16.3	MTT-ASSAY	46
4.16.4	HERSTELLUNG VON LYSATEN AUS ZELLKULTUR	46
4.17	VERWENDETE STATISTISCHE METHODEN	46
4.18	VERWENDETE METHODEN DES BIOCHEMISCHEN STOFFWECHSELLABORS, HAMBURG	47
4.18.1	ASCORBAT	47
4.18.2	ALPHA-TOCOPHEROL	47
4.18.3	FETTSÄUREN.....	48
5	<u>ERGEBNISSE.....</u>	<u>49</u>
5.1	ETABLIERUNG UND ÜBERPRÜFUNG DER VERWENDETEN METHODEN.....	49
5.1.1	METHODENÜBERPRÜFUNG DURCH MESSUNG UNTERSCHIEDLICHER PROTEINMENGEN ...	49
5.1.1.1	Superoxid Dismutase- Assay nach Oberley und Spitz	49
5.1.1.1.1	Der Cyanid-Effekt	49
5.1.1.1.2	Behebung des Cyanid-Effekts	50
5.1.1.1.3	weitere Verfahren zur Trennung von SOD-1 und Mn-SOD	51
5.1.1.1.3.1	SOD-Kit von R&D.....	51
5.1.1.1.3.2	Immunpräzipitation	52
5.1.1.1.4	Verwendete Methode zur SOD-Messung	53
5.1.1.1.5	Sensitivität des SOD-Assays	53
5.1.1.2	Glutathion	54
5.1.1.2.1	Gesamt Glutathion	54
5.1.1.2.2	Oxidiertes Glutathion.....	55
5.1.1.3	Glutathion Reduktase	55
5.1.1.4	Glutathion Peroxidase.....	56
5.1.1.5	Lipid Peroxidation.....	57
5.1.1.6	Protein Oxidation	57
5.1.1.7	Glutamin Synthetase	57

5.1.2	METHODENÜBERPRÜFUNG DURCH MESSUNGEN IN N2A-ZELLEN	58
5.1.2.1	MTT-Assay.....	59
5.1.2.2	SOD-Assay	59
5.1.2.3	Glutathion	60
5.1.2.4	Glutathion Reduktase	61
5.1.2.5	Glutathion Peroxidase.....	61
5.1.2.6	Lipid Peroxidation.....	62
5.1.2.7	Protein Oxidation	62
5.1.2.8	Glutamin Synthetase	63
5.2	ZELLULÄRES PRIONPROTEIN (PrP ^C) UND ANTIOXIDATIVE MECHANISMEN.....	64
5.2.1	ÜBERPRÜFUNG DER ENTHALTENEN TRANSGENE	64
5.2.2	UNTERSUCHUNGEN AN WILDTYP-, PrP ^{0/0} -, C4- UND TG35- TIEREN.....	65
5.2.2.1	SOD-Assay	66
5.2.2.2	Glutathion, Glutathion Reduktase und Glutathion Peroxidase.....	67
5.2.2.3	Lipid Peroxidation / Protein Oxidation.....	68
5.2.2.4	Glutamin Synthetase	69
5.2.3	UNTERSUCHUNGEN AN E 57- UND F 35- TIEREN	70
5.2.3.1	SOD-Assay	70
5.2.3.2	Glutathion-Stoffwechsel.....	70
5.2.3.3	Lipid Peroxidation und Protein Oxidation	72
5.2.3.4	Glutamin Synthetase	73
5.2.4	MESSUNGEN IM UNIVERSITÄTSKRANKENHAUS HAMBURG EPPENDORF	74
5.2.4.1	Hydrophile Antioxidantien: Ascorbat (Vitamin C).....	74
5.2.4.2	Lipophile Antioxidantien: α -Tocopherol (Vitamin E)	75
5.2.4.3	Fettsäuregehalt	75
5.3	OXIDATIVER STRESS UND SCRAPIE-PATHOGENESE.....	77
5.3.1	WESTERN BLOT- UNTERSUCHUNG AUF PROTEINASE K-RESISTENTES PRP	77
5.3.2	SOD-ASSAY	78
5.3.3	GLUTATHION / GLUTATHION REDUKTASE / GLUTATHION PEROXIDASE.....	80
5.3.4	LIPID PEROXIDATION / PROTEIN OXIDATION.....	82
5.3.5	GLUTAMIN SYNTHETASE	83
6	<u>DISKUSSION.....</u>	84
6.1	ETABLIERUNG UND SENSITIVITÄTSÜBERPRÜFUNG DER VERWENDETEN METHODEN.....	84
6.1.1	DER SUPEROXID DISMUTASE-ASSAY (SOD-ASSAY).....	84
6.1.2	DER GLUTATHION-HAUSHALT	86
6.1.3	OXIDATIVE SCHÄDEN	86
6.1.4	GLUTAMIN SYNTHETASE.....	86
6.1.5	MESSUNGEN IN N2A-ZELLEN	87
6.2	UNTERSUCHUNGEN AN TRANSGENEN TIEREN	88
6.3	UNTERSUCHUNGEN DER SCRAPIE-INFEKTION IM ZEITVERLAUF.....	91
7	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	93
8	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	95
9	<u>LITERATUR.....</u>	97

10	<u>ANHANG: ZAHLENWERTE DER GEMESSENEN PARAMETER</u>	109
10.1	METHODENÜBERPRÜFUNG DURCH MESSUNG UNTERSCHIEDLICHER PROTEINMENGEN ..	109
10.2	ZAHLENWERTE DER VERSCHIEDENEN EICHGERADEN.....	110
10.3	ZAHLENWERTE DER GEMESSENEN PARAMETER IN N2A-ZELLEN.....	111
10.4	ZAHLENWERTE DER GEMESSENEN PARAMETER IN TRANSGENEN TIEREN	111
10.5	ZAHLENWERTE DER GEMESSENEN PARAMETER IN E 57- UND F 35- TIEREN	112
10.6	ZAHLENWERTE DER GEMESSENEN PARAMETER IN HAMBURG.....	113
10.7	WERTE DER GEMESSENEN PARAMETER IN EINER SCRAPIE-ZEITVERLAUFSSTUDIE	115

1 Einleitung

1.1 Übertragbare spongiforme Encephalopathien (TSE)

Übertragbare spongiforme Encephalopathien (TSE) sind neurodegenerative, tödlich verlaufende Erkrankungen, welche durch apoptotische Nervenzellverluste (Giese et al. 1995), Astrogliose und Proteinablagerungen gekennzeichnet sind, jedoch keine Anzeichen auf eine immunologische Antwort zeigen (Prusiner 1993, 1998). Neben der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (erstmalig um 1920 von Creutzfeldt und 1921 von Jakob beschrieben), dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und der tödlichen familiären Schlaflosigkeit (‘Fatal Familial Insomnia’, FFI) zählt auch Kuru, eine durch rituellen Kannibalismus übertragene infektiöse Erkrankung, welche im Hochland Papua-Neuguineas auftritt, zu den übertragbaren spongiformen Encephalopathien des Menschen. Zudem sind auch spongiforme Encephalopathien bei Tieren bekannt. Die Schafkrankheit Scrapie wurde als erste Krankheit dieser Gruppe um 1730 beschrieben. Weitere Prionkrankheiten sind BSE (Bovine Spongiforme Encephalopathie) beim Rind, FSE (Feline Spongiforme Encephalopathie) bei Katzen und TME (transmissible mink encephalopathy) bei Nerzen.

Die transmissiblen spongiformen Encephalopathien bei Menschen werden in sporadische, hereditäre (genetisch bedingte) und erworbene eingeteilt. Da die Kuru-Krankheit durch rituellen Kannibalismus übertragen wird, zählt diese Erkrankung zu den erworbenen spongiformen Encephalopathien. Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) und die tödliche familiäre Schlaflosigkeit (FFI) sind erbliche (hereditäre) Krankheiten (Kretzschmar et al. 1991). Als sporadische Erkrankung bezeichnet man hingegen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit.

Die Übertragbarkeit von Scrapie konnte 1936 von Cuillé und Chelle nachgewiesen werden, aber auch in weiteren Tierarten konnten übertragbare spongiforme Encephalopathien nach experimenteller Infektion beobachtet werden (Prusiner et al. 1993, Prusiner et al. 1998). 1966 wurde die Kuru-Krankheit auf Schimpansen übertragen (Gajdusek et al. 1966). Dies war ein Hinweis auf die infektiöse Natur der Krankheit und die erste Übertragung einer Prionerkrankung des Menschen auf Versuchstiere. Seitdem ist es weiterhin gelungen, sporadische, erworbene und genetisch bedingte Prionerkrankungen experimentell auf Versuchstiere zu übertragen (Gibbs et al. 1968, Tateishi et al. 1995).

1996 wurde erstmalig eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (nvCJD) diagnostiziert (Will et al. 1996), bei der das Durchschnittsalter der Patienten (ca. 30 Jahre) deutlich unter dem der sporadischen CJD-Patienten lag. Ebenfalls zeigt die neue Variante konstante klinische Charakteristika, welche sich von der bisher beschriebenen CJD unterscheiden (Will et al. 2000, Andrews et al. 2000). Aufgrund verschiedener experimenteller Untersuchungen muß davon ausgegangen werden, daß die nvCJD durch BSE (vermutlich durch den Verzehr kontaminierter Lebensmittel) verursacht wird (Will et al. 1996, Bruce et al. 1997). Bisher wurden bereits über 100 Fälle der neuen Variante in England, drei in Frankreich und einer in Irland diagnostiziert (Stand August 2001).

1.2 Die Prionhypothese

1.2.1 Untersuchung des infektiösen Agens

Bei der Untersuchung des Erregers konnte festgestellt werden, daß das Agens nur eine geringe Größe besaß und sehr unempfindlich gegen Hitze, UV-Bestrahlung und Chemikalien wie Formaldehyd war (Alper 1966, Brown et al. 1982, Prusiner 1982), durchaus aber durch Reagenzien, welche Proteine denaturieren (z.B. Kochen in SDS), zerstört werden konnte (Taylor et al. 1994). Aufgrund der ungewöhnlich langen Inkubationszeiten und der geringen Größe des Erregers wurden diese Erkrankungen auch als 'slow virus diseases' bezeichnet (Sigurdarson 1954). Da aber keine entsprechende Nukleinsäure isoliert werden konnte (Riesner et al. 1993), wurde vermutet, daß es sich um einen neuen bisher unbekanntem Erregertypus handeln könne (Alper et al. 1967). Nach Aufreinigung des infektiösen Agens konnte ein Protein isoliert werden, welches als Prionprotein bezeichnet wurde (Prusiner et al. 1983, Oesch et al. 1985).

1.2.2 Die Prionhypothese

Bereits 1967 formulierte Griffith ein theoretisches Konzept, wie ein Protein als infektiöses und vermehrungsfähiges Agens fungieren könnte (Griffith 1967). Die Prionhypothese (Prusiner 1982) geht davon aus, daß das Protein in einer zellulären (PrP^c) und in einer infektiösen Form (PrP^{Sc}) vorkommt (Prusiner et al. 1998), wobei sich beide in ihrer Konformation unterscheiden (Pan et al. 1993). Durch Wechselwirkung beider Konformationstypen kann die zelluläre in die infektiöse Form umgewandelt werden, so daß eine Vermehrung des infektiösen Agens ohne direkte Beteiligung von Nukleinsäuren möglich ist (Prusiner et al. 1998). Ebenfalls ist eine spontane Krankheitsentstehung durch zufällige Fehlfaltung des Prionproteins möglich. Weiterhin wird vermutet, daß Mutationen in hereditären Prionerkrankungen die Konformationsänderung des zellulären Prionproteins zur pathogenen Form fördern (Prusiner et al. 1993, Prusiner et al. 1998). Aufgrund dieser Theorie führte Prusiner den Begriff Prion ('proteinaceous infectious particle') ein (Prusiner 1982). Seither werden transmissible spongiforme Enzephalopathien auch als Prionkrankheiten bezeichnet. Gestützt wird die Prionhypothese durch die Untersuchung von PrP knockout-Tieren. Mäuse, die kein Prionprotein exprimieren, sind resistent gegen Infektion mit dem Erreger (Büeler et al. 1993). Zur Krankheitsübertragung muß das infektiöse Agens also mit wirtseigenem Prionprotein wechselwirken (Weissmann 1991, Moore et al. 1998).

1.2.3 Zelluläres Prionprotein (PrP^c) und PrP^{Sc}

Das zelluläre Prionprotein (PrP^c) ist ein körpereigenes (Oesch 1985, Chesebro et al. 1985), hochkonserviertes Protein, welches in Säugern, aber auch bei Vögeln vorkommt (Basler et al. 1986, Schätzl et al. 1995, Harris et al. 1991). Das reife Protein ist beim Menschen 208 Aminosäuren lang, über einen GPI-Anker an die äußere Plasmamembran gebunden (Stahl et al. 1987, Baldwin et al. 1990) und an zwei Asparagin-Resten N-glykosyliert (Endo et al. 1989). Im C-terminalen Bereich befinden sich zwei Cystein-Reste, welche eine Disulfidbrücke bilden (Prusiner 1993). Im N-terminalen Bereich des Proteins befindet sich eine Region aus fünf sich wiederholenden Sequenzen, welche

auch als 'Repeat-Region' bezeichnet wird und als kupferbindende Region fungiert (Hornshaw et al. 1995, Brown et al. 1997a). Weiterhin ist das zelluläre Prionprotein durch drei α -helikale und einen kurzen β -Faltblatt-Bereich gekennzeichnet (Riek et al. 1996). Bei der Umfaltung des zellulären Prionproteins findet eine Konformationsumwandlung von α -Helix zu β -Faltblatt statt (Pan et al. 1993), welche mit einer erhöhten Resistenz gegen Proteinase K (Oesch et al. 1985) und der Bildung unlöslicher Aggregate einhergeht (Prusiner et al. 1983). Wird zelluläres Prionprotein mit Proteinase K verdaut, so wird das 33-35 kDa schwere Protein vollständig abgebaut, wohingegen von der pathogenen Form nach Verdau ein resistentes Fragment übrigbleibt, das glykosyliert ca. 27-30 kDa groß ist (Oesch 1985).

1.2.4 Zellbiologie des Prionproteins

Die Synthese des zellulären Prionproteins erfolgt auf dem für sekretorische Proteine üblichen Weg über das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat. Nach den posttranslationalen Modifikationen des Proteins im ER und im Golgi (Glykosylierung und Anhängen des GPI-Ankers) erfolgt die Ausschleusung des Proteins aus der Zelle und die Verankerung mittels GPI-Anker in der Plasmamembran (Lehmann et al. 1999). Dennoch verbleibt das Prionprotein nicht ständig an der Zelloberfläche, sondern unterliegt einem dynamischen Prozess, in dem das Protein zyklisch endocytiert und wieder ausgeschleust wird (Taraboulos et al. 1992). Hinweise auf diesen Prozess gaben Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, daß eine posttranslational proteolytische Spaltung des PrP intrazellulär stattfindet (Shyng et al. 1993) und PrP über Clathrin Coated Pits endocytiert wird (Shyng et al. 1994).

Das Signal zur Internalisierung über Clathrin Coated Pits erfolgt über ein Tyrosin-vermitteltes Signal in der cytoplasmatischen Domäne der entsprechenden zu internalisierenden Rezeptoren (z.B. Transferrin) (Towbridge et al. 1993). Da Proteine mit GPI-Anker aber keine cytoplasmatische Domäne besitzen und somit nicht mit der Clathrinschicht interagieren können, wird ein transmembraner Rezeptor für PrP postuliert, welcher wahrscheinlich über eine extrazelluläre, mit PrP interagierende und eine intrazelluläre, über Clathrin Endocytose vermittelnde Domäne verfügt. Ebenfalls ist es möglich, daß weitere Proteine in einer Art Reaktionskaskade zwischengeschaltet sind (Harris et al. 1996). Elektronenmikroskopische Untersuchungen mit N-terminal deletiertem PrP ergaben, daß die deletierte Form in wesentlich geringerer Konzentration in den Clathrin Coated Pits vorhanden ist, als Wildtyp-PrP. Somit wird vermutet, daß der N-Terminus bei der Interaktion mit dem postulierten Rezeptor eine wichtige Rolle spielt (Shyng et al. 1995).

Normalerweise werden GPI-Proteine über Caveolae endocytiert (Anderson et al. 1993). In neuronalen Zellen wird aber kein Caveolin, welches ein essentieller Bestandteil der Caveolae darstellt, exprimiert (Rothberg et al. 1992). Dennoch kann PrP in großen Caveolae-ähnlichen, Detergenz-resistenten Komplexen u.a. mit Cholesterol und Signalmolekülen wie G-Proteinen und Tyrosin-Kinasen in Sucrose-Gradienten isoliert werden (Harris et al. 1996, Chang et al. 1994), welche auch als 'microdomains' bezeichnet werden (Harris 2001). Da diese Komplexe einige Moleküle der Signaltransduktion enthalten und Tyrosin-Kinase Aktivität aufweisen, ist es möglich, daß das Prionprotein in die Signaltransduktion neuronaler Zellen involviert ist (Harris et al. 1996).

1.2.5 Physiologische Spaltstellen des Prionproteins

Das zelluläre Prionprotein besitzt zwei physiologische Spaltstellen. Eine Spaltstelle des PrP befindet sich innerhalb des GPI-Ankers und löst somit das PrP von der Zellmembran ab (Borchelt et al. 1993, Harris et al. 1993). Dieser Spaltvorgang findet vermutlich an der Zelloberfläche durch Phospholipasen statt (Low 1989). Im mittleren Teil des Prionproteins, vor einer hochkonservierten Abfolge aus 16 hydrophoben Aminosäuren (Harris 2001), befindet sich eine weitere physiologische Spaltstelle des Prionproteins (Pan et al. 1992, Harris et al. 1993). Inhibition der Spaltung durch Serin Protease Inhibitoren (Leupeptin) ließ Rückschlüsse ziehen, daß diese Spaltung in intrazellulären, sauren Kompartimenten stattfindet (Shyng et al. 1993). Die Spaltstelle liegt innerhalb eines Abschnitts, welcher als neurotoxische Domäne bezeichnet wird, da ein synthetisches Peptid aus den Aminosäuren dieser Region (PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶) in Zellkultur neurotoxische Effekte zeigt (Forloni et al. 1993, Brown et al. 1996) sowie innerhalb der Proteinase-K resistenten Region des infektiösen Prionproteins (PrP^{Sc}).

Es ist nicht vollständig geklärt, welche physiologische Bedeutung der zellulären Spaltung des Prionproteins zukommt. Es ist möglich, daß das lösliche N-terminale Fragment als biologisch aktiver Ligand fungiert (Harris et al. 1996). Einige Wachstumsfaktoren, welche als Polypeptide vorliegen, stammen von proteolytisch gespaltenen, membrangebundenen Proteinen ab (Massagué 1990). Weiterhin ist es möglich, daß der Spaltung des Proteins regulatorische Funktion zukommt. Es kann aber auch sein, daß die Spaltung den ersten Schritt der zellulären Abbaureaktion des PrP darstellt.

1.2.6 Kupferbindung des Prionproteins

Das Prionprotein besitzt in der N-terminalen Repeat-Region eine kupferbindende Domäne (Brown et al. 1997a). Weitere Untersuchungen in PrP knockout-Mäusen zeigen eine Verschiebung im Kupfergehalt des Gehirns (Brown et al. 1997a, Herms et al. 1999) und eine reduzierte Aktivität der Kupfer-abhängigen Cu/Zn- Superoxid Dismutase (SOD-1) (Brown et al. 1997b), so daß zunächst vermutet wurde, das Prionprotein könne als 'Shuttle-System' für Kupfer-Ionen zur Regulation der intrazellulären Kupfer-Konzentration dienen und damit die Aktivität intrazellulärer kupferabhängiger Enzyme (z.B. Cu/Zn-SOD) beeinflussen (Brown et al. 1997a, Pauly und Harris 1998). Die N-terminale Kupferbindung konnte durch mehrere Arbeitsgruppen gezeigt werden (Kramer et al. 2001, Whittal et al. 2000, Hornshaw et al. 1995).

Weitere Studien gaben Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Aktivität der Cu/Zn-SOD und vorhandener Kupfer-Konzentration (Prohaska 1983).

Die Ergebnisse elektrophysiologischer Untersuchungen lassen auf eine kupferabhängige, präsynaptische Funktion des PrP schließen (Herms et al. 1999). Somit ist auch möglich, daß dem zellulären Prionprotein eine Rolle bei der normalen synaptischen Funktion zukommt (Herms et al. 2000, Collinge et al. 1994).

1.2.7 Das Prionprotein und die Superoxid Dismutase

Expressionsanalysen der SOD-1 und Mn-SOD auf mRNA- und Protein-Ebene (Northern und Western Blot-Analysen) in Wildtyp- und PrP-knockout-Tieren ergaben keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Expression der SOD-1, so daß der reduzierten SOD-1 Aktivität in PrP-knockout-Mäusen posttranslationale Veränderungen im Kupfermetabolismus zugrundeliegen könnten. Des Weiteren konnte in knockout-Tieren eine erhöhte mRNA-Expression der Mn-SOD festgestellt werden, so daß hier eine Kompensation aufgrund der verringerten Aktivität der SOD-1 vorliegen könnte. Diese Daten sprechen dafür, daß ein Zusammenhang zwischen PrP-Expression, der Kupferhomöostase und damit mit der Aktivität der Superoxid Dismutase und einhergehenden antioxidativen Mechanismen besteht (Brown und Besinger 1998).

Untersuchungen rekombinanten Prionproteins sowie Immunpräzipitationsstudien des Prionproteins aus Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren gaben Hinweise auf eine PrP-eigene SOD-Aktivität (Brown et al. 1999), so daß antioxidative Eigenschaften des zellulären Prionproteins möglich sind (Brown 2001).

Weitere Daten geben jedoch Rätsel auf. Transgene Mäuse (C4-Tiere), denen ein großer Teil des N-Terminus und somit der kupferbindenden Domäne deletiert wurde (Weissmann et al. 1998, Shmerling et al. 1998), zeigen keine Krankheitserscheinungen. Verkürzt man jedoch das Prionprotein um weitere Aminosäuren (AS 32 bis 121, E57-Tiere bzw. AS 32 bis 134, F35-Tiere), so weisen diese Tiere hohen Gewichtsverlust und Ataxie auf (Shmerling et al. 1998).

Ob dieser Effekt mit der Deletion der kupferbindenden Domäne und damit mit der potentiellen antioxidativen Eigenschaft des Prionproteins zusammenhängt oder eine bisher unbekannte physiologische Funktion des Prionproteins die Ursache für das Krankheitsbild ist, ist zur Zeit ungeklärt.

Ebenso zeigen die Ergebnisse von Klamt und Waggoner, welche die Verschiebung des Kupfergehalts im Gehirn PrP-defizienter Mäuse nicht bestätigen konnten (Klamt et al. 2001 und Waggoner et al. 2000), daß weitere Untersuchungen in Bezug auf die Funktion des PrP im Zusammenhang mit dem Kupfermetabolismus sinnvoll sind (Harris 2001).

1.3 PrP-Strukturumwandlung

Der Infektionsweg durch externes PrP^{Sc} ist noch nicht vollständig geklärt, aber in Versuchen, in denen das extrazelluläre Prionprotein durch Zugabe von Proteasen auf der Oberfläche Prion-infizierter Neuroblastoma Zellen entfernt wurde, konnte eine Verringerung des intrazellulären PrP^{Sc}- Gehalts festgestellt werden (Caughey und Raymond 1991, Borchelt et al. 1992). Somit ist das Vorhandensein von PrP^C an der Zelloberfläche für die Bildung von PrP^{Sc} notwendig. Externes PrP^{Sc} wird wahrscheinlich nach Interaktion mit PrP^C auf der Zelloberfläche endocytiert (Harris 2001). Die Konformationsumwandlung findet dann vermutlich in Endosomen und Lysosomen statt (Taraboulos et al. 1990 und 1995). Nach der Genenerierung von PrP^{Sc} liegt es in intrazellulären Organellen (evtl. Endosomen und Lysosomen) vor, kann aber auch in anderen Zellkompartimenten gefunden werden (Harris 2001).

Die Krankheitsentstehung in familiären Prionkrankheiten erfolgt vermutlich durch schrittweise Veränderung der biochemischen Eigenschaften des PrP^C, bis die Umwandlung zu PrP^{Sc} erfolgt. Die erste detektierbare Veränderung ist die Resistenz gegen Phospholipase C (PIPLC), welche im ER einhergehend mit ersten Konformationsänderungen generiert wird. Später entwickeln sich die Protease-Resistenz gegen Proteinase K und die Unlöslichkeit in Detergenzien in den 'microdomains' an der Plasmamembran oder in endocytotischen Kompartimenten (Harris 2001).

1.3.1 Modelle zur Strukturumwandlung

Zu dem Mechanismus der Konformationsumwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} existieren zwei unterschiedliche Modelle. In dem 'Heterodimer'-Modell von Prusiner (1998) bindet ein PrP^{Sc}-Monomer ein PrP^C-Monomer unter Bildung eines Heterodimers, welches die Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} unter Bildung eines Homodimers katalysiert. Das Dimer spaltet sich zu zwei PrP^{Sc}-Monomeren und der Vorgang beginnt erneut. Grundlage dieses Modells ist, daß PrP^{Sc} thermodynamisch stabiler ist als PrP^C, ein bereits vorhandenes, autokatalytisch entstandenes PrP-Template die Umwandlung katalysiert und das PrP^{Sc}-Homodimer zur Dissoziation in Monomere neigt.

In dem 'Nucleation'-Modell von Lansbury Jr. und Caughey (1995) ist die Oligomerisation und Polymerisation des PrP zur Stabilisierung des PrP^{Sc} und seiner Akkumulation in biologisch relevanten Maßstäben notwendig. Voraussetzung dieses Modells ist, daß die spontane, nicht unbedingt autokatalytische Formation von 'Nuclei' oder 'seeds' gering ist, da monovalente Interaktionen von PrP^C schwach sind. Wenn allerdings die ersten polymeren 'seeds' vorliegen, so werden sie durch viele Interaktionen stabilisiert.

Der prinzipielle Unterschied beider Modelle besteht in dem unterschiedlich vorausgesetzten Gleichgewichtszustand zwischen PrP^C und PrP^{Sc}. Dennoch bestehen Überlappungen, da in beiden Modellen Autokatalyse die Ursache für die Konformationsänderung sein kann (Caughey et al. 2001). Beide Modelle werden anhand theoretischer Überlegungen der kinetischen Konsequenzen für möglich gehalten (Eigen 1996).

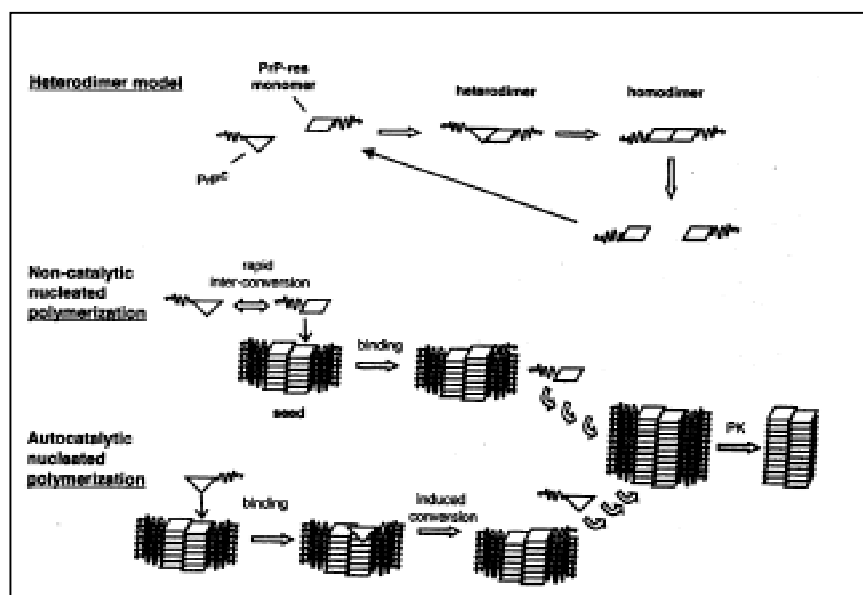


Abbildung 1: Theoretische Modelle zur PrP-Strukturumwandlung (Caughey et al. 2001)

1.4 Unterschiedliche Erregerstämme

Ein Phänomen, welches lange Zeit schwer mit der Prionhypothese zu vereinbaren war, ist das Auftreten verschiedener Erregerstämme (Fraser 1993, Parchi et al. 1999). 1961 wurde erstmals von Pattison und Millson beschrieben, daß Scrapie bei Wiederkäuern unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen kann. Nach Inokulation eines Homogenats eines an Scrapie erkrankten Schafes zeigte ein Teil der Tiere nach 43 Monaten Inkubationszeit das 'drowsy'-Syndrom wohingegen ein weiterer Teil der Tiere das 'scratching'-Syndrom zeigte. Die weitere Passage der Infektiosität zeigte je nach verwendeter Probe jeweils die gleiche Symptomatik, so daß es sich um zwei unterschiedliche Erregerstämme handeln mußte.

Heute lassen sich in Maus-Inzuchtstämmen bis zu 20 verschiedene Scrapie-Isolate vermehren, welche sich an unterschiedlichen charakteristischen Symptomen identifizieren lassen, ihre spezifischen Eigenschaften aber über viele Passagen hinweg beibehalten (Bruce et al. 1991, DeArmond et al. 1993). Somit können verschiedene Erreger anhand der klinischen Symptomatik, Inkubationszeit, Übertragbarkeit, histopathologischen Läsionsprofile (Bruce et al. 1976, 1993, 1994, Fraser 1993), Inaktivierungsverhalten, PK-Resistenz und Glykosylierung unterschieden werden (Sommerville et al. 1997). Weiterhin ergeben sich Unterschiede der Erregerstämme aus der verschiedenen Größe des PK resistenten Fragments (Bessen and Marsh 1994). Der genetische Hintergrund des Wirtstieres kann die Eigenschaften eines Erregerstammes beeinflussen. Wie die Wechselwirkungen zwischen dem Genotyp der Empfängerart und den Eigenschaften des Erregers stattfinden und daraus Veränderungen des Erregers resultieren, ist noch nicht aufgeklärt.

1.5 Oxidativer Stress und antioxidative Mechanismen

In aeroben biologischen Systemen bringt die reaktive Eigenschaft des Sauerstoffs und seiner reaktionsfähigen Radikale, biologische Verbindungen oxidativ zu verändern und damit funktionell zu beeinträchtigen, die Problematik des oxidativen Stresses mit sich. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie das Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxylradikal (HO^{\cdot}) sowie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen während normaler zellulärer Aktivität in der Atmungskette (Freeman und Crapo 1982) und bei der Zerstörung von Bakterien oder Viren durch phagozytierende Zellen (Makrophagen, Mikroglia) (Colton und Gilbert 1987). Um die Konzentration der Radikale unter Kontrolle zu halten, besitzt die Zelle Antioxidantien (Ascorbat (Vitamin C), α -Tocopherol (Vitamin E) und β -Carotin) und antioxidative Enzyme (Superoxiddismutase, Glutathion Peroxidase und Katalase), welche freie Radikale wegfangen und somit unschädlich machen. Ist das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien gestört, spricht man von oxidativem Stress. Oxidative Zellschäden können sich äußern als DNA-Schäden, welche Störungen der Transkription und Replikation bewirken und zu Mutationen führen können. Peroxidation von Membranlipiden können die Zerstörung von Membranen zur Folge haben und die Oxidation von Proteinen kann die Funktion von Proteinen beeinträchtigen (Butterfield et al. 2001). Vermehrte freie Radikale und oxidativer Stress können beim Altern, Krebs und neurodegenerativen Krankheiten (z.B. Alzheimer) festgestellt werden (Butterfield und Stadtman 1997, Christen 2000, Markesbery 1999).

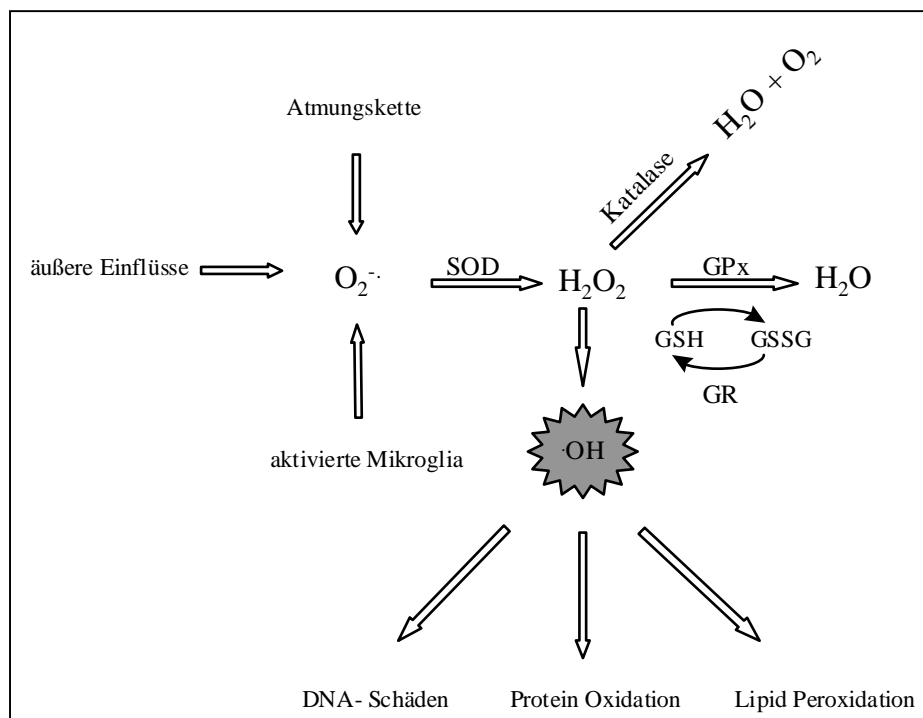


Abbildung 2: Oxidativer Stress und antioxidative Mechanismen. Superoxid-Radikale entstehen durch äußere Einflüsse, während der Atmungskette oder werden durch aktivierte Mikroglia freigesetzt. Durch Superoxid Dismutase wird das Superoxid zu Wasserstoffperoxid abgebaut, welches weiterhin durch Glutathion Peroxidase (GPx) und Katalase entgiftet wird. Bei der Reaktion der Glutathion Peroxidase wird reduziertes Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) umgesetzt. Verbrauchtes reduziertes Glutathion wird durch Glutathion Reduktase (GR) wieder regeneriert. Nicht umgesetztes Wasserstoffperoxid kann durch Wechselwirkung mit Fe^{2+} oder Cu^+ oder durch Reaktion mit Superoxid (Haber-Weiss-Reaktion, Fenton-Reaktion) zum Hydroxylradikal disproportionieren, welches oxidative Schäden wie DNA-Schäden, Protein Oxidation und Lipid Peroxidation verursachen kann.

1.5.1 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Antioxidantien sind Substanzen, die in niedrigen Konzentrationen die Oxidation eines Substrats verzögern oder hemmen. α -Tocopherol (Vitamin E) schützt Membranlipide vor Peroxidation (Sies 1993), β -Carotin unterbricht Radikalketten und Harnsäure dient als Radikalfänger, während Ascorbat (Vitamin C) verschiedene antioxidative Funktionen aufweist (Padh 1990).

1.5.1.1 Glutathion

Als weiteres nicht-enzymatisches Antioxidans hat Glutathion vielfältige Aufgaben: Glutathion ist ein Tripeptid aus Glutamat, Cystein und Glycin mit einer ungewöhnlichen γ -Amidbindung. Die Synthese des Glutathions erfolgt in der Zelle durch γ -Glutamyl-cystein Synthetase und Glutathion Synthetase unter Verbrauch zweier ATP. Der Abbau erfolgt zunächst an der Außenseite der Zellmembran durch γ -Glutamyl-Transpeptidase und schließlich wieder in der Zelle mittels γ -Glutamyl-Cyclotransferase und 5-Oxoprolinase. Durch diesen γ -Glutamyl-Zyklus wird über Synthese und Abbau des Glutathions der energiegetriebene Transport von Aminosäuren in die Zelle gewährleistet (Stryer 1994).

Glutathion nimmt an einer Reihe Entgiftungs-, Transport- und Stoffwechselprozessen teil. Es dient der Glutathion Peroxidase beim Abbau von Peroxiden als Substrat und ist am Transport von Aminosäuren im γ -Glutamyl-Zyklus beteiligt. Das Gleichgewicht zwischen oxidierter und reduzierter Form des Glutathions hält die Oxidationszustände der Sulfhydrylgruppen intrazellulärer Proteine aufrecht (Meister 1983).

1.5.2 Enzymatische Antioxidantien

1.5.2.1 Superoxid Dismutase (SOD)

Zum Schutz vor oxidativen Schäden baut die Superoxid Dismutase Superoxidradikale ab. Diese Radikale entstehen als Nebenprodukt während der oxidativen Phosphorylierung, z.B. bei der Reaktion der Cytochrom Oxidase. In eukaryotischen Zellen kommt die SOD in Form von SOD-1 (Cu / Zn- SOD) im Cytosol und als Mn-SOD in den Mitochondrien vor. SOD-1 ist ein Dimer aus identischen 16 kDa-Untereinheiten, während Mn-SOD Dimere oder Tetramere aus identischen 21 kDa-Untereinheiten bildet (Fridovich 1986).

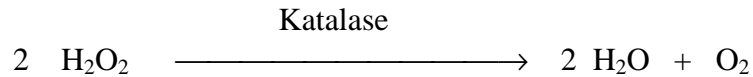
Im Katalyse-Mechanismus der SOD-1 sind ein Arginin- und ein Histidin-Rest beteiligt. Ein Kupfer- und ein Zink-Ion sind mit der Seitenkette des Histidinrests koordiniert. Während der Katalyse werden zwei Superoxid-Radikale gebunden und Wasserstoffperoxid sowie Sauerstoff freigesetzt (Tainer et al. 1983).



Das gebildete Wasserstoffperoxid wird anschließend durch Katalase oder Glutathion Peroxidase abgebaut.

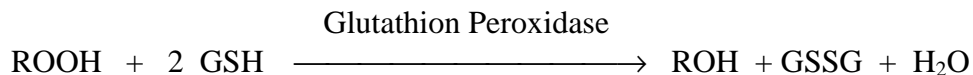
1.5.2.2 Katalase

Katalase ist ein tetrameres, Häm-haltiges Enzym, welches in Peroxisomen zu finden ist. Während der Synthese liegt Katalase zunächst als Monomer ohne Häm vor. Erst nach dem Transport in die Peroxisomen findet in Gegenwart von Häm eine Zusammenlagerung zu Tetrameren statt. Durch dieses Enzym erfolgt die Entgiftung von Wasserstoffperoxid und die Bildung von Wasser und Sauerstoff (Alberts 1994).



1.5.2.3 Glutathion Peroxidase (GPx)

Die Glutathion Peroxidase ist ein cytoplasmatisches Enzym aus vier identischen 22-23 kDa Untereinheiten. Jede Untereinheit enthält ein Selenocystein im aktiven Zentrum, welches direkt am Reaktionszyklus teilnimmt. Durch reduziertes Glutathion wird die reduzierte Form des Enzyms wieder hergestellt. Als Substrat dienen der Glutathion Peroxidase nicht nur Wasserstoffperoxid, sondern verschiedene organische Peroxide (Lipid Peroxide), so daß oxidative Schäden in der Zelle beseitigt werden. Die giftigen Peroxide werden zu den entsprechenden Alkoholen abgebaut (Epp et al. 1983, Cohen und Hochstein 1963).



1.5.3 Enzymatische Hilfsmechanismen

1.5.3.1 Glutathion Reduktase

Glutathion Reduktase ist ein Enzym aus zwei identischen 50 kDa Untereinheiten, welche über eine Disulfidbindung miteinander verknüpft sind. Sie katalysiert die NADPH+H⁺-abhängige Reduktion von oxidiertem Glutathion und dient damit der Regenerierung von Glutathion.



Während der Reaktion werden zunächst die Elektronen des NADPH+H⁺ auf die prosthetische Gruppe (FAD, Flavinadenindinukleotid), dann auf die Cystein-Reste des Enzyms und anschließend auf oxidiertes Glutathion übertragen (Douglas 1986, Karplus et al. 1987)

Weitere Hilfsmechanismen sind auch die DNA-Reparatur (Pflaum et al. 1997) und der Abbau oxidierter Proteine und Lipide.

1.5.4 Oxidative Schäden

1.5.4.1 DNA-Schäden

DNA-Schäden entstehen durch Reaktion mit Hydroxyl-Radikalen (Giulivi et al. 1995). Durch oxidative Modifikation der Desoxyribosen werden Thymidindimere oder 8-Hydroxydesoxyguanosin gebildet, was häufig zu Strangbrüchen führt. Oxidativer Abbau der verschiedenen Basen kann zu deren Zerstörung oder Modifikation und damit zu Fehlpaarungen führen.

1.5.4.2 Lipid Peroxide

Lipid Peroxide werden vorwiegend aus Membranlipiden mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren gebildet. Bei einer zwischen zwei Doppelbindungen gelegenen CH_2 -Gruppe kann es zur Abstraktion eines Wasserstoff-Radikals und somit zur Bildung eines Lipid-Radikals kommen. Durch Anlagerung von Sauerstoff ist es möglich, daß ein Peroxyl-Radikal entsteht, welches durch Aufnahme eines Wasserstoff-Radikals zum Lipid Peroxid reagiert. Das Lipid Peroxid kann dann mit weiteren Lipid-Molekülen reagieren, so daß in einer Kettenreaktion immer mehr Lipid Peroxide entstehen. Diese Radikalketten können durch nichtenzymatische Antioxidantien (Vitamin E) unterbrochen werden (Löffler 1997, Benzie 1996).

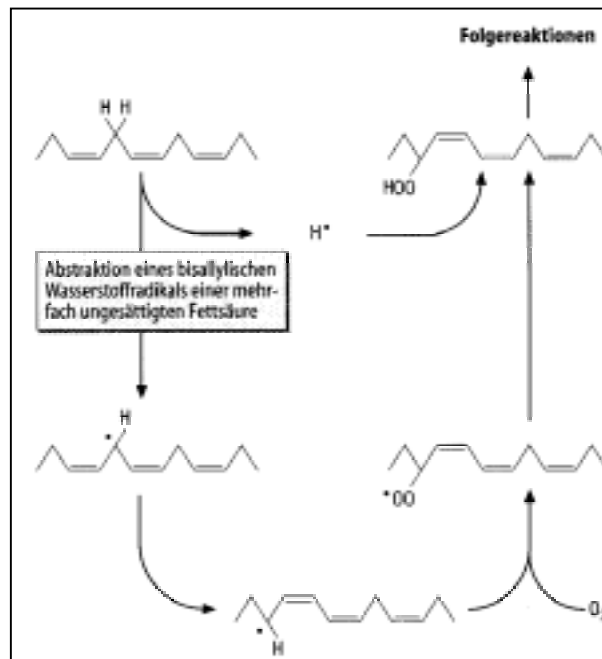


Abbildung 3: Entstehung von Lipid Peroxiden (Löffler 1997)

1.5.4.3 Protein Oxidation

Oxidative Einflüsse auf Proteine (insbesondere bestimmte Aminosäuren wie Methionin, Histidin und Tryptophan, aber auch Thiolgruppen von Cystein) können die biologische Aktivität empfindlich beeinflussen.

Die Oxidation von Proteinen erfolgt meist durch Hydroxyl-Radikale ($\text{OH}\cdot$), welche in Anwesenheit von einwertigem Kupfer oder zweiwertigem Eisen aus Wasserstoffperoxid gebildet werden. Dabei können zum Einen das Rückgrat oder aber die Seitenketten des Proteins verändert werden. Durch Angriff eines Radikals und in Anwesenheit von Sauerstoff kann ein Peroxyl-Radikal entstehen, welches weiterhin die Hydroxylierung des Peptidgerüsts bewirken kann. Weiterhin kann es vorkommen, daß die gebildeten Alkoxy-Radikale eine Spaltung des Proteins zur Folge haben, was die Bildung von Carbonylgruppen bewirkt (Butterfield et al. 2001).

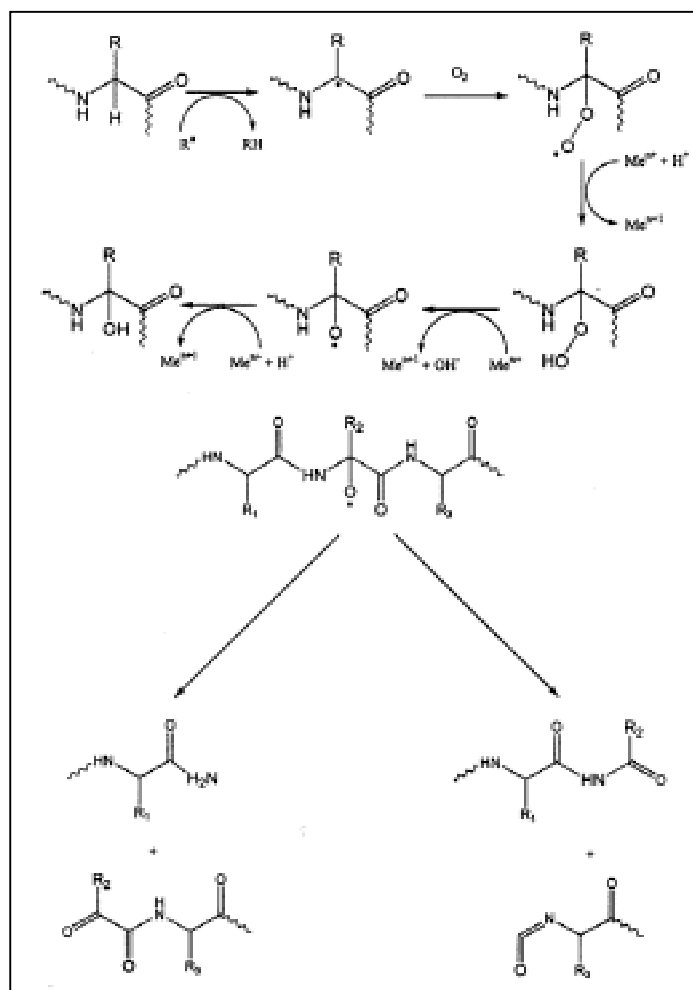
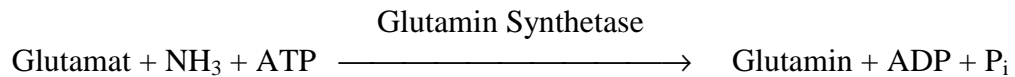


Abbildung 4: Entstehung von Carbonyl-Gruppen in Proteinen nach Angriff durch freie Radikale (Butterfield et al. 2001).

1.5.5 Glutamin Synthetase

Die Glutamin Synthetase katalysiert die Bildung von Glutamin aus Glutamat und Ammoniak. Erhöhte Glutamin-Konzentrationen im Gehirn können zu direkten Hirnschädigungen führen und Ammoniak ist in hohen Konzentrationen toxisch. Somit dient die Glutamin Synthetase der Entgiftung von Ammoniak und der Aufrechterhaltung des sauren Milieus im Gehirn.



Die Regulation der Glutamin Synthetase spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Stickstoffmetabolismus. Bei Säugern wird sie durch α -Ketoglutarat aktiviert. Die Regulation und der Aufbau dieses Enzyms sind jedoch in Prokaryoten wesentlich besser untersucht (Stadtman und Ginsburg 1974).

Des Weiteren wird die Konzentration des Glutamats, eines wichtigen Neurotransmitters im Gehirn, durch die Glutamin Synthetase reguliert. Glutamat ist u.a. an der Bildung von LTP (Langzeit- Potenzierung) und damit an Lernvorgängen beteiligt (Lipton und Rosenberg 1994). Bindet Glutamat an spezifische Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren), so wird unter bestimmten Rahmenbedingungen (z.B. gleichzeitige Depolarisierung) die Permeabilität für Calcium-Ionen und damit die intrazelluläre Calcium-Konzentration erhöht. Einströmendes Calcium löst eine Reaktionskaskade aus, in deren Verlauf Nitroxid Synthase aktiviert wird, welche u.a. Nitroxid (NO) freisetzt (Prince und Gunson 1993). Nitroxid kann mit Superoxid zu Peroxynitrit reagieren, welches u.a. mit Tyrosinresten von Tyrosin-Kinasen (bzw. von Substratproteinen der Kinasen) Nitrotyrosin bildet, welches die Aktivität der Kinasen beeinträchtigt. Da Tyrosin-Kinasen für die Aktivierung von Reaktionskaskaden verantwortlich sind, werden somit diese Kaskaden unterbrochen, was zu Apoptose führen kann (Beckman 1996).

Der Regulation der Glutamat-Konzentration kommt eine weitere wichtige Bedeutung zu, da Glutamat im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen und oxidativem Stress eine wichtige Rolle zu haben scheint (Coyle und Puttfarcken 1993).

1.6 Pathogenese des Nervenzelluntergangs bei Prionkrankheiten

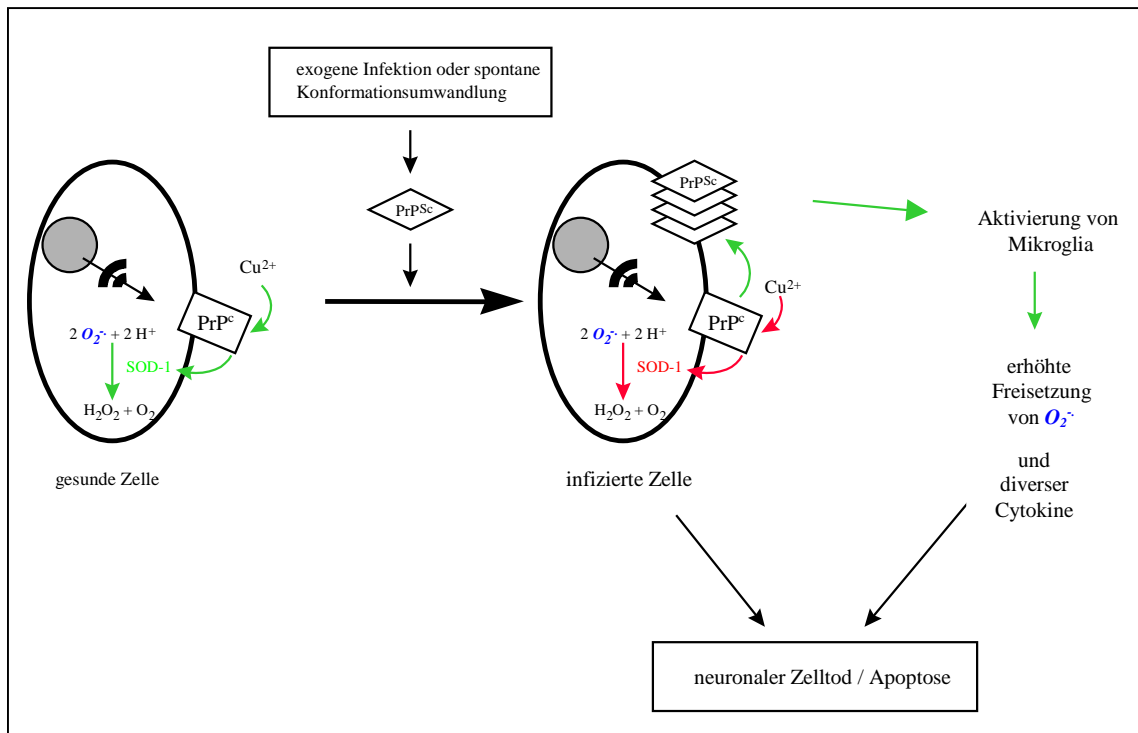


Abbildung 5: Pathogenese des Nervenzelluntergangs bei Prionkrankheiten. In der gesunden Zelle (links) wird das Prionprotein auf dem üblichen Syntheseweg gebildet und an der Zelloberfläche präsentiert. Zelluläres PrP (PrP^c) ist durch einen GPI-Anker an die Zellmembran gebunden und weist zwei Glykosylierungsstellen auf. Durch die kupferbindende Domäne des PrP ist es möglich, daß das Protein extrazelluläres Kupfer bindet und dieses in die Zelle transportiert, so daß die Aktivität der intrazellulären kupferabhängigen SOD beeinflusst wird. Weiterhin kann das zelluläre PrP durch eigene SOD-Aktivität der Entgiftung von Superoxid-Radikalen dienen. Wird die Konformation des PrP durch spontane Konversion oder äußere Infektion verändert (PrP^{Sc}, rechts im Bild), so ist es möglich, daß das zelluläre Protein seine Aktivität verliert ('loss of function'-Hypothese). Durch die Aggregation des fehlgefalteten Proteins (PrP^{Sc}) werden Mikroglia aktiviert ('gain of function'-Hypothese). Diese setzen vermehrt Superoxid-Radikale und Cytokine frei, welche den neuronalen Zelltod bewirken.

Der Nervenzelluntergang bei Prionkrankheiten könnte darin verankert sein, daß durch die PrP^{Sc}-induzierte Umwandlung von PrP^c zu PrP^{Sc} funktionsfähiges PrP^c verlorenght. Des Weiteren ist es möglich, daß die Akkumulation des PrP^{Sc} neurotoxische Wirkung hat oder durch die Umwandlung eine neue Funktion des Prionproteins aktiviert wird, welche mittelbar neurotoxisch ist. Diese beiden Aspekte werden als 'gain of function'- und 'loss of function'-Hypothese bezeichnet (Collinge et al. 1994, Kretzschmar et al. 1997).

Einhergehend mit der 'gain of function'-Hypothese konnte ein toxischer Effekt von PrP^{Sc} (Müller et al. 1993) sowie eines synthetischen Peptids (PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶) (Forloni et al. 1993, Brown et al. 1997a) in neuronalen Zellkulturen nachgewiesen werden. PrP-knockout-Mäuse sind nicht durch Auffälligkeiten in ihrem Verhalten gekennzeichnet (Büeler et al. 1992), aber gegenüber Infektion durch das Scrapie-Agens resistent (Büeler et al. 1993). In Zellkultur zeigen cerebelläre Neurone von knockout-Tieren erhöhte Sensibilität gegenüber oxidativen Einflüssen, aber keine Suszeptibilität gegenüber der Behandlung mit dem neurotoxischen PrP-Peptidfragment (PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶) (Forloni et al. 1993, Brown et al. 1994, Brown et al. 1996) oder mit PrP^{Sc} (Giese et al. 1998). Wildtyp-

Tiere hingegen sind weniger anfällig für oxidativen Stress, zeigen aber erhöhte Zellverluste nach Behandlung mit PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ (Brown et al. 1997a). Obwohl die Toxizität des Peptids (PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶) vielfach reproduziert werden konnte (Tagliavini 2001), bestätigten die Daten zweier Arbeitsgruppen (Kunz et al. 1999 und White et al. 1999) die Toxizität des Peptids nicht.

Die von Brown gezeigte erhöhte Sensibilität von PrP-knockout-Tieren gegenüber oxidativen Einflüssen konnte von White (White et al. 1999) in Primärzellkultur nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid reproduziert werden.

Zusätzlich wurden nach Peptid-Zugabe Veränderungen im Glutathion-Haushalt der Nervenzellen festgestellt (Perovic et al. 1997).

Die Toxizität des Peptids in Körnerzellen ist abhängig von der Anwesenheit von Mikroglia, da nach Zerstörung der Mikroglia durch Zugabe von L-Leucin-Methylester keine Peptid-vermittelte Toxizität mehr nachweisbar ist (Brown et al. 1996). Im Zentralnervensystem übernehmen Mikroglia die Funktion von Makrophagen, welche nach Aktivierung durch Cytokine im Rahmen pathologischer Bedingungen differenzieren und phagozytierende Eigenschaften entwickeln (Streit und Kreuzberg 1988). Aktivierte Mikroglia setzen reaktive Sauerstoffspezies sowie Cytokine frei (Tanaka et al. 1994), so daß ein Zusammenhang zwischen Mikroglia-Aktivierung und dem Auftreten oxidativen Stresses besteht.

Einen weiteren Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Mikroglia-Aktivierung und oxidativem Stress in PrP-vermittelter Neurotoxizität liefern Studien, in denen gezeigt werden konnte, daß Mikroglia von PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶ aktiviert werden und reaktive Sauerstoffspezies bzw. Cytokine freisetzen (Banati et al. 1994, Davis et al. 1994, Peyrin et al. 1999), sowie das Ergebnis, daß der induzierte neuronale Untergang durch Zugabe von Antioxidantien vermindert werden kann (Brown et al. 1996a).

Da oxidativer Stress in neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer eine Rolle spielt (Multhaup et al. 1997, Smith et al. 2000 und Varadarajan et al. 2000), wurde dieser Aspekt während der Prion Infektion näher untersucht. In Zelllinien wurden nach Infektion verminderte Aktivitäten der Gesamt-SOD und der Mn-SOD festgestellt. Weiterhin wurden vermehrte oxidative Schäden wie Lipid Peroxidation und verringerte Aktivitäten der Glutathion Peroxidase und Glutathion Reduktase gemessen (Milhavet et al. 2000). Ein weiterer Hinweis auf oxidativen Stress während der Prion Infektion ist ein erhöhter Gehalt an Nitrotyrosin-Resten in immunhistochemischen Untersuchungen Scrapie-infizierter Tiere (Guentchev et al. 2000).

In in vivo-Experimenten konnten Unterschiede im antioxidativen Status in Wildtyp- und knockout-Tieren gefunden werden. Knockout-Tiere zeigen erhöhte oxidative Schäden wie Lipid Peroxidation und Protein Oxidation (Wong et al. 2001a, Klamt et al. 2001) sowie einen erhöhten Gehalt an Nitrotyrosin-Resten (Wong et al. 2001b), so daß eine antioxidative Funktion des zellulären Prionproteins möglich ist.

Durch die bereits beschriebene Kupferbindung des Prionproteins und seine mögliche regulative Beeinflussung der Aktivität der Cu/Zn-abhängigen Superoxid Dismutase (Brown et al. 1997a,b), sowie seiner potentiellen SOD-eigenen Aktivität (Brown et al. 1999) und der ermittelten oxidativen Schäden in PrP-defizienten Mäusen (Wong 2001a,b), ist eine antioxidative Wirkung des zellulären Prionproteins denkbar. Im Sinne der 'loss of function'-Hypothese könnte das zelluläre PrP^C seine potentielle antioxidative Funktion während der Infektion verlieren und vermehrter oxidativer Stress auftreten. Einhergehend mit der für die 'gain of function'-Hypothese gefundenen

neurotoxischen Wirkung von PrP^{Sc} (Müller et al. 1993) und der vermehrten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch aktivierte Mikroglia (Peyrin et al. 1999), ist das Auftreten oxidativen Stresses während der Prion Infektion nicht nur denkbar, sondern es wurden in infizierten Zellkulturen bereits Indizien für oxidativen Stress gefunden (Milhavet et al. 2000). Da nach diesen Überlegungen in beiden Fällen (gain und loss of function) das Auftreten oxidativen Stresses möglich ist, sind beide Theorien nicht gegenseitig auszuschließen und die weitere Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Kupfermetabolismus, PrP-Expression und (anti-)oxidativen Mechanismen in vivo notwendig.

2 Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Beantwortung zweier grundsätzlicher Fragestellungen:

a) Weist zelluläres Prionprotein antioxidative Mechanismen auf ?

Da es Hinweise auf antioxidative Eigenschaften des zellulären Prionproteins gibt (Abschnitt 1.6), sollen in dieser Arbeit in vivo Untersuchungen in verschiedenen transgenen Mauslinien auf antioxidative Mechanismen durchgeführt werden.

Bisherige Untersuchungen antioxidativer Eigenschaften des zellulären Prionproteins erfolgten zumeist in Zellkultur bzw. vorzugsweise in Wildtyp- und PrP-knockout-Tieren. Es konnte gezeigt werden, daß PrP-knockout-Tiere sensibler auf oxidativen Stress reagieren (Brown et al. 1994 und White et al. 1999). Die Befunde von Wong und Klamt (Wong et al. 2001a und Klamt et al. 2001), daß PrP-knockout-Tiere erhöhte oxidative Schäden wie Lipid Peroxidation und Protein Oxidation zeigen, ist mit der zugesprochenen antioxidativen Eigenschaft des Prionproteins (Brown et al. 1997a) vereinbar.

Weiterhin wäre demnach zu erwarten, daß Tiere mit überexprimiertem Prionprotein (Tg35-Tiere) besonders gut vor oxidativen Schäden geschützt sind, wohingegen Mäuse mit deletierter Oktapeptidregion (C4-Tiere) aufgrund der beeinträchtigten Kupfer-Bindung (Brown et al. 1997a, Kramer et al. 2001) besonders anfällig für oxidativen Stress sein sollten.

Mauslinien mit weitgreifend verkürztem Prionprotein (E57- und F35-Tiere) weisen Ataxie und Gewichtsverlust auf (Shmerling et al. 1998, vgl. Abschnitt 1.2.7.). Da die Verkürzung des Prionproteins die kupferbindende Domäne betrifft und die Tiere klinische Symptome zeigen, könnten diese Effekte mit einer potentiellen antioxidativen Eigenschaft des Prionproteins in Zusammenhang stehen.

Um diese Zusammenhänge genauer zu überprüfen, werden die verschiedenen transgenen Linien (Wildtyp, PrP^{0/0}, C4 und Tg35 sowie die klinisch auffälligen Linien E57 und F35) auf ihren oxidativen Status getestet.

b) Tritt oxidativer Stress während der Scrapie-Pathogenese auf ?

Einhergehend mit der 'gain of function'- Hypothese und 'loss of function'- Hypothese (Abschnitt 1.6) soll untersucht werden, ob im Scrapie-Zeitverlauf oxidativer Stress auftritt.

Hinweise auf vermehrten oxidativen Stress während der Prion Infektion liefern bisherige Untersuchungen in infizierten Zelllinien, welche nach Infektion ein erhöhtes Ausmaß an oxidativen Schäden (Lipid Peroxidation) und erniedrigte Aktivitäten der Gesamt SOD, Mn-SOD und Glutathion Reduktase zeigen (Milhavet et al. 2000) sowie immunhistochemische Untersuchungen infizierter Tiere, in welchen vermehrt Nitrotyrosin-Reste gefunden wurden (Guentchev et al. 2000).

Zur detaillierten Analyse des Zusammenhangs zwischen Scrapie-Pathogenese und oxidativem Stress soll nun anhand einer Scrapie-Zeitverlaufsstudie oxidativer Stress im Hinblick auf den Aspekt der 'gain of function'- und 'loss of function'-Hypothese näher betrachtet werden.

Die durch fehlgefaltetes PrP^{Sc} aktivierten Mikroglia verursachen durch freigesetzte Superoxid-Radikale vermehrten oxidativen Stress. Um ein Bild über das Ausmaß des durch Prion Infektionen induzierten Stresses zu erhalten, wird der oxidative Status anhand zweier verschiedener Scrapie-Stämme (79A und ME7) in unterschiedlichen Zeitintervallen nach Infektion (30, 60, 90, 120 und 150 Tagen nach Inokulation) analysiert.

Um einen Eindruck über den Haushalt der enzymatischen und nicht enzymatischen Antioxidantien zu erhalten, werden die Aktivität der Superoxid Dismutase und der Glutathion-Haushalt (reduzierte und oxidierte Form des Glutathions sowie die Aktivitäten der Glutathion Peroxidase und Glutathion Reduktase) untersucht. Zur Analyse auftretender oxidativer Schäden werden der Gehalt an oxidiertem Protein und Lipid Peroxidation gemessen. Da Glutamat einen wichtigen Neurotransmitter im Gehirn darstellt und im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen und oxidativem Stress eine wichtige Rolle zu haben scheint (Coyle und Puttfarcken 1993), wird ebenfalls die Aktivität der Glutamin Synthetase analysiert.

Zur weiteren detaillierten Untersuchung der Lipid Peroxidation werden in Zusammenarbeit mit Dr. Sönke Arlt, Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf, äquivalente Proben der verschiedenen transgenen Tiere zur Messung der Fettsäurezusammensetzung, insbesondere der gesättigten Fettsäuren, welche als Substrat der Lipid Peroxidation dienen und lipohiler und hydrophiler Antioxidantien (Vitamin E und C), welche einen Schutz vor Lipid Peroxidation darstellen, verwendet.

3 Material

3.1 Geräte

Autoklav, auch für 134°C, 1 h (Prionenentsorgung) geeignet	H+P
Binokular zum Präparieren von Primärzellen	Zeiss
Blotapparatur, semidry	Pharmacia
Brutschrank Cellstar	Nunc
Drehrad zur Immunpräzipitation (test tube rotator)	Krannich
Eismaschine	Ziegra
Elektrophorese-Apparaturen	BioRad / Pharmacia
Folienschweißgerät	Merck
Gefrierschrank, -80°C	Kendro / Heraeus
Gelapparatur, mini	BioRad
Glaspistillen, 8 ml	Schütt
Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Kühl-Gefrier-Kombination (4°C, -20°C)	Fröschl / Liebherr
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskop IX 50 mit Fotoapparat	Olympus
Mikrowelle	Moulinex
Millipore-Anlage Milli-Q	Millipore
pH-Meter	Beckman
Pipettierhilfe	Eppendorf
Potter Homogenisator homgen	Schütt
Sonicator Sonoplus	Bandelin
Spektrophotometer	Pharmacia
Spektrophotometer Specord S100	Analytik Jena
Sterilbank Klasse II	Nunc
Stickstofftank	Air Liquide
Thermoblöcke	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf
Trockenschrank	MMM
Vortex	Heidolph
Waagen	Sartorius
Wasserbad	GFL
Wippe zur Blotentwicklung (Rocky)	Schütt
Zellkultur-Zentrifuge 5810R	Eppendorf

3.2 Sonstige Materialien

Absaugvorrichtung für Zellkulturüberstände	Nunc
Einfrierboxen	Nunc
Eisbox	
Eppendorf-Gefäße, 1,5 und 2 ml	Sarstedt
Eppendorf-Ständer (für 0,5 und 1,5 bzw. 2ml)	Merck
Falcon-Gefäße, 15 und 50 ml	Nunc
Filterpapier	Whatman
Gewebekulturflaschen	Greiner
Kryoröhrchen, 1,8 ml	Nunc
Pasteurpipetten	
Patientenunterlagen	
Pipetten 1000, 200, 20, 10 µl	Gilson (ABIMED) / Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt
Präparierbesteck	AESCULAP
PVDF Immobilon Membran	Millipore
Röntgenfilm Hyperfilm	Amersham
Serologische Pipetten 20,10,5, 2 ml	Sarstedt
Skalpelle (Einmalskalpelle; Vollmetall-Skalpelle)	AESCULAP
Sterilfilter FP 30/0,2 CA-S	Schleicher & Schuell
Zellkulturplatten, 24 Well	Nunc
Zellkulturflaschen	Nunc
Pyrex-Glasreagenzröhrchen 10 ml	Bibby Sterilin Ltd.

3.3 Enzyme

Enzym	Firma	Bestell-Nr.
L-Glutamin Synthetase	Sigma	G-6632
Glutathion Peroxidase	Calbiochem	G-6137
Glutathion Reduktase	Sigma	G-3664
Katalase	Boehringer	106810
Superoxiddismutase	Sigma	S-5395
Xanthin Oxidase	Calbiochem	682151

3.4 Antikörper

3.4.1 Primärantikörper

	Spezifikation	Verdünnung im Western-Blot	Herkunft/Referenz; Bestell-Nr.
6H4	Maus monoklonal	1:1000	Prionics, 01-010
3B5	Maus monoklonal Hybridoma Kulturüberstand	1:50	Krasemann, S. et al., 1996
α-SOD-1	Kaninchen polyklonal	1:500	Europa, CR6071RP
α-SOD-1	Schaf polyklonal	1:500	Upstate, 06-482
α-Mn-SOD	Kaninchen polyklonal	1:500	Europa, FZ-20-SR56

3.4.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezifikation	Verdünnung im Western Blot	Herkunft/Referenz Bestell-Nr.
Esel-anti-Schaf/Ziege IgG-AP	affinitätsgereinigtes Serum, Alkalische Phosphatase gekoppelt	1:2500	Boehringer, 1333097
Ziege-anti-Maus IgG-AP	affinitätsgereinigtes Serum, Alkalische Phosphatase gekoppelt	1:1000	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen IgG-AP	affinitätsgereinigtes Serum, Alkalische Phosphatase gekoppelt	1:5000	DAKO, D0487

3.5 Kits

Kit	Firma	Bestell-Nr.
SOD-Assay	OXIS; R&D	SOD-525
Glutathion Peroxidase Assay Kit	Calbiochem	354104
BCA-Assay Kit zur Proteinbestimmung	Sigma	BCA-1

3.6 Zusätze/ Medien

Medien-Zusatz	Firma; Bestell-Nr.
Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS)	BioWhittaker Europe
DMEM, mit 1g/l Glucose	PAN
Fetales Kälberserum (FCS) (10%)	PAN; 1502-P217304
L-Glutamat	PAN; P04-80100
Penicillin	Seromed A 321-42
Streptomycin	Seromed A 331-26
poly-D-Lysin	Sigma P-7405
10 x Trypsin (0,5% (w/v) in 10 x PBS)	Seromed L 2153

3.7 Längenstandards für Western Blot

Längenstandard	Firma	Bestell-Nr.
Best of All (BOA)	BIOMOL	55875
Broad range Standard	BioRad	161-0318

3.8 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Bestell-Nr.
Acetylchlorid	Sigma	A-0772
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma	A-2754
30% Acrylamid/Bis solution 37,5 : 1 (N,N'-Methylenbisacrylamid)	BioRad	65366
Agarose A Beads	Boehringer	1719408
Agarose G Beads	Boehringer	1719416
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck	1.01201.1000
L-Arginin	ICN	100743
Ascorbat	Sigma	A-5960
Bathocuproinsulfonat (BCS)	Aldrich	144,662-5
Bicinchoninic Acid (BCA)	Sigma	B-9643
Bovine Serum Albumin (BSA Protein -Standard)	Sigma	P-0914
Bovine Serum Albumin, fat free (BSA)	Boehringer	775827
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Boehringer	1585002
Bromphenolblau	Merck	1.11746.0005
Butylated Hydroxytoulene (BHT)	Sigma	B-1378
CDP Star	Tropix	MS100R
Chelite (Chelex)	Serva	41706
Chloroform	Merck	1.02445.1000
5- α -Cholestan	Merck	8.41513.0005
Complete, mini	Roche	1836153
Deoxycholic acid	Sigma	D-6750
2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP)	Sigma	D-1878
Diethylentriamin-N,N,N',N'',N'''-Pentaessigsäure (DETAPAC)	ICN	151478
N,N-Dimethylformamid (DMF)	ICN	194818
2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH)	Merck	1.03081.0025
5',5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure) (Ellman`s Reagenz)	ICN	150126
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Merck	1.11474.0005
Eisen-III-chlorid Hexahydrat	Merck	28.02.03
Ellman`s Reagenz	ICN	150126
Entwickler		
Essigsäure	Merck	1.00062.1000
Ethanol, reinst (EtOH)	Merck	1.00983.2500
Ethanol, vergällt	Merck	1.00974.1011
Ethylacetat	Merck	1.09623.1000
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma	E-1644
5-Fluoro-2'-Deoxyuridin (FUDR)	Sigma	F-0503
Guanidiniumchlorid (GuaHCl)	Merck	1.04219.0100
Glycerin	Merck	4091.1000
Glycin	Sigma	G-7126
L-Glutamat	Merck	1.00291.0
L-Glutamin	Merck	1.00289.0100
Glutathion oxidiert	ICN	151193
Glutathion reduziert	Merck	1.04090.0005

Heptadekansäure	Merck	1.09604.0005
n-Hexan	Merck	1.04372.0500
Hydroxylamin	Merck	8.14441.0100
I-Block	Tropix	AI 300
IGEPAL	Sigma	I-3021
Imidazol	Merck	8.14223.0250
Isopropanol	Merck	8.07481.1000
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck	1.05104.1000
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	A386673
Kupfersulfat Pentahydrat	Sigma	C-2284
Levamisole	ICN	155228
Magnesiumchlorid	Merck	1.05833
L-Leucin-Methylester (LLME)	Sigma	L-9000
Lithiumperchlorat	Merck	1.01081.0100
Malondialdehydbis(diethylacetal) (MDA)	Merck	8.05797.0005
Mangan(II)-chlorid	Merck	8.05930.0100
Methanol	Merck	1.06009.1000
NADPH	ICN	101167
Natrium-Cyanid	ICN	194866
Natriumchlorid	Merck	1.06404.1000
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad	161-0302
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck	1.06498.1000
Natrium-L-Tartrat	Aldrich	22,872-9
4-Nitroblautetrazoliumbromid (NBT)	Boehringer	1585029
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Seromed	L-182-50
meta-Phosphorsäure	Merck	1.00546.0100
Proteinase K (PK)	Roche	1964364
Roentogen (Fixierer)	Tetenal	103482
Salzsäure	Merck	1.09063.1000
N-Lauryl-Sarcosine	Sigma	L-5125
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck	1.10732.0010
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2,4-tetrazoliumbromid (MTT)	Merck	1.11714.0001
Thenoyltrifluoracetone (TTA)	Aldrich	T 2,700-6
Thiobarbitursäure (TBA)	Sigma	T 5500
Trichloressigsäure (TCA)	Merck	1.00807.0250
Triethanolamin	Merck	1.08379.1000
Tri-natriumcitratdihydrat	Merck	1.06431.1000
Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid	Merck	1.08219.1000
TRIZMA®BASE	Sigma	T-6066
δ-Tocopherol	Sigma	T2028
Toluol	Merck	1.08325.1000
Tween 20 = Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurat	Sigma	P-1379
Uridin	Sigma	U-3003
Wasserstoffperoxid	Merck	1.07209.0250
2-Vinylpyridin	Merck	8.08513.0005
Xanthin	Sigma	X-3627

3.9 Verwendete Puffer und Lösungen

Alkalische Phosphatase-Puffer: 100 mM Tris pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂

APS-Lösung: 10 % APS in Wasser

Assay- Puffer zur Immunfärbung: 20 mM Tris, 1 mM MgCl₂ pH 9,8

BCA-Lösung: enthält Bicinchonin Säure (BCA), Natriumcarbonat, Natriumtartrat und Natriumbicarbonat in 0,1 M Natronlauge pH 11,25 (keine genaueren Angaben des Herstellers)

BCIP- Lösung: 50 mg BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat) pro ml in 100 % DMF (Dimethylformamid)

Block- Puffer: 0,2 % I-Block, 0,1 % in 1x PBS

BSA-Standard-Lösung: 1 mg/ml BSA in 0,15 M Natriumchlorid und 0,05% Natriumazid

Butylhydroxytoluol: 0,1 M in Ethanol

5- α -Cholestanlösung: 100 mg/l in Ethanol

Citrat-Acetat-Puffer: 22g Tri-natriumcitratdihydrat ad 100 ml Wasser, pH 4,15

Cyanid-Lösung: 40 mM NaCN (vor jeder Messung frisch ansetzen) in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer, kupferfrei

DETAPAC-Lösung: 1,33 mM DETAPAC in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer, kupferfrei

2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP): 50 mg DCIP ad 500 ml Wasser

Dinitrophenylhydrazin (DNPH): 0,2 % in 2 N HCl

Ellman`s Reagenz: 4 mg in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,8

Ethanol/Ethylacetat 1:1

Fixierer 1+6 mit Wasser

Glutamin Synthetase-Reaktionspuffer: 50 mM Hydroxylamin, 50 mM Imidazol-HCl, 0,5 mM MnCl₂, 100 mM L-Glutamin, 0,2 mM ADP, 25 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,2

Glutamin Synthetase -Verdünnung: Glutamin-Synthetase 0,1 U/ μ l in Wasser

Glutathion Peroxidase Assay-Puffer: 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA pH 7,6

Glutathion-Reaktionspuffer: 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, 0,03 mM NADPH, 1 U/ml Glutathion Reduktase pH 7,8

Glutathion Reduktase-Reaktionspuffer: 125 mM Kaliumphosphatpuffer, 0,75 mM EDTA, 0,25 mM NADPH pH 7,4

Glutathion-Reduktase-Verdünnung: 1 U/ml in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,8

Guanidiniumchlorid: 6 M in 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6

Heptadekansäure: 200 mg/l in Ethanol

Kaliumphosphatpuffer zur Glutathion-Messung: 0,1 M pH 7,8

Kaliumphosphatpuffer zur Messung der Protein Oxidation: 0,05 M pH 7,8

Kaliumphosphatpuffer für den SOD-Assay: 0,05 M kupferfrei pH 7,8

Katalase-Verdünnung: 1U/ml Katalase in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer (frisch), kupferfrei

Kupfersulfat Pentahydrat-Lösung: 4% (w/v) Kupfersulfat Pentahydrat

2 x Lämmli- Puffer: 0,125 M Tris pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerin, 0,2 M DTT, 0,02 % Bromphenolblau

Laufpuffer für SDS-PAGE: 0,025 M Tris, 0,1 % SDS, 0,192 M Glycin pH 8,3

Lösung R1: 0,66 mM 5,6,6a,11b-tetrahydro-3,9,10-trihydrobenzo[c]fluoren, 32 mM HCl, 0,5 mM DETAPAC, 2,5% Ethanol

Lösung R2: 33,3 mM 1,4,6-trimethyl-2-vinylpyridinium trifluormethansulfonat in 1 mM HCl

Lysepuffer A: 0,05 M Kaliumphosphatpuffer, 100 mM NaCl, 0,2 % Sarcosyl, 5 Tabletten Boehringer complete Protease Inhibitor Mix ad 50 ml Puffer, kupferfrei pH 7,8

Lysepuffer B: 100 µM Butylated Hydroxytoluene (BHT), 1 mM EDTA, 1 × PBS kupferfrei pH 7,6

NADPH Reagenz: 4,8 µmol NADPH, 24 µmol GSH, 12 U Glutathion Reduktase

NADPH-Verdünnung zur Glutathion-Messung: NADPH 0,03 mM in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer

NBT-Lösung zur Membran-Färbung: 50 mg NBT (4-Nitroblautetrazoliumbromid) pro ml in 70 % DMF

NBT-Lösung für den SOD-Assay: 2,24 mM NBT in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer, kupferfrei (im Dunkeln aufbewahren)

Malonaldehyd-bis(diethylacetal) (MDA): 4,18 M in 10 % TCA

MTT: 5 mg/ml in Wasser

Phosphate Buffered Saline: 1 x PBS: 9,55 g Instamed PBS Dulbecco/l bidest. Wasser

meta-Phosphorsäure: 10%ig in Wasser

Proteinase K (PK)-Verdünnung: 1 µg/µl PK in Wasser

Roentogen: (Entwickler) 1+10 mit Wasser

Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris/HCl; pH 6,8

SDS-Lösung: 10 % SDS in Wasser

SOD-Reaktionspuffer (Oberley und Spitz): 1 mM DETAPAC, 0,05 M Kaliumphosphat, 110 µM NBT, 225 µM Xanthin pH 7,8

SOD-Reaktionspuffer (SOD-Kit): 50mM 2-Amino-2-methyl-1,3-Propanediol, 3,3 mM Borsäure, 0,11 mM DETAPAC, kupferfrei, pH 8,8

Startlösung zur Messung der Glutathion Reduktase: 16,5 mM GSSG, 30 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4

Stop-Lösung zur Messung der Glutamin Synthetase: 0,37 M FeCl₃ x 6 H₂O, 0,3 M TCA, 0,6 M HCl

tert-Butyl Hydroperoxid: 70 % wässrige Lösung

Thiobarbitursäure (TBA): 1 % in Wasser

δ-Tocopherol: 30 µM in Ethanol

Transfer- Puffer: 0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1% SDS, 20 % Methanol

Trenngelpuffer: 1,5 M Tris/HCl; pH 8,8

Trichloressigsäure (TCA): 10 % TCA in Wasser

Trichloressigsäure (TCA): 30 % TCA in Wasser

Wasser

Xanthin-Lösung: 1,8 mM Xanthin in 0,05 M Kaliumphosphatpuffer (täglich frisch), kupferfrei

Xanthin-Oxidase Verdünnung: 4mU/ml Xanthin-Oxidase in 1 x DETAPAC (frisch), kupferfrei

3.10 Transgene Tiere

Die Tierzucht wurde in Göttingen von der Zentralen Tierhaltungs Einrichtung (ZTE) übernommen. In München erfolgte die Zucht in Instituts-eigenen Tierhaltungsräumen unter Standardbedingungen.

Wildtyp-Tiere: Diese Tiere wurden durch Kreuzung zweier Wildtyp-Linien (C57/BL6 und 129/Sv) generiert und exprimieren das normale Prionprotein (Büeler et al.1992).

PrP^{0/0}-Tiere: Bei den knockout-Tieren wurden Teile des PrP-Gens entfernt und durch ein Neomycinresistenzgen ersetzt. Diese Tiere exprimieren kein Prionprotein und sind gegenüber Infektion mit Prionen resistent. Die Generierung dieser Linie erfolgte auf dem gemischten C57/BL6 × 129/Sv-Wildtyp Hintergrund (Büeler et al. 1992).

Tg35-Tiere: Die Tiere exprimieren 4-5fach mehr PrP als Wildtyp-Tiere und zeigen ab dem 4. Lebensmonat eine Parese der Hinterläufe. Bei Infektion mit dem Scrapie-Erreger zeigen diese Tiere eine kürzere Inkubationszeit als Wildtyp-Tiere (Fischer et al. 1996).

C4-Tiere: Die Tiere exprimieren ein Prionprotein, welchem die Oktapeptid Region (AS 32-93) fehlt. Die Linie ist homozygot für das Transgen (Shmerling et al. 1998) und exprimiert viermal so viel PrP wie Wildtyp Tiere. C4-Tiere können mit Scrapie infiziert werden, wobei die Inkubationszeit um das 30fache verlängert ist (Flechsich et al. 2000).

E57-Tiere: Bei den E57-Tieren wurde das Prionprotein um die Aminosäuren 32-121 verkürzt. Die Expression des verkürzten Proteins liegt 6fach über der Wildtyp-Expression. Die Mäuse zeigen im Alter von 6-8 Wochen eine Parese der Hinterläufe, sowie Ataxie und Gewichtsverlust (Shmerling et al. 1998).

F35-Tiere: Die Expression des um die Aminosäuren 32-134 verkürzten Prionproteins dieser Tiere ist doppelt so hoch als in Wildtyp-Mäusen. Im Alter von 3-4 Wochen zeigen diese Tiere Ataxie, eine Parese der Hinterläufe, Tremor und Gewichtsverlust (Shmerling et al. 1998).

Die Zucht der E57- und F35-Tiere erfolgte durch Kreuzung mit Wildtyp-Tieren, da alleinige Expression des verkürzten Prionproteins zu Ataxie, einer Parese der Hinterläufe und Infertilität führt. Um den genetischen Hintergrund der Tiere zu kontrollieren und die Weiterzucht zu gewährleisten, wurden Schwanz-Biopsien vorgenommen und die DNA der Tiere mittels PCR überprüft. Heterozygote Tiere, welche das verkürzte und das Wildtyp-PrP-Gen enthielten, wurden zur Zucht eingesetzt, wohingegen kranke Tiere, welche nur das verkürzte PrP-Gen aufwiesen, zu Versuchszwecken verwendet wurden.

3.11 Infizierte Tiere

Für die Scrapie-Zeitverlaufsstudie wurden in Zusammenarbeit mit dem Bundesforschungszentrum für Viruserkrankungen der Tiere in Tübingen (unter Anleitung von Prof. M.H. Groschup) sechs Wochen alte weibliche C57BL/6J-Mäuse intracerebral mit 30 µl Hirnhomogenat (10 % w/v) von terminal an den Scrapie-Stämmen ME7 bzw. 79A erkrankter Tiere inokuliert. Als Kontrolle dienten uninfizierte Tiere gleichen Alters. Nach 30, 60, 90, 120 und 150 Tagen nach Inokulation wurden die Tiere getötet und direkt bei -80°C eingefroren, um eventuelle Artefakte durch Lagerung bei Raumtemperatur zu vermeiden (Giese et al. 1995, Giese et al. 1998).

3.12 Verwendete Zelllinien

N2a-Zellen

Murine Neuroblastoma Zellen, aus einem spontanen Tumor einer strain A Albino Maus isoliert. 30 % der Zellen wachsen wie neuronale Zellen, 70 % sind rund und leicht adhärent. Die Teilungszeit der Zellen beträgt 70 Stunden, wobei die maximale Zelldichte ca. 20×10^6 Zellen/175cm² beträgt. Die Zellen wachsen bei hoher Zellkonzentration langsamer und nicht bis zur Konfluenz. Die Kultivierung erfolgt bei 5 % CO₂ und 37 °C, die Passage der Zellen einmal pro Woche 1:4 mit Trypsin/EDTA. Einfrieren der Zellen erfolgt bei 70 % Medium, 20 % FKS, 10 % DMSO mit ca. 2×10^6 Zellen pro Ampulle. (Angaben nach DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH)

Die in dieser Arbeit verwendeten N2a-Zellen stammen aus dem Primatenzentrum, Göttingen.

4 Methoden

4.1 Herstellung kupferfreier Lösungen

Zur Entfernung von Metallionen werden die Lösungen mit Säulenmaterial (Chelite, Serva) versetzt und auf dem Magnetrührer für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Metallionen binden an das Säulenmaterial und werden durch anschließende Filtration mit dem Chelite aus dem Puffer entfernt. Das Säulenmaterial wird durch Zugabe von 1 M Salzsäure von den gebundenen Schwermetallionen befreit und anschließend zur weiteren Verwendung mit kupferfreiem HPLC-Wasser äquilibriert. Die aufgereinigten Lösungen werden in die entsprechenden Methoden eingesetzt.

4.2 Herstellung der Hirnhomogenate

Die Hirne 3 Monate alter Mäuse (WT; PrP^{0/0}; C4; Tg35; E57 und F35) werden entnommen, in Hemisphären geteilt und in 1,8 ml Kryoröhrchen von Nunc einzeln gewogen. Zur längeren Aufbewahrung werden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren. Pro Tier werden zwei Ansätze angefertigt: Eine Hemisphäre wird zur Messung der in dieser Arbeit beschriebenen Methoden (SOD, GR, GPx etc.) verwendet, wohingegen die Homogenate der zweiten Hemisphäre zur Messung lipophiler und hydrophiler Antioxidantien nach Hamburg gesendet werden.

Die Trennung der Ansätze ist notwendig, da zur Herstellung der Hirnhomogenate unterschiedliche Homogenisierungs-Methoden und Puffersysteme angewandt werden.

Herstellung der Homogenate zur Messung von SOD, GPx, GR etc.

Eine Hemisphäre wird in einem 15 ml Falcon-Gefäß 1 + 9 mit Lysepuffer A versetzt und mit einem Sonikator (Sonoplus, Bandelin) bei 60 % Leistung für 2 x 30 Sekunden auf Eis homogenisiert. Die Proben werden anschließend in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bei 4°C für 10 Minuten bei 10.000 rpm (Tisch-Kühlzentrifuge 5415R, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wird in 150 µl aliquotiert (ca. 10 Aliquots) und nach Begasung mit Stickstoff bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

Herstellung der Homogenate für die Messung lipidlöslicher und wasserlöslicher Antioxidantien am Biochemischen Stoffwechsellabor des UKE in Hamburg

In einem zweiten Ansatz werden die Hemisphären 1 + 9 mit Lysepuffer B versetzt. Das Homogenisieren erfolgt bei 500 rpm mit einem Potter-Homogenisator in Glaspistillen (Schütt) für 5 Minuten auf Eis. Die Proben werden anschließend bei 4°C für 20 Sekunden bei 10.000 rpm (Tisch-Kühlzentrifuge 5415R, Eppendorf) anzentrifugiert, der Überstand in 250 µl aliquotiert (4 Aliquots) und nach Begasung mit Stickstoff bei -80 °C eingefroren.

4.3 Proteinbestimmung mit dem BCA-Assay Kit nach Sigma

Von den Hirnhomogenaten werden zunächst 1:50-Verdünnungen hergestellt und zur Proteinbestimmung eingesetzt. Danach können definierte Proteinmengen bzw. Volumina in die Assays eingesetzt werden.

Zur Eichung wird eine BSA-Standard-Lösung (1mg/ml) verwendet. Die Herstellung der Reaktionslösung erfolgt durch Mischung von 50 Teilen BCA (Bicinchoninic Acid) mit 1 Teil Kupfersulfat Pentahydrat-Lösung.

Zur Proteinbestimmung werden nach Protokoll des Herstellers 50 µl Probe (Hirnhomogenat-Verdünnung bzw. BSA-Standard) mit 1 ml Reaktionslösung gemischt und anschließend bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach Extinktionsmessung bei 562 nm erfolgt die Berechnung der Proteinkonzentration anhand der Eichgeraden.

4.4 Proteinase-K Verdau

Zur Überprüfung auf PK-resistentes PrP werden 50 µl Hirnhomogenat mit 2,5 µl Proteinase-K Lösung (1µg/µl) versetzt (finale Konzentration: 50 µg/ml) und 2 Stunden bei 37 °C im Thermoblock (Heidolph) inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion werden 50 µl 2 x Lämmli-Puffer zugegeben und der Ansatz sofort für 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht.

Die Proben werden dann zum Western Blot eingesetzt. Als Primärantikörper wird der monoklonale 6H4 Maus Antikörper von Prionics verwendet und als Sekundärantikörper dient der Ziege-anti-Maus IgG-AP Antikörper von Dianova.

4.5 Immunpräzipitation

50 µl Hirnhomogenat werden mit 350 µl PBS und 50 µl Agarose-Beads versetzt und 1 h auf dem Rollrad bei 4°C inkubiert, um unspezifisch an die Agarose-Beads bindende Agenzien zu entfernen. Zur Entfernung der Beads wird 2 Min. bei 14.000 rpm, 4°C zentrifugiert (Tisch-Kühlzentrifuge 5415R, Eppendorf) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Zu dem Überstand werden 6 µl Antikörper (α-SOD-1 von EUROPA Research Products; Kaninchen-anti-SOD; polyklonal) und nochmals 50 µl Beads (Protein-A-Agarose) zugegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4°C auf dem Rollrad. Anschließend wird 2 Min. bei 14.000 rpm, 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und die Beads durch Zugabe von 100 µl PBS und nochmaliger Zentrifugation gewaschen. Der zweite Überstand wird verworfen.

Zur Überprüfung der IP werden die Beads mit 50 µl Lämmli-Puffer versetzt und aufgeköcht. Ebenso werden 20 µl der IP-Überstände und entsprechende Homogenat-Verdünnung ohne IP mit 20 µl Lämmli-Puffer gemischt und je 20 µl zum Western Blot eingesetzt.

4.6 Western Blot

4.6.1 Probenvorbereitung

Nach Messung der Proteinkonzentration werden die Hirnhomogenate 1:1 mit 2 x Lämmli-puffer versetzt. Danach werden die Proben 5 Minuten bei 95°C im Heizblock aufgeköcht und 80- 100 µg Protein auf das SDS-Gel aufgetragen.

4.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zunächst wird die Gelkammer (Mini-Kit, BioRad München) vorbereitet und das Gel zwischen die beiden Glasplatten gegossen. Dabei wird zunächst das Trenngel auf ca. $\frac{3}{4}$ der Gellänge gegossen, mit Isopropanol überschichtet und 20 Minuten auspolymerisiert. Danach wird das Sammelgel darübergegeben, die Kämme für die Probentaschen eingesetzt und ebenfalls 20 Minuten auspolymerisiert.

Gelzusammensetzung für 1 Mini- Gel:

Sammelgel (5%)	Trenngel (15%)
0,625 ml 30 % Acrylamid / Bisacrylamid	3,75 ml 30 % Acrylamid / Bisacrylamid
1,25 ml 4 x Sammelgelpuffer	2,5 ml 4 x Trenngelpuffer
3 ml Wasser	3,65 ml Wasser
50 µl 10 % SDS	50 µl 10 % SDS
100 µl 10 % APS	100 µl 10 % APS
3,3 µl TEMED	3,3 µl TEMED

Nach dem Auspolymerisieren und dem Auftragen der Proben wird das Gel für 1,5-2 Stunden bei 80 V im Sammelgel und 120-150 V im Trenngel laufengelassen.

Als Referenz werden 5 µl Proteinlängenstandard der Firma BIOMOL bzw. der Firma BioRad aufgetragen. Nach dem Gellauf wird das Gel zum Western- Blot eingesetzt.

4.6.3 Western- Blot (semi-dry)

Mit dieser Methode werden die Proteine auf eine PVDF-ImmobilonTM-P Transfer-Membran übertragen. Dazu wird die Membran in purem Methanol eingelegt und anschließend die Methanol- Konzentration mit Wasser auf ca. 20 % eingestellt. Das Gel wird danach kurz in Transfer-Puffer äquilibriert.

Zum Blotten wird das Transfer-Sandwich nachfolgend aus 4, in Blot- Puffer getränkten Whatman- Papieren, der Membran, dem Gel und weiteren 4, in Blot- Puffer getränkten Whatman- Papieren hergestellt. Der Transfer erfolgt für 1 ½ Stunden bei 40 mA pro Gel. Nach dem Blot wird die Membran zur Immunfärbung eingesetzt.

4.6.4 Immunfärbung mit CDP-Star (Tropix)

Zunächst wird die Membran einmal in PBS gewaschen und anschließend in Block-Puffer für 60 Minuten bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wird der 1. Antikörper verdünnt in Block-Puffer zugegeben und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Block-Puffer wird der zweite Antikörper verdünnt in Block-Puffer zugegeben (1 h RT). Nach weiterem dreimaligem Waschen mit Block-Puffer und zweimaligem Waschen mit Assay-Puffer wird die Membran aus dem Puffer genommen, in eine Plastik-Haushaltsfolie gelegt und der Puffer-Überschuß entfernt. Zur Detektion werden 0,75 ml CDP-Star Ready-to-Use Substratlösung (Tropix) auf die Membran gegeben. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wird der Überschuß entfernt und die Membran innerhalb der folgenden 2 Stunden zur Detektion eingesetzt. Zur Detektion wird ein Röntgenfilm auf die Membran aufgelegt und je nach Signalintensität 2-15 Minuten belichtet. Nach dreimaligem Waschen in PBS kann die Membran zur weiteren Auswertung in die Farbreaktion mit NBT/BCIP eingesetzt werden.

4.6.5 Färbung mit NBT/BCIP

Als Substrat werden 66 µl NBT und 33 µl BCIP-Lösung zu 10 ml Alkalische Phosphatase Puffer gegeben. Die Membran wird bei Raumtemperatur in diesem Puffer zwischen 5 und 30 Minuten inkubiert. Bei längerer Expositionszeit erfolgt die Inkubation im Dunkeln, bis die Färbung intensiv genug ist. Die Reaktion wird durch Waschen in Wasser gestoppt.

4.7 SOD-Assay nach Oberley und Spitz

Im SOD-Assay (Oberley und Spitz 1984, Spitz und Oberley 1989) wird durch Reaktion von Xanthin und Xanthin Oxidase Superoxid als Nebenprodukt freigesetzt, welches Nitroblautetrazoliumbromid (NBT) zu Formazan reduziert, das dabei eine Farbreaktion zeigt, die bei 560 nm als Absorption pro Minute detektiert werden kann. Ist SOD in dem Reaktionsansatz enthalten, so wird das gebildete Superoxid zu Wasserstoffperoxid abgebaut und die Farbreaktion inhibiert. Die Aktivität der SOD kann durch Berechnung der Inhibition ermittelt werden. Durch Zusatz von 0,4 mM Cyanid wird das Kupfer-Atom aus dem aktiven Zentrum der Cu/Zn-SOD komplexiert und das Enzym somit inaktiviert. Die restliche gemessene SOD-Aktivität repräsentiert den Gehalt an Mn-SOD. Aus der Differenz der gesamten SOD-Aktivität und der MnSOD-Aktivität läßt sich die Aktivität der SOD-1 berechnen.

Zunächst werden zwei Probenansätze hergestellt, indem je 10 µg Protein (Hirnhomogenat) mit 10 µl Katalase-Verdünnung versetzt werden und das Volumen mit Kaliumphosphatpuffer auf 90 µl eingestellt wird. Zur Messung der gesamten SOD-Aktivität werden dem einen Ansatz weitere 10 µl Phosphatpuffer zugegeben, wohingegen zur Messung der MnSOD in einem zweiten Ansatz 10 µl Cyanid-Verdünnung zugegeben werden. Anschließend werden die Proben gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wird der SOD-Reaktionspuffer frisch hergestellt und im Dunkeln bei offenem Deckel äquilibriert.

Zur Messung werden zu 800 µl des SOD-Reaktionspuffers 100 µl der Probenansätze gegeben und dann die Reaktion mit 100 µl Xanthin-Oxidase Verdünnung gestartet. Der Reaktionsansatz wird 4 Minuten bei RT vorinkubiert und anschließend die Absorption bei 560 nm für 4 Minuten gemessen. Ausgewertet wird die Steigung der Kurve in Absorption pro Minute. Als Referenz dienen je drei Leerwerte ohne Hirnhomogenat mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer mit/ohne Cyanid.

Bei der Auswertung werden die Steigungen der Meßkurven berechnet. Die Werte der Leerproben werden als Prozent Inhibition ausgedrückt und gleich Null gesetzt. Im Vergleich der Proben mit dem entsprechenden Leerwert mit/ohne Cyanid erhält man die Inhibitionswerte der Proben in Prozent, welche die Aktivität der SOD repräsentieren. Je höher der Inhibitionswert ist, desto höher ist die Aktivität des Enzyms. Aus der Differenz der Inhibition der gesamten SOD (ohne Cyanid) und der Inhibition der MnSOD (mit Cyanid) läßt sich die Aktivität der SOD-1 berechnen.

4.8 SOD-Assay mittels R&D SOD-Kit

Pro Messung werden 200 µg Protein eingesetzt und mit Wasser auf ein Volumen von 40 µl eingestellt. 900 µl Reaktionspuffer werden je Eppendorf-Gefäß vorgelegt und im Wärmeschrank bei 37°C mit offenem Deckel ca. 30 Minuten äquilibriert. Dann werden 40 µl Probe und 30 µl der Lösung R2 zugegeben, auf dem Vortex durchmischt und nochmals 1 Minute im Wärmeschrank inkubiert. Die Reaktion wird dann mit 30 µl Lösung R1 gestartet und die Absorption 2 Minuten bei 525 nm gemessen. Ausgewertet wird die Steigung Abs/Min.

Die SOD-Menge kann dann durch den Vergleich von Leerwert (mit Wasser gemessen) zu Probe in Units berechnet werden. (V_s =Wert der Probe; V_c = Leerwert)

$$[SOD] = \frac{0,93 \cdot \left| \frac{V_s}{V_c} - 1 \right|}{1,073 - 0,073 \cdot \frac{V_s}{V_c}}$$

Zur Berechnung der SOD-Konzentration wird der erhaltene Wert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und durch das eingesetzte Volumen dividiert.

Um die Mn-SOD und die Fe-SOD zu inaktivieren, werden die Proben mit Chloroform/Ethanol (37,5/62,5; bei 2-8°C) aufgereinigt, indem 400 µl des Gemisches auf 250 µl Hirnhomogenat gegeben und für 30 Sekunden mit dem Vortex durchmischt werden. Danach werden die Proben bei 10.000 rpm, 4°C für 10 Minuten (Tisch-Kühlzentrifuge 5415 R, Eppendorf) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und eingefroren bzw. zur Messung eingesetzt.

Da das eingesetzte Volumen des Hirnhomogenats dem Volumen des gewonnenen Überstandes nach Extraktion entspricht, sind die Protein-Äquivalente beider Volumina gleich. Aus diesem Grund werden zum Vergleich der Gesamtaktivität und der Aktivität der Aktivität der SOD-1 gleiche Probenvolumina vor / nach Extraktion zur Messung eingesetzt. Die Differenz beider Messungen repräsentiert die Aktivität der Mn- und Fe-SOD.

4.9 Proteinfällung mit 10 % Trichloressigsäure

Zur Bestimmung des Gehalts an Glutathion (vgl. 4.10), der Protein Oxidation (vgl. 4.14) und der Lipid Peroxidation (vgl. 4.13) werden die Homogenate mit 10 % TCA gefällt. Dazu werden 150 µl Homogenat mit 900 µl 10 %iger TCA versetzt, auf dem Vortex gemischt und 10 Minuten bei 10.000 rpm (Tisch-Kühlzentrifuge 5415R, Eppendorf) zentrifugiert. Das Pellet wird dann zur Messung der Protein Oxidation eingesetzt, wohingegen der Überstand zur Messung des Gehalts an Glutathion und der Lipid Peroxidation verwendet wird.

4.10 Glutathion

Zur Messung des Gehalts an gesamt Glutathion wird dem Reaktionsansatz Glutathion Reduktase zugeführt, welche sämtliches oxidiertes Glutathion (GSSG) unter Verbrauch von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zur reduzierten Form (GSH) umsetzt. Danach wird Ellman`s Reagenz zugesetzt, welches mit reduziertem Glutathion eine Farbreaktion zeigt, die bei 410 nm photometrisch anhand einer Eichgeraden quantifiziert werden kann.

Zur Detektion des Gehalts an oxidiertem Glutathion werden die Proben zuerst mit 2-Vinylpyridin versetzt, welches reduziertes Glutathion komplexiert, mit oxidiertem Glutathion aber keine Reaktion zeigt. Somit kann durch nachfolgende Reaktion mit Glutathion Reduktase und Ellman`s Reagenz der nicht komplexierte Teil an Glutathion bestimmt werden. Der Gehalt an reduziert vorliegendem Glutathion ist durch Differenz der Werte an gesamt Glutathion und oxidiertem Glutathion berechenbar (Hissin und Hilf 1976, Griffith 1980, Teare et al. 1993).

4.10.1 Gesamt Glutathion

Zur Messung des Gehalts an gesamt Glutathion werden 100 µl des Überstandes aus der TCA-Fällung mit 100 µl Ellman`s Reagenz und 800 µl Glutathion-Reaktionspuffer versetzt und gemischt. Nach 15 Minuten Inkubation bei RT wird die Extinktion bei 410 nm gemessen. Der Glutathion-Gehalt wird anhand einer Eichgeraden mit reduziertem Glutathion bestimmt.

4.10.2 Oxidiertes Glutathion

Zur Messung des Gehalts an oxidiertem Glutathion werden 100 µl des Überstandes aus der TCA-Fällung mit 2 µl Vinylpyridin und 6 µl Triethanolamin versetzt, gemischt und 30 Minuten bei RT inkubiert. Dann werden 100 µl Ellman`s Reagenz und 800 µl Glutathion-Reaktionspuffer zugegeben, gemischt und nach 15 Minuten Inkubationszeit bei RT wird die Extinktion bei 410 nm gemessen. Der Gehalt des oxidierten Glutathions wird anhand einer Eichgeraden mit oxidiertem Glutathion nach Behandlung mit Vinylpyridin und Triethanolamin bestimmt.

Literaturwerte:

In murinen Hirnschnitten liegt der Gehalt an Gesamt Glutathion bei ca. 300 µg/g tissue (Ali et al. 1991).

4.11 Glutathion Reduktase Assay

Glutathion Reduktase katalysiert die Umsetzung oxidierten Glutathions zur reduzierten Form unter Verwendung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Die Oxidation des $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zu NADP^+ kann bei 340 nm in Form einer Absorptions-Abnahme pro Zeit gemessen werden (Milhavet et al. 2000).

Zur Messung werden zunächst der Glutathion Reduktase-Reaktionspuffer und die Startlösung frisch hergestellt und auf Eis gelagert. Dann werden 900 μl Glutathion Reduktase-Reaktionspuffer mit 50 μl Probe (Homogenat 1:1 mit Wasser verdünnt) versetzt und 120 μl Startlösung hinzugegeben. Die Absorption pro Minute wird dann für 200 Sekunden bei 340 nm gemessen. Der Gehalt an Glutathion Reduktase wird anhand einer Eichgeraden ermittelt.

Literaturwerte:

Zur Aktivität der Glutathion Reduktase in murinen Hirnzellen existieren sehr unterschiedliche Angaben: In Primärzellkulturen von Wildtyp-Tieren liegt die Aktivität bei ca. 32 U/g Protein (White et al. 1999), wohingegen in murinen Zellen aus dem Hypothalamus (GT1-Zellen) eine Aktivität von $368,4 \pm 97,1$ U/g Protein detektiert wurde (Milhavet et al. 2000).

4.12 Glutathion Peroxidase Assay Kit

Zur Messung der Aktivität der Glutathion Peroxidase wurde ein Kit von Calbiochem verwendet. Das Messprinzip beruht darauf, daß zunächst ein zugesetztes Peroxid (hier: tert-Butylhydroperoxid) unter Verbrauch zweier Moleküle reduzierten Glutathions zum Alkohol umgesetzt wird, wobei als Nebenprodukt oxidiertes Glutathion entsteht. Dieses oxidierte Glutathion wird in einem zweiten Schritt durch zugesetzte Glutathion Reduktase wieder in die reduzierte Form überführt. In dieser Reaktion wird NADPH verbraucht, was als Abnahme der Absorption pro Zeit bei 340 nm photometrisch detektiert werden kann. Somit ist die Aktivität der Glutathion Peroxidase indirekt quantifizierbar.

Nach Herstellerangaben wird zur Vorbereitung die benötigte Menge Glutathion Peroxidase Assay-Puffer entnommen, 7,5 ml Glutathion Peroxidase Assay-Puffer zu dem NADPH Reagenz hinzugegeben und eine 1:10.000 Verdünnung tert-Butylhydroperoxid in Wasser angesetzt. Die drei Lösungen werden anschließend bei Raumtemperatur äquilibriert.

Zur Messung werden 350 μl Glutathion Peroxidase Assay-Puffer, 350 μl NADPH Reagenz und 70 μl Probenverdünnung (40 μl Hirnhomogenat plus 30 μl Glutathion Peroxidase Assay-Puffer) gemischt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 350 μl tert-Butylhydroperoxid-Verdünnung gestartet und die Absorption 3 Minuten bei 340 nm gemessen.

Die Enzymaktivitäten werden nach Herstellerangaben folgendermaßen ermittelt:

Von den gemessenen Absorptionen pro Minute wird zunächst der Wert der Nullprobe subtrahiert. Dann wird durch den Extinktionskoeffizienten von NADPH ($0,00622 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) dividiert, so daß die Aktivität die Einheit mU/ml erhält. Da die Probenverdünnung berücksichtigt werden muß, wird der erhaltene Wert mit 16 multipliziert (70 μl Probenvolumen verdünnt auf 1120 μl Meßvolumen). Um diesen

Wert in U/g Protein ausdrücken zu können, muß der berechnete Wert noch mit der eingesetzten Menge Protein verrechnet werden.

Literaturwerte:

In Primärzellkulturen von Wildtyp-Tieren wurde eine Aktivität von ca. 28 U/g Protein gemessen (White et al. 1999), wohingegen in anderen Studien in murinen Zellen aus dem Hypothalamus (GT1-Zellen) eine Aktivität von $40,4 \pm 2,6$ U/g Protein detektiert werden konnte (Milhavet et al. 2000).

4.13 Lipid Peroxidation

Lipid Peroxide reagieren mit Thiobarbitursäure unter Aufkochen zu einem purpurfarbenen Produkt, welches bei 532 nm photometrisch detektiert werden kann. Die Quantifizierung erfolgt normalerweise anhand einer Eichgeraden. Da zur Herstellung der Eichgeraden Malondialdehydbis(diethylacetal) (MDA) dient, welches in wässrigen Lösungen schwer löslich ist, ist zwar die Linearität der einzelnen Eichgeraden gegeben, jedoch die Reproduzierbarkeit bei der Herstellung der Eichwerte wenig gewährleistet. Aus diesem Grund wurde hier auf die Verwendung einer Eichgeraden verzichtet und die Absorptionen verglichen. Um die Reproduzierbarkeit gewährleisten zu können und eventuelle Tagesschwankungen der Methode zu umgehen, wurden alle zu vergleichenden Proben gleichzeitig hergestellt und gemessen (Persky et al. 2000, Slater 1984).

Zur Messung werden 750 µl Überstand aus der TCA-Fällung (vgl. 4.9.) mit 150 µl 1 %iger TBA versetzt, gemischt und 20 Minuten bei 95 °C gekocht. Anschließend werden die Proben auf Eis abgekühlt und die Extinktion bei 532 nm gemessen. Als Referenz dient eine Leerprobe aus 750 µl 10%iger TCA und 150 µl 1%iger TBA.

Literaturwerte:

Der Gehalt an Lipid Peroxiden ist in verschiedenen Hirnregionen unterschiedlich. So konnte in der Studie von Klamt et al. 2001 im Cortex von Wildtyp-Tieren ein Gehalt von 3,2 nmol/mg Protein festgestellt werden, wohingegen im Cerebellum 2,5 nmol/mg Protein detektiert wurden. In Hirnhomogenaten von Wildtyp-Mäusen wurde ein Gehalt an Lipid Peroxiden von 70 nmol/g Protein (Wong et al. 2001), bzw. von $11,3 \pm 1,7$ nmol/g tissue (Ali et al. 1991) gemessen.

4.14 Protein Oxidation

Dinitrophenylhydrazin reagiert mit Carbonylgruppen von Proteinen. Diese Reaktion kann als gelbe Färbung bei 380 nm photometrisch quantifiziert werden. Der Gehalt an Carbonylgruppen kann nach Abzug einer Nullprobe ohne Dinitrophenylhydrazin mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ nach $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ berechnet werden (Levine et al. 1990, Fagan et al. 1998, Andrus et al. 1998).

Das Pellet aus der TCA-Fällung (vgl. 4.9.) wird in 500 µl Kaliumphosphatpuffer resuspendiert und mit 500 µl DNPH-Lösung versetzt. (Eine Kontrollprobe wird nur mit 500 µl Puffer und 500 µl 2 M HCl versetzt.) Nach dem Mischen auf dem Vortex wird 30-60 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend werden die Proteine durch Zugabe von 500 µl 30%iger TCA gefällt und zentrifugiert (10.000 rpm; 4°C; 10 Minuten, Tisch-

Kühlzentrifuge 5415 R, Eppendorf). Das Pellet wird dreimal mit Ethanol/Ethylacetat gewaschen (resuspendiert; zentrifugiert; der Überstand entfernt) und schließlich in 1 ml Guanidiniumchlorid-Lösung 30-60 Minuten bei 37°C resuspendiert. Unlösliche Substanzen werden durch erneute Zentrifugation entfernt und der Überstand bei 380 nm gemessen. Die Extinktion ergibt sich aus der Differenz zwischen DNPH und HCl-Probe. Die Konzentration läßt sich aus dem Extinktionskoeffizienten ϵ ($\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) berechnen.

Literaturwerte:

In der Studie von Klamt et al. 2001 wurden in verschiedenen Hirnregionen unterschiedliche Intensitäten der Protein Oxidation detektiert. So konnten im Cortex von Wildtyp-Tieren 7 nmol oxidierten Proteins pro mg Protein gemessen werden, wohingegen der Gehalt an oxidiertem Protein im Cerebellum 170 nmol/mg Protein betrug.

4.15 Glutamin Synthetase

In dem Reaktionsansatz setzt Glutamin Synthetase zugesetztes Hydroxylamin und Glutamin unter ADP-Verbrauch zu γ -Glutamylhydroxamat um (Vorhaben et al. 1973, Radak et al. 1998, Arola et al. 1981). Nach Zugabe von Stopplösung kann der Gehalt an Hydroxamat bei 505 nm photometrisch bestimmt werden. Die genaue Berechnung der Enzymaktivität erfolgt anhand einer Eichgeraden.

Zunächst werden der Glutamin Synthetase-Reaktionspuffer und die Stopplösung hergestellt und auf Eis gelagert. Von den Proben werden pro Ansatz 10 μl Homogenat mit 190 μl Wasser verdünnt. Zur Messung werden pro Ansatz 450 μl Glutamin Synthetase-Reaktionspuffer in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt, dann 50 μl der Probenverdünnung zupipettiert, gemischt und bei 37 °C inkubiert. Die Ansätze werden nach 45 - 60 Minuten mit 500 μl der Stopplösung versetzt, gemischt und 10 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge 4515 D, Eppendorf). Der Überstand wird bei 505 nm gemessen und die entsprechende Aktivität der Probe anhand einer Eichgeraden ermittelt.

Literaturwerte:

Die Aktivität der Glutamin Synthetase beträgt in Hirnhomogenaten von Wistar-Ratten $4,66 \pm 0,55 \text{ U/mg Protein}$ (Radak et al. 1998).

4.16 Zellkultur

4.16.1 Passagieren von N2a-Zellen

Die N2a-Zellen werden in DMEM (inkl. 1g/l Glucose, 1 % Glutamat, 1 % Pen/Strep und 10 % FKS) bei 5% CO₂ und 37 °C kultiviert, bis die Kulturen subkonfluent sind. Zum Passagieren werden 0,5 ml 1 x Trypsin (10 x Trypsin 1:10 verdünnt mit Wasser) pro Kulturflasche zugegeben und 30 Sekunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Medium wird die Kultur 1:20 gesplittet. Durch die Zugabe des Mediums (durch das enthaltene FKS) wird das enthaltene Trypsin inhibiert.

4.16.2 Behandlung von N2a-Zellen mit Wasserstoffperoxid

Subkonfluente N2a-Kulturen werden für 24 Stunden mit 60 μM Wasserstoffperoxid behandelt. Anschließend wird die Zellviabilität der behandelten und nicht behandelten Kulturen mittels MTT-Assay überprüft, bzw. Lysate aus den Zellkulturen hergestellt.

4.16.3 MTT-Assay

MTT ist ein farbloses Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid), welches von lebenden Zellen per Dehydrogenasen unter Verwendung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ zum purpurfarbenen Formazan reduziert wird. Die Reduktion erfolgt nur in lebenden Zellen, so daß der Farbumschlag zur photometrischen Quantifizierung der Zellviabilität eingesetzt werden kann.

Das Medium wird mit 10 μl MTT (5 mg/ml) pro Well (pro ml) versetzt und 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wird der Überstand entfernt und das Formazan in 200 μl DMSO gelöst. Nach Zugabe von 800 μl Wasser wird die Absorption bei 570 nm gemessen. Je intensiver die Färbung, desto vitaler sind die Zellen oder desto mehr vitale Zellen sind vorhanden. Als Nullwert dient eine Probe ohne MTT mit 200 μl DMSO und 800 μl Wasser.

4.16.4 Herstellung von Lysaten aus Zellkultur

Da sich während der Behandlung mit Wasserstoffperoxid Zellen vom Kulturboden ablösen und im Medium flotieren bzw. auch tote Zellen im Medium schwimmen, wird der Kulturüberstand in einem 50 ml Falcon-Gefäß bei 1500 rpm, 20 °C für 10 Minuten (Zentrifuge 5810R, Eppendorf) zentrifugiert. Die noch adhären Zellen werden, wie zur Passagierung beschrieben, trypsiniert und nach Zugabe von 10 ml Medium ebenfalls zentrifugiert.

Zur Lysat- Herstellung werden die Zellen dreier konfluenter 100 ml Zellkulturflaschen vereint und mit 1 ml Lysepuffer A versetzt. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer 1000 μl -Pipette wird das Pellet suspendiert, bis sich eine homogene Lösung ergibt. Das Lysat wird dann in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 4°C für 5 Minuten bei 10.000 rpm (Tisch-Kühlzentrifuge 4515R, Eppendorf) zur Entfernung von Zelltrümmern zentrifugiert. Der Überstand wird in 250 μl aliquotiert, mit Stickstoff begast und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

4.17 Verwendete statistische Methoden

Zur Auswertung der gemessenen Parameter wurden die Standardabweichungen mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel berechnet.

Die Statistik-Auswertung erfolgte mit dem Statistik-Programm Statistica. Bei kleiner Stichprobenanzahl ($n < 5$) wurde der Mann-Whitney U-Test angewandt. Bei größerer Anzahl der Stichproben ($n > 5$) erfolgte die Auswertung mit dem t-Test für nicht verbundene Stichproben (Sachs, Angewandte Statistik).

4.18 Verwendete Methoden des Biochemischen Stoffwechsellabors, Hamburg

4.18.1 Ascorbat

Um die Konzentration von Ascorbat (Vitamin C) im Hirngewebe zu bestimmen, wird die Vitamin C abhängige Reduktion des Farbstoffes 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP) bei einer Absorption von 520 nm und einem pH-Wert von 3 - 4,5 gemessen (Omaye et al. 1979).

Für jede Probe werden 100 µl Hirnhomogenat mit 100 µl 10 %iger meta-Phosphorsäure und 400 µl 5 % meta-Phosphorsäure in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gemischt und bei 13000 rpm (Tischzentrifuge, Eppendorf) 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. 400 µl des Überstandes werden abpipettiert und mit 200 µl Citrat-Acetat-Puffer gemischt.

Die Proben werden mit 200 µl DCIP gemischt und die Absorption bei 520 nm 30 Sekunden nach Zugabe des Farbstoffes bestimmt.

Nach dieser Messung der Probe werden einige Kristalle Ascorbinsäure zugesetzt, bis das DCIP vollständig reduziert, also farblos ist und erneut als individuellen Probenblindwert gemessen.

Als Reagenzienblindwert dient eine Probe aus 400 µl 5%iger meta-Phosphorsäure, 200 µl Citrat-Acetat-Puffer und 200 µl DCIP, welcher ebenfalls vor und nach Zugabe von Ascorbat bei 520 nm gemessen wird.

Zur Auswertung der Proben erfolgt folgende Berechnung: $(RB - RB_{red}) - (P - P_{red})$

RB = Reagenzienblindwert
 RB_{red} = Reagenzienblindwert nach Reduktion mit Ascorbat
 P = Probenwert
 P_{red} = Probenwert nach Reduktion mit Ascorbat

Die Auswertung erfolgt anhand einer Eichgeraden, welche mit Ascorbat in 5 %iger meta-Phosphorsäure hergestellt wird. Die verschiedenen Eichproben werden, wie für die Hirnhomogenat-Proben beschrieben, gemessen.

4.18.2 alpha-Tocopherol

Die Messung des lipidlöslichen Antioxidans α -Tocopherol erfolgt mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Finck et al. 1999). Die Auswertung der Chromatogramme und die Bestimmung der Konzentration von α -Tocopherol erfolgt mit Hilfe spezieller Software. (EZChrom, Pharmacia, Schweden)

100 µl Hirnhomogenat werden mit 40 µl δ -Tocopherol (30 µmol/l) und 500 µl Hexan in einem 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen versetzt und eine Minute auf dem Vortex gemischt. Bei 13000 rpm (Tischzentrifuge, Eppendorf) wird 3 Minuten bei 4°C zentrifugiert, 400 µl aus der oberen Hexan-Phase abpipettiert und unter Stickstoff eingedampft. Der Niederschlag wird in 1000 µl Ethanol aufgenommen und 150 µl des Gemisches in die HPLC-Anlage eingespritzt.

Als Laufmittel wird Methanol, Ethanol und 2-Propanol im Verhältnis 18:5:2 (v/v) verwendet. Pro Liter des Laufgemisches werden 1,425 g Lithiumperchlorat zugegeben.

Zur Messung dient δ -Tocopherol als interner Standard. Eichlösungen werden separat hergestellt und in die HPLC-Anlage eingespritzt.

4.18.3 Fettsäuren

Die Fettsäuren werden mittels der Gas Chromatographie mit Flame Ionisation Detection (GC-FID) unter hohen Temperaturen (250-300 °C) gemessen (Kontush et al. 1996). Zur Stabilisierung der Fettsäuren bei diesen Temperaturen werden die Fettsäuren nach der Extraktion aus dem Plasma methyliert. Um die Messung der Gesamtfettsäuren durchzuführen, werden die Fettsäuren von den Lipiden durch Hydrolyse abgespalten. Die Gesamtfettsäuren setzen sich aus der Summe des Gehaltes von insgesamt 23 Fettsäuren zusammen (14:0, 16-1 n-9, 16:1 n-7, 16:0, 18:3 n-6, 18:2 n-6, 18:1 n-9, 18:1 n-7, 18:3 n-3, 18:0, 20:4 n-6, 20:5 n-3, 20:3 n-6, 20:2, n-6, 20:1 n-9, 20:3 n-3, 20:0, 22:6 n-3, 22:4 n-6, 22:5 n-3, 22:2 n-6, 22:1 n-9, 22:0). Es werden jeweils die gesättigten, einfach ungesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren zusammengefaßt und ihr Anteil an den Gesamtfettsäuren prozentual errechnet.

Zur Extraktion, Hydrolyse und Methylierung werden 100 μ l Hirnhomogenat mit 100 μ l Heptadekansäure (200mg/dl), 25 μ l BHT (0,1M), 2000 μ l Chloroform/Methanol (2:1) (v/v) und 200 μ l Acetylchlorid in einem Pyrex-Röhrchen versetzt, eine Minute auf dem Vortex gemischt und bei 80°C eine Stunde inkubiert. Es wird ca. 250 μ l der oberen Toluolphase abgenommen und unter Stickstoff abgedampft. Der Niederschlag wird in 20 μ l Toluol aufgenommen. Die Probenapplikation erfolgt durch aufziehen von 1 μ l Toluol, 1 μ l Luft, 2 μ l Probe und 1 μ l Luft in einer Spritze und anschließender Einspritzung in die GC-MS-Anlage.

Die Konzentration der Fettsäuren wird mit Hilfe spezieller Software HP ChemStation ermittelt. Der Gesamtfettsäuregehalt setzt sich aus der Summe des Gehaltes von insgesamt 23 Fettsäuren zusammen (14:0, 16-1 n-9, 16:1 n-7, 16:0, 18:3 n-6, 18:2 n-6, 18:1 n-9, 18:1 n-7, 18:3 n-3, 18:0, 20:4 n-6, 20:5 n-3, 20:3 n-6, 20:2, n-6, 20:1 n-9, 20:3 n-3, 20:0, 22:6 n-3, 22:4 n-6, 22:5 n-3, 22:2 n-6, 22:1 n-9, 22:0). Es werden jeweils die gesättigten, einfach ungesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren zusammengefaßt und ihr Anteil an den Gesamtfettsäuren prozentual errechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung und Überprüfung der verwendeten Methoden

5.1.1 Methodenüberprüfung durch Messung unterschiedlicher Proteinmengen

Zur Überprüfung der verwendeten Methoden wurden unterschiedliche Mengen Protein bzw. Hirnhomogenat in die Assays eingesetzt. Zur Kontrolle auf eventuelle Nebenreaktionen oder interne Fehler wurden den Homogenaten definierte Mengen des entsprechenden Enzyms zugesetzt und die Wiederfindung überprüft.

5.1.1.1 Superoxid Dismutase- Assay nach Oberley und Spitz

Im SOD-Assay (Oberley und Spitz 1984, Spitz und Oberley 1989) wird durch Reaktion von Xanthin und Xanthin Oxidase Superoxid als Nebenprodukt freigesetzt, welches Nitroblautetrazoliumbromid (NBT) zu Formazan reduziert. Die Reduktion zu Formazan kann anhand einer Farbreaktion bei 560 nm als Absorption pro Minute detektiert werden. Ist SOD in dem Reaktionsansatz enthalten, so wird das gebildete Superoxid zu Wasserstoffperoxid abgebaut und die Farbreaktion inhibiert. Durch Zusatz von 0,4 mM Cyanid wird das Kupfer-Atom aus dem aktiven Zentrum der Cu/Zn-SOD komplexiert und das Enzym somit inaktiviert. Die restliche gemessene SOD-Aktivität repräsentiert den Gehalt an Mn-SOD.

Die Aktivität der SOD wird in Prozent Inhibition ausgedrückt. Dazu wird ein Referenzwert ohne Hirnhomogenat mit Kaliumphosphatpuffer gleich Null Prozent Inhibition gesetzt und die Werte der Proben mit Hirnhomogenat mit dem Referenzwert verrechnet.

5.1.1.1.1 Der Cyanid-Effekt

Bei der Messung verschiedener Referenzwerte (Puffer mit und ohne Cyanid) zeigten die Proben mit Cyanid höhere Werte der Steigungen (Steigungen in Absorption pro Minute) als die Proben ohne Cyanid, so daß die Basis zur Berechnung der Mn-SOD im Vergleich zur gesamten SOD verschoben ist. Somit ergibt sich ein Problem bei der Auswertung, welches in einem Beispiel näher erläutert werden soll:

Es wurden zwei Referenzwerte (Puffer mit und ohne Cyanid) sowie die entsprechenden Proben mit Hirnhomogenat (10 µg Protein mit und ohne Cyanid) nach Vorschrift zur SOD-Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

	Abs/Min	% Inhibition Basis ohne Cyanid	% Inhibition bei paarweise mit und ohne Cyanid verrechneten Werten	Standard- abweichung % Inhibition Basis ohne Cyanid	Standard- abweichung % Inhibition bei paarweise verrechneten Werten
Puffer	0,0183	0,00	0,00	0,00	0,00
Puffer + 0,4 mM Cyanid	0,0210	-14,68	0,00	8,06	0,00
Hirnhomogenat	0,0120	34,28	34,28	14,82	14,82
Hirnhomogenat + 0,4 mM Cyanid	0,0179	2,05	14,59	17,47	10,46

Tabelle 1: SOD-Werte mit/ohne Cyanid und entsprechende Auswertung der Inhibition bei Verwendung unterschiedlicher Basiswerte mit und ohne Cyanid. Erläuterungen siehe Text. (n = 6)

Zur Auswertung wurden die Gesamt-SOD-Aktivität und die Mn-SOD-Aktivität der Proben mit Hirnhomogenat zunächst in Bezug auf die Referenz ohne Cyanid berechnet und danach zur Berechnung der Mn-SOD-Aktivität die Referenz mit Cyanid verwendet (vgl. Tabelle 1: paarweise mit und ohne Cyanid verrechnete Werte).

Im Vergleich beider Berechnungen ergab sich, daß unter Verwendung der Referenz ohne Cyanid falsch-niedrige oder sogar negative (Daten nicht gezeigt) Mn-SOD Werte entstanden. Somit ist eine Auswertung durch alleinigen Bezug auf die Referenz ohne Cyanid unzulässig.

Da zur Berechnung der gesamten SOD und der Mn-SOD unterschiedliche Basisreaktionen zugrundeliegen, wurde versucht, die Inhibition durch Cyanid zu umgehen und andere Methoden zur Trennung der SOD-1 und der Mn-SOD zu etablieren.

5.1.1.1.2 Behebung des Cyanid-Effekts

Das in dem SOD-Assay zugegebene Cyanid inhibiert nicht nur die kupferabhängige SOD-1, sondern auch Häm-haltige Enzyme der Atmungskette wie die Cytochrom Oxidase. Die Unterbrechung der Atmungskette hat eine zusätzliche Freisetzung von Superoxid-Radikalen zur Folge. Somit kann diese Eigenschaft des Cyanids die mögliche Ursache für die erhöhte Basisreaktion darstellen (Spitz und Oberley 1989).

Da aber in Referenzproben, welche keine Bestandteile der Atmungskette enthalten, nach Cyanid-Zugabe eine höhere Absorption pro Minute festgestellt wurde, können auch Inhaltsstoffe des Puffers diese Nebenreaktionen verursachen.

Zur Überprüfung dieses Sachverhaltes wurden die Proben nach Spitz und Oberley (1989) mit Thenoyltrifluoraceton (TTA) und Bathocuproinsulfonat (BCS) inkubiert. Diese Chelatoren sollen die Atmungskette komplett blockieren und so die zusätzliche Bildung von Superoxidradikalen verhindern und die Nebenreaktion beheben.

Des Weiteren wurde der Einfluß der Kupfer-Konzentration im Reaktionspuffer auf die Basisreaktion näher untersucht. Dazu wurde dem Reaktionspuffer in einem Ansatz Kupfersulfat zugesetzt, wohingegen in einem zweiten Ansatz Schwermetallionen durch Aufreinigung über Säulenmaterial (Chelex) aus dem Puffer entfernt wurden. Zusätzlich wurde getestet, ob die störenden Ionen mit EDTA komplexiert werden können.

		Abs/Min	Standard-abweichung
Puffer	1	0,0162	0,00106
Puffer + 0,4 mM Cyanid	2	0,0201	0,00110
Puffer + 0,5 mM BCS	3	0,0221	0,00508
Puffer + 0,5 mM BCS + 0,4 mM Cyanid	4	0,0267	0,00808
Puffer + 20 mM TTA + 0,4 mM Cyanid	5	0,0175	0,00095
Puffer + 100µM Cu	6	0,0133	0,00282
Puffer + 10 mM EDTA	7	0,0063	0,00226
Puffer nach Aufreinigung mit Chelex	8	0,0159	0,00012
Puffer + 0,4 mM Cyanid nach Aufreinigung mit Chelex	9	0,0185	0,00274
Puffer + 100µM Cu nach Aufreinigung mit Chelex	10	0,0176	0,00167
Puffer + 10 mM EDTA nach Aufreinigung mit Chelex	11	0,0169	0,00135

Tabelle 2: SOD-Werte: Puffer mit verschiedenen Chelatoren und unter verschiedenen Bedingungen (vor/ nach Aufreinigung mit Chelex). (n = 3)

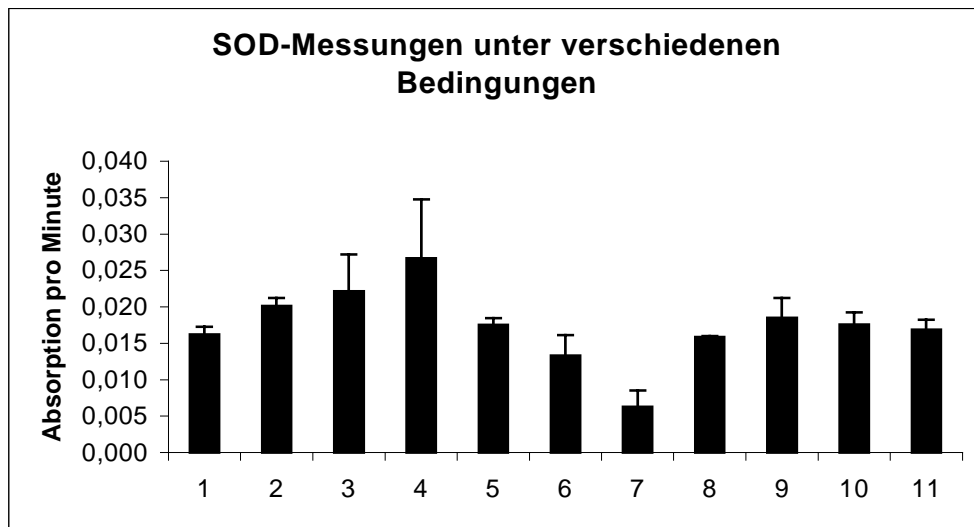


Abbildung 6: Graphische Darstellung der Werte aus Tabelle 2. Messungen verschiedener Proben mit unterschiedlichen Bedingungen. (n = 3) \pm Standardabweichung

In Abbildung 6 ist die bereits beschriebene Veränderung der Basisreaktion nach Cyanid-Zugabe erkennbar (Proben 1 und 2 : Puffer mit und ohne Cyanid). Auch nach Zugabe des Chelators Bathocuproinsulfonat bleibt der Cyanid-Effekt bestehen (Proben 3 und 4: Puffer mit BCS mit und ohne Cyanid).

Versetzt man den Puffer mit Kupfersulfat bzw. mit EDTA (Proben 6 und 7), so sind Abnahmen der Absorption pro Minute, also eine Inhibition der Reaktion zu beobachten. Nach Aufreinigung mit Chelex sind die Hemmeffekte durch Kupfersulfat und EDTA-Zugabe beseitigt (Proben 10 und 11), jedoch ist weiterhin ein Ansteigen der Absorption pro Minute nach Cyanid-Zugabe zu verzeichnen (Proben 8 und 9).

Anhand dieser Daten ist erkennbar, daß in Anwesenheit von Ionen die Reaktion des SOD-Assays gestört wird und der Cyanid-Effekt durch Zugabe von Chelatoren (BCS) nicht behoben werden kann. Da SOD sowie EDTA Kupfer in der zweiwertigen Form binden, stellt der Effekt mit EDTA möglicherweise einen nicht-enzymatischen Abbaumechanismus von Superoxid dar. Nach Aufreinigung mit Säulenmaterial sind zwar die Hemmeffekte durch EDTA und Kupfersulfat beseitigt, der Cyanid-Effekt in den Puffer-Proben jedoch bleibt bestehen.

Aus diesem Grund wurden weitere Methoden zur Trennung der SOD-1 und Mn-SOD getestet.

5.1.1.1.3 weitere Verfahren zur Trennung von SOD-1 und Mn-SOD

5.1.1.1.3.1 SOD-Kit von R&D

In dem SOD-Kit von R&D wird die Trennung von SOD-1 und Mn-SOD durch Chloroform/Ethanol-Fällung empfohlen. SOD-1 wird extrahiert und in einem zweiten Ansatz gemessen. Anschließend wird der Gehalt an Mn-SOD aus der Differenz beider Messungen (gesamt SOD und SOD-1) berechnet.

Um die Vollständigkeit der Extraktion zu überprüfen, wurden Proben vor und nach Extraktion zum Western Blot eingesetzt.

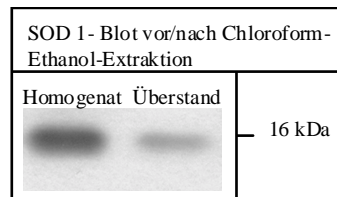


Abbildung 7: Die Extraktion erfolgte, wie im Methodenteil beschrieben (vgl. 4.8.). Es wurden gleiche Probenvolumina des Hirnhomogenats vor und des Überstandes nach Extraktion in den Western Blot eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit einem polyklonalen anti-SOD-1 Schaf Antikörper und einem zweiten Antikörper Esel-anti-Schaf Alkalische Phosphatase gekoppelt. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, ist die Aufreinigung unvollständig und ein Großteil an SOD wird nicht extrahiert.

Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, konnte nur ein geringer Anteil der ursprünglichen SOD-1 im Überstand nach Extraktion detektiert werden. Somit ist diese Trennung von SOD-1 und Mn-SOD unvollständig.

5.1.1.1.3.2 Immunpräzipitation

Weiterhin wurde versucht, die SOD-1 aus dem Homogenat zu präzipitieren. Zur Überprüfung der Effizienz dieser Methode wurde der Gehalt an SOD-1 im Überstand nach Präzipitation im Western Blot kontrolliert.

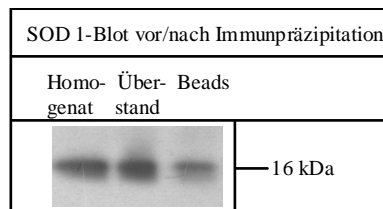


Abbildung 8: Zur Immunpräzipitation (IP) wurden 50 µl Hirnhomogenat mit 20 µl Protease Inhibitor Mix (1 Tablette complete von Roche in 1,5 ml Wasser), 330 µl PBS, 6 µl anti-SOD-1 Ak von Europa Research Products (Kaninchen-anti-SOD-1, polyklonal) und 20 µl Protein A-Agarose von Boehringer versetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C auf dem Rollrad. Für den Western Blot wurde die Verdünnung des Homogenats der Verdünnung der Präzipitations-Ansätze angepaßt, so dass äquivalente Probenmengen aufgetragen wurden. Im Western Blot erfolgte die Detektion mit einem polyklonalen anti-SOD-1 Schaf Antikörper und einem zweiten Antikörper Esel-anti-Schaf Alkalische Phosphatase gekoppelt. Wie in der Abbildung zu erkennen ist, ist die Präzipitation unvollständig, da ein Großteil des Enzyms noch im Überstand enthalten ist. Homogenat = angepaßte Probenverdünnung des Hirnhomogenats vor IP; Überstand = Überstand nach IP; Beads = präzipitierte SOD

Es konnte jedoch im Western-Blot gezeigt werden, daß die Präzipitation nur unvollständig gelang.

Da die Trennung der SOD-1 und der Mn-SOD weder durch Extraktion noch durch Immunpräzipitation in zufriedenstellendem Maße gelungen ist, konnte keine alternative Methode zu der Iibition mit Cyanid etabliert werden.

5.1.1.1.4 Verwendete Methode zur SOD-Messung

Trotz der Untersuchung verschiedener Methoden konnte kein Weg gefunden werden, die Nebenreaktionen der SOD-Messung, welche durch Inkubation mit Cyanid hervorgerufen werden, zu umgehen. Da die Methode nach Oberley und Spitz aber diejenige ist, welche reproduzierbare Daten liefert und diese Methode weit verbreitet ist (Brown et al. 1997a, Milhavet et al. 2000, Wong et al. 2000), wird dieses Messverfahren für die weiteren Untersuchungen verwendet. Da die Berechnung der Mn-SOD in Bezug auf den Referenzwert ohne Cyanid auch negative Inhibitionswerte liefert (Daten nicht gezeigt), erfolgte die Auswertung unter Verwendung des jeweiligen Bezugswertes mit und ohne Cyanid.

5.1.1.1.5 Sensitivität des SOD-Assays

Zur Überprüfung der verwendeten Methode wurden unterschiedliche Mengen Enzym zur SOD-Aktivitätsbestimmung eingesetzt.

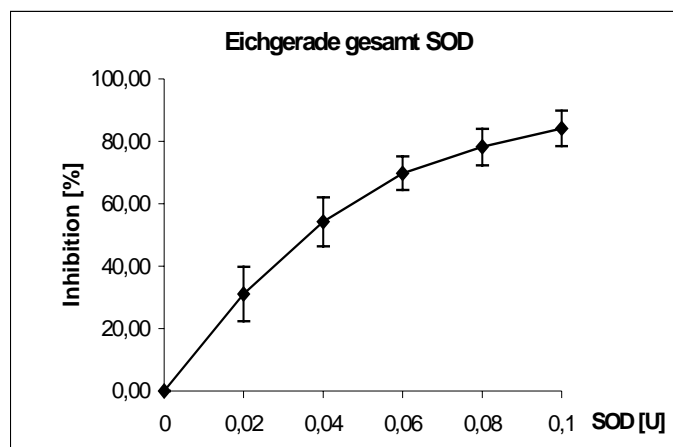


Abbildung 9: Eichgerade mit verschiedenen eingesetzten SOD-Mengen. Experimente erfolgten in Dreifachbestimmung. \pm Standardabweichung

Anhand der SOD-Eichgeraden in Abbildung 9 ist zu erkennen, daß ab einer Inhibition von ca. 60 Prozent der lineare Bereich der Kurve endet. Um Unterschiede in den Proben sensitiv bestimmen zu können, ist es daher sinnvoll, die Messungen innerhalb des linearen Bereiches unterhalb 60 Prozent Inhibition durchzuführen.

Da aber Tagesschwankungen der Basisreaktion auftreten, welche durch die unterschiedliche Sauerstoffsättigung in dem Puffer und damit durch die unterschiedliche Menge an gebildeten Superoxidradikalen bedingt sind, wurden zur Vergleichbarkeit der Proben pro Messung 10 μ g Protein eingesetzt und die Messungen zu vergleichender Proben gleichzeitig durchgeführt. Letzteres Problem konnte durch Nutzung des Specord S-100 (Analytik Jena) gelöst werden, da das Gerät bis zu zehn Probenkinetiken gleichzeitig messen kann.

Die weitere Überprüfung dieses Assays zur Messung von Probenmaterial erfolgte anhand Wasserstoffperoxid-behandelter und unbehandelter N2a-Zellen (vgl. 5.1.2.2.).

5.1.1.2 Glutathion

Zur Messung des Gehalts an gesamt Glutathion wird dem Reaktionsansatz Glutathion Reduktase zugeführt, welche sämtliches oxidiertes Glutathion (GSSG) unter Verbrauch von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zur reduzierten Form (GSH) umsetzt. Danach wird Ellman`s Reagenz zugesetzt, welches mit reduziertem Glutathion eine Farbreaktion zeigt, die bei 410 nm photometrisch anhand einer Eichgeraden quantifiziert werden kann.

Zur Detektion des Gehalts an oxidiertem Glutathion werden die Proben zuerst mit 2-Vinylpyridin versetzt, welches reduziertem Glutathion komplexiert, mit oxidiertem Glutathion aber keine Reaktion zeigt. Somit kann durch nachfolgende Reaktion mit Glutathion Reduktase und Ellman`s Reagenz der nicht komplexierte Teil an Glutathion bestimmt werden. Der Gehalt an reduziert vorliegendem Glutathion ist durch Differenz der Werte an gesamt Glutathion und oxidiertem Glutathion berechenbar (Hissin und Hilf 1976, Griffith 1980, Teare et al. 1993).

5.1.1.2.1 Gesamt Glutathion

Die Überprüfung zur Messung des Gehalts an gesamt Glutathion erfolgte durch Zugabe unterschiedlicher Mengen Überstand aus der TCA-Fällung (vgl. 4.9.) mit und ohne Zusatz von je 0,5 μg reduzierten bzw. oxidierten Glutathions. In einem zweiten Ansatz wurde eine Eichgerade mit reduziertem Glutathion hergestellt.

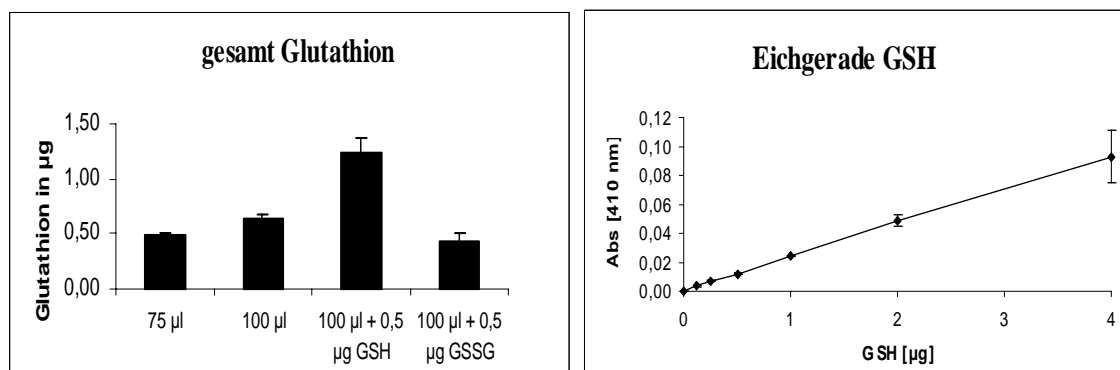


Abbildung 10: Überprüfung der Methode zur Detektion des Gehalts an gesamt Glutathion: links: Messwerte unterschiedlicher Mengen Probe mit und ohne Zusatz reduzierten (GSH) bzw. oxidierten Glutathions (GSSG). rechts: Eichgerade für reduziertes Glutathion. Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. \pm Standardabweichung

Die Eichgerade für reduziertes Glutathion zeigt mit steigender Glutathion Konzentration eine zunehmende Standardabweichung. Die gemessenen Proben befinden sich alle im linearen Bereich. Die Wiederfindung des reduzierten Glutathions ist gewährleistet, wohingegen nach Zugabe oxidierten Glutathions weniger gesamt Glutathion detektiert wird als in der Probe ohne zugesetztes Glutathion.

5.1.1.2.2 Oxidiertes Glutathion

Die Methode zur Messung des Gehalts an oxidiertem Glutathion wurde durch Zugabe unterschiedlicher Mengen Überstand aus der TCA-Fällung (vgl. 4.9) mit und ohne Zugabe von je 0,5 µg reduzierten und oxidierten Glutathions nach Inkubation mit 2-Vinylpyridin überprüft. Da die Eichgeraden aus oxidiertem Glutathion mit 2-Vinylpyridin nicht auswertbar waren, erfolgte die Auswertung anhand der Absorptionwerte.

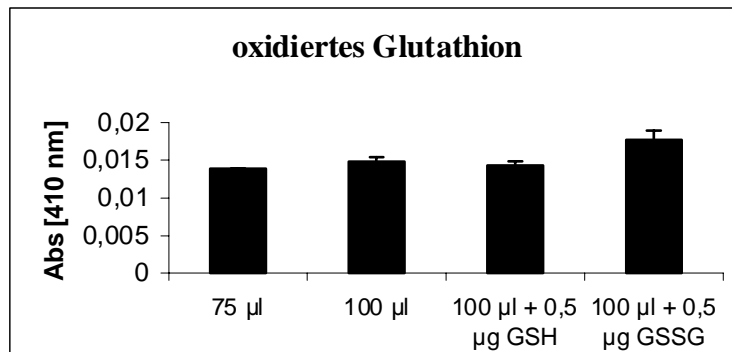


Abbildung 11: Überprüfung der Methode zur Detektion des Gehalts an oxidiertem Glutathion nach Zugabe von 2-Vinylpyridin: Messwerte unterschiedlicher Mengen Probe mit und ohne Zusatz von je 0,5 µg reduzierten (GSH) bzw. oxidierten Glutathions (GSSG). (n = 3) ± Standardabweichung

In Abbildung 11 ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben mit unterschiedlich eingesetztem Probenvolumen (75 µl und 100 µl) detektierbar. Die Probe mit zugesetztem reduziertem Glutathion zeigt keine erhöhte Absorption, wohingegen nach Zugabe oxidierten Glutathions eine Absorptionzunahme detektierbar ist.

Aufgrund der nicht auswertbaren Eichgeraden ist eine Bestimmung des genauen Gehalts an oxidiertem Glutathion nicht möglich und somit die Wiederfindung nicht überprüfbar, so daß auf die Detektion des Gehalts an oxidiertem Glutathion in den weiteren Untersuchungen verzichtet wurde.

Um den Metabolismus des Glutathions dennoch weiter untersuchen zu können, wurden Messungen der Aktivitäten von Glutathion Reduktase und Glutathion Peroxidase durchgeführt.

5.1.1.3 Glutathion Reduktase

Glutathion Reduktase katalysiert die Umsetzung oxidierten Glutathions zur reduzierten Form unter Verwendung von $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Die Oxidation des $\text{NADPH} + \text{H}^+$ zu NADP^+ kann bei 340 nm in Form einer Absorptions-Abnahme pro Zeit gemessen werden (Milhavet et al. 2000).

Die Überprüfung dieser Methode erfolgt anhand einer Eichgeraden und durch Messung verschiedener Probenkonzentrationen mit und ohne Zusatz von Enzym.

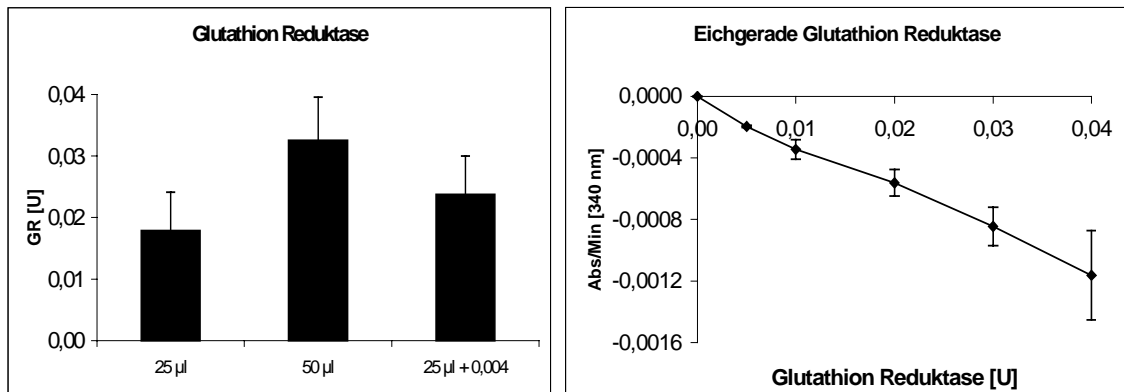


Abbildung 12: Überprüfung der Methode zur Glutathion Reduktase Aktivitätsbestimmung. links: Messwerte verschiedener Probenmengen mit und ohne Zusatz aufgereinigter Glutathion Reduktase (in U). (n = 3) ± Standardabweichung rechts: Eichgerade zur Bestimmung der Aktivität der Glutathion Reduktase. (n = 2) ± Standardabweichung

Anhand der Abbildung 12 ist erkennbar, daß die Messwerte im linearen Bereich liegen und die Wiederfindung gewährleistet ist.

5.1.1.4 Glutathion Peroxidase

Zur Messung der Aktivität der Glutathion Peroxidase wurde ein Kit von Calbiochem verwendet. Das Messprinzip beruht darauf, daß zunächst ein zugesetztes Peroxid (hier: tert-Butyl Hydroperoxid) unter Verbrauch zweier Moleküle reduzierten Glutathions zum Alkohol umgesetzt wird, wobei als Nebenprodukt oxidiertes Glutathion entsteht. Dieses oxidierte Glutathion wird in einem zweiten Schritt durch zugesetzte Glutathion Reduktase wieder in die reduzierte Form überführt. In dieser Reaktion wird NADPH verbraucht, was als Abnahme der Absorption pro Zeit bei 340 nm photometrisch detektiert werden kann. Somit ist die Aktivität der Glutathion Peroxidase indirekt quantifizierbar.

Um die Wiederfindung und Proportionalität dieses Assays zu überprüfen, wurden verschiedene Mengen Protein mit und ohne Enzymzugabe gemessen. Zur Auswertung wurde das empfohlene Verfahren des Herstellers (vgl. 4.12) verwendet.

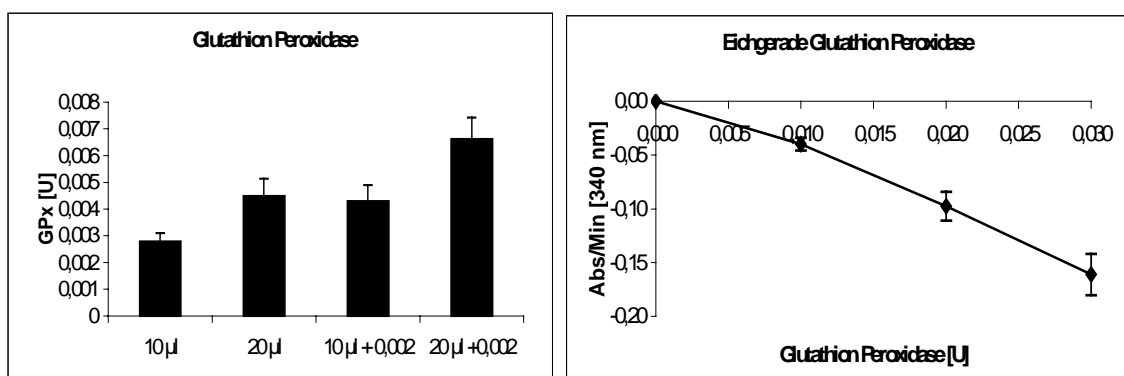


Abbildung 13: Überprüfung der Glutathion Peroxidase-Messung. links: Aktivität verschiedener Probenkonzentrationen mit und ohne Zusatz von Enzym. rechts: Eichgerade zur Bestimmung der Aktivität der Glutathion Peroxidase. (n = 2) ± Standardabweichung

In Abbildung 13 ist erkennbar, daß sich die gemessenen Werte im linearen Bereich befinden und die Wiederfindung gewährleistet ist.

5.1.1.5 Lipid Peroxidation

Lipid Peroxide reagieren mit Thiobarbitursäure unter Aufkochen zu einem purpurfarbenen Produkt, welches bei 532 nm photometrisch detektiert werden kann. Die Quantifizierung erfolgt normalerweise anhand einer Eichgeraden. Da zur Herstellung der Eichgeraden Malondialdehydbis(diethylacetal) (MDA) dient, welches in wässrigen Lösungen schwer löslich ist, ist zwar die Linearität einzelner Eichgeraden, jedoch nicht die Reproduzierbarkeit der Eichwerte gewährleistet. Aus diesem Grund wurde hier auf die Verwendung einer Eichgeraden verzichtet und die Absorptionswerte verglichen. Um weitere Reproduzierbarkeit gewährleisten zu können und eventuelle Tagesschwankungen der Methode zu umgehen, wurden alle zu vergleichenden Proben gleichzeitig hergestellt und gemessen (Persky et al. 2000, Slater 1984).

Die Überprüfung dieser Methode erfolgte anhand Wasserstoffperoxid-behandelter und unbehandelter N2a-Zellen (vgl. 5.2.6).

5.1.1.6 Protein Oxidation

Dinitrophenylhydrazin reagiert mit Carbonylgruppen von Proteinen. Diese Reaktion kann als gelbe Färbung bei 380 nm photometrisch quantifiziert werden. Der Gehalt an Carbonylgruppen kann nach Abzug einer Nullprobe ohne Dinitrophenylhydrazin mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten $\epsilon = 22000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ nach $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ berechnet werden (Levine et al. 1990, Fagan et al. 1998, Andrus et al. 1998).

Zur Überprüfung dieser Methode wurde in Zellkultur getestet, ob nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid ein messbarer Effekt auftritt (vgl. 5.2.7).

5.1.1.7 Glutamin Synthetase

In dem Reaktionsansatz setzt Glutamin Synthetase zugesetztes Hydroxylamin und Glutamin unter ADP-Verbrauch zu γ -Glutamyl-hydroxamat um (Vorhaben et al. 1973, Radak et al. 1998, Arola et al. 1981). Nach Zugabe von Stopplösung ($\text{FeCl}_3 / \text{HCl} / \text{TCA}$) kann der Gehalt an Hydroxamat bei 505 nm photometrisch bestimmt werden. Die genaue Berechnung der Enzymaktivität erfolgt anhand einer Eichgeraden.

Zur Überprüfung der Sensitivität wurden 25 bzw. 40 μg Protein zur Messung eingesetzt. Weiterhin wurden den jeweiligen Proteinmengen 0,01 U Glutamin Synthetase zur Überprüfung der Wiederfindung zugesetzt und eine Eichgerade aus verschiedenen Mengen Glutamin Synthetase hergestellt.

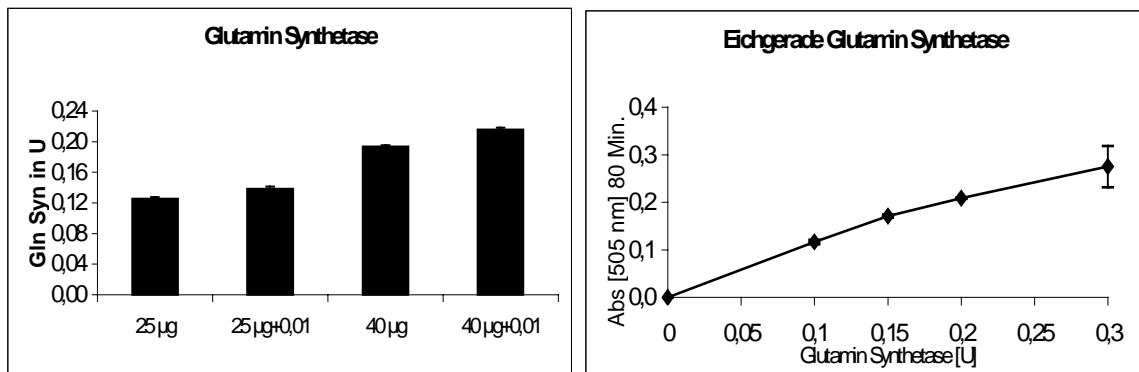


Abbildung 14: Überprüfung der Methode zur Bestimmung der Aktivität der Glutamin Synthetase. links: Messung unterschiedlicher Proteinmengen mit und ohne Zusatz des Enzyms. rechts: Eichgerade Glutamin Synthetase. (n = 3) ± Standardabweichung

Die gemessenen Aktivitäten der Glutamin Synthetase liegen im linearen Bereich, wobei die Standardabweichung der Eichgerade mit steigender Konzentration zunimmt. Die Wiederfindung in den Proben mit zugesetzter Glutamin Synthetase ist gewährleistet.

5.1.2 Methodenüberprüfung durch Messungen in N2a-Zellen

Zur weiteren Überprüfung der Methoden, ob oxidativer Stress gemessen werden kann, wurden N2a- Zellen (Maus Neuroblastoma-Zellen aus dem Primatenzentrum Göttingen, vgl. 3.11.) mit 60 µM Wasserstoffperoxid für 24 Stunden inkubiert. Zunächst wurde die Zellviabilität mittels MTT-Assay überprüft. Die Zellysate wurden in die jeweiligen Methoden in gleicher Proteinkonzentration wie die Hirnhomogenate eingesetzt.

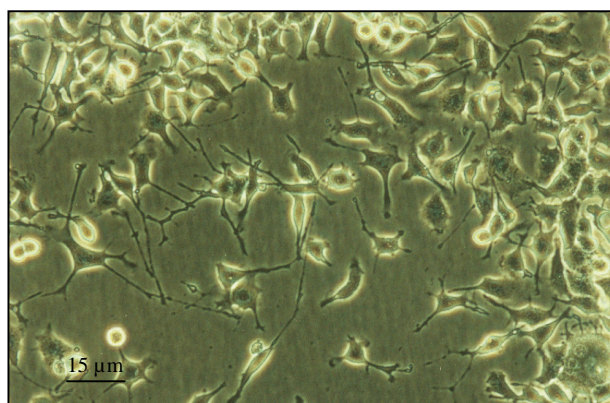


Abbildung 15: N2a-Zellen 200 fach vergrößert. Die Ausläufer der Zellen sind deutlich in dieser semikonfluenter Kultur zu erkennen.

5.1.2.1 MTT-Assay

Zur Messung der Zellviabilität wurden subkonfluente N2a-Kulturen mit 60 μM Wasserstoffperoxid für 24 Stunden versetzt. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium durch HBSS ersetzt, welches 0,05 mg/ml MTT enthielt. Nach 1 Stunde Inkubationszeit bei 37 °C wurde das gebildete Formazan in DMSO gelöst und photometrisch bei 570 nm quantifiziert.

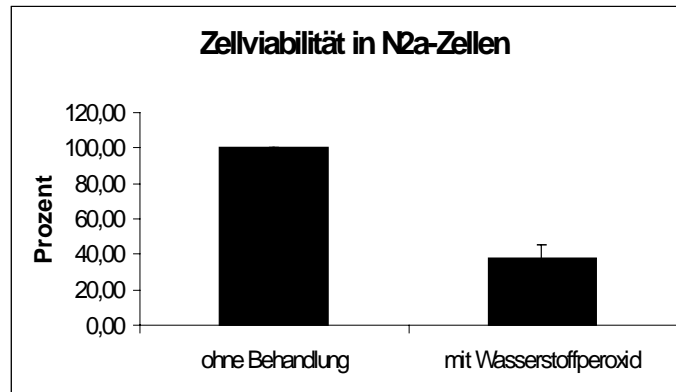


Abbildung 16: MTT-Assay in N2a-Zellen nach Behandlung mit 60 μM Wasserstoffperoxid bzw. Kontrolle ohne Behandlung. (n = 3) \pm Standardabweichung (p < 0,05)

In Abbildung 16 nimmt die Zellviabilität nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid deutlich (um mehr als 60 Prozent) ab. Durch das Wasserstoffperoxid wurde oxidativer Stress in den Zellen induziert, welcher in den folgenden Messungen deutlich nachweisbar sein sollte.

5.1.2.2 SOD-Assay

In den SOD-Assay wurden, wie im Methodenteil beschrieben, 10 μg Protein pro Messung eingesetzt. Durch Inkubation mit Cyanid wurde die SOD-1 inhibiert und die restliche Aktivität als Mn-SOD gemessen.

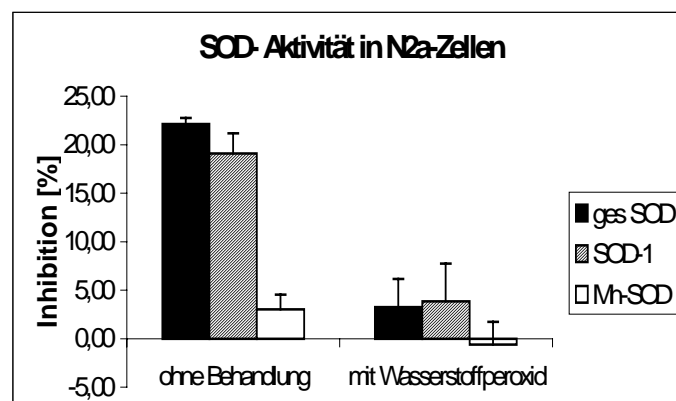


Abbildung 17: SOD-Messung an N2a-Zellen mit und ohne Wasserstoffperoxid-Behandlung bzw. mit und ohne Inhibition durch Cyanid. (n=3, p < 0,05) . \pm Standardabweichung

In Abbildung 17 ist ein starker Rückgang an SOD-Aktivität nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid zu verzeichnen. Der Mn-SOD Wert mit Wasserstoffperoxid liegt außerhalb des Meßbereichs und erscheint als negativer Wert. Da sich die SOD-1 aus den Differenzen zwischen gesamt SOD und Mn-SOD berechnet, erscheint der Wert der SOD-1 höher zu sein als der Wert der gesamt SOD.

Superoxidradikale werden durch die SOD zu Wasserstoffperoxid abgebaut. Somit kann die Ursache für den Rückgang der SOD-Aktivität nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid eine Endprodukthemmung sein. Ein weiterer Grund kann sein, daß das Peroxid durch seine oxidativen Eigenschaften die SOD irreversibel geschädigt hat oder das Protein in geschädigten Zellen bereits degradiert wurde.

5.1.2.3 Glutathion

Zur Messung des gesamt Glutathion Gehalts wurden mit Wasserstoffperoxid behandelte N2a-Zellen und Kontrollproben ohne Wasserstoffperoxid lysiert, die Lysate nach Vorschrift mit 10% TCA gefällt und der Überstand zur Messung eingesetzt. Die Umrechnung erfolgte anhand einer Eichgeraden.

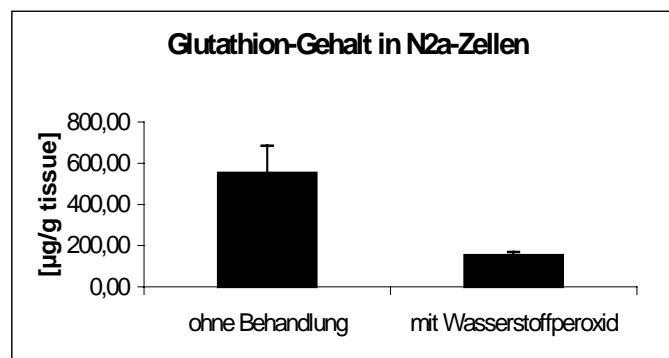


Abbildung 18: Messung des gesamt Gutathion Gehalts an unbehandelten und mit Wasserstoffperoxid behandelten N2a-Lysaten. (n=3, $p < 0,05$) \pm Standardabweichung

Der gesamt Glutathion Gehalt in behandelten N2a-Zellen nimmt deutlich ab. Dies kann darauf zurückzuführen sein, daß Glutathion bei Auftreten oxidativen Stresses verbraucht wurde oder daß während des Zelltodes intrazelluläre Komponenten degradiert werden.

5.1.2.4 Glutathion Reduktase

Zur Messung der Glutathion Reduktase Aktivität wurden 250 µg Protein aus Lysaten von Kontrollproben und behandelten N2a-Zellen nach Vorschrift eingesetzt.

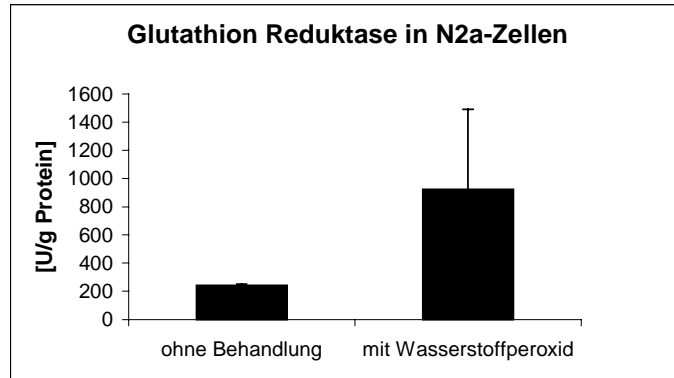


Abbildung 19: Messdaten zur Aktivitätsbestimmung der Glutathion Reduktase Aktivität in unbehandelten und mit Wasserstoffperoxid behandelten Lysaten aus N2a-Zellen. (n=3, p<0,05) ± Standardabweichung

In Abbildung 19 ist ein signifikanter ($p < 0,05$) Anstieg der Glutathion Reduktase Aktivität nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid nachweisbar. Dieser Effekt ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß reduziertes Glutathion unter Auftreten oxidativen Stresses zur Regulierung des oxidativen Haushalts benötigt und durch erhöhte Glutathion Reduktase Aktivität regeneriert wird.

5.1.2.5 Glutathion Peroxidase

Die Untersuchung der Glutathion Peroxidase Aktivität erfolgte mit Hilfe eines käuflichen Kits von Calbiochem. Pro Messung wurden 400 µg Protein aus Lysaten Wasserstoffperoxid-behandelter und nicht behandelter N2a-Zellen eingesetzt. Die Durchführung der Methode erfolgte wie im Methodenteil beschrieben.

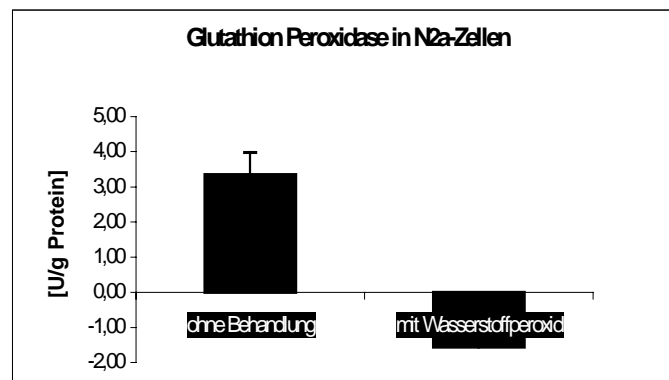


Abbildung 20: Messdaten zur Bestimmung der Glutathion Peroxidase Aktivität nach Angaben des Herstellers (Calbiochem) in N2a-Lysaten mit und ohne Wasserstoffperoxid-Behandlung. (n = 3, p < 0,05) ± Standardabweichung

Die Aktivität der Glutathion Peroxidase nimmt nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid deutlich ab, was durch Degradation von Proteinen in bereits abgestorbenen Zellen verursacht worden sein kann. Da aber die Aktivität der Glutathion Reduktase nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid erhöht ist, ist ein Verlust zellulärer Komponenten unwahrscheinlich, da in diesem Fall auch die Glutathion Reduktase eine verringerte Aktivität zeigen müßte.

5.1.2.6 Lipid Peroxidation

Die Lysate behandelter und unbehalteter N2a-Zellen wurden nach Vorschrift mit 10 % TCA gefällt und der Überstand zur Messung eingesetzt.

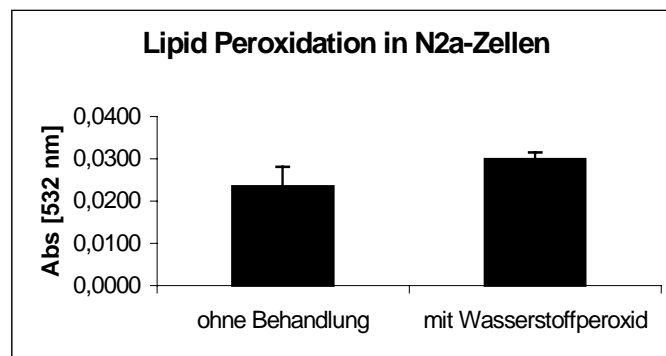


Abbildung 21: Messung der Lipid Peroxidation (TBARS) in TCA-gefällten Lysaten unbehalteter und mit Wasserstoffperoxid behalteter N2a-Zellen. (n=3, $p < 0,1$) \pm Standardabweichung

Der Gehalt an Lipid Peroxiden ist nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid erhöht. Somit ist oxidativer Stress in den behalteten Proben nachweisbar.

5.1.2.7 Protein Oxidation

Die Lysate unbehalteter und mit Peroxid inkubierter N2a-Zellen wurde nach Vorschrift mit 10 % TCA gefällt und das Pellet zur Messung des Gehalts an oxidiertem Protein verwendet.

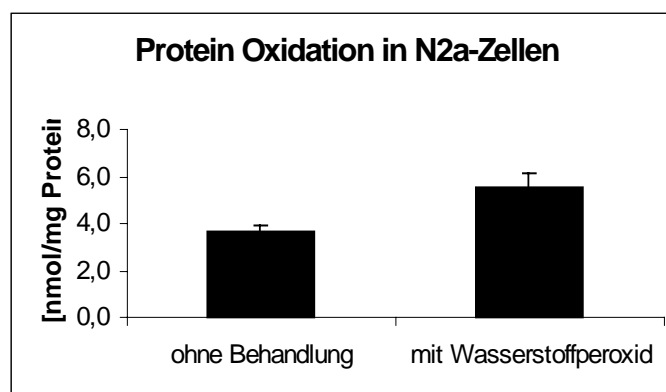


Abbildung 22: Protein Oxidation in Zelllysaten behalteter N2a-Zellen und Kontrollproben. (n=3, $p < 0,05$) \pm Standardabweichung

Die Konzentration an oxidiertem Protein erhöht sich durch Zugabe von Wasserstoffperoxid. Somit ist ein weiterer Indikator für oxidativen Stress sensitiv und signifikant nachweisbar.

5.1.2.8 Glutamin Synthetase

Von den Lysaten behandelter und unbehalteter N2a-Zellen wurden je 25 µg Protein pro Messung eingesetzt. Die Messung wurde, wie im Methodenteil beschrieben, von je drei Proben in Dreifachbestimmung durchgeführt.

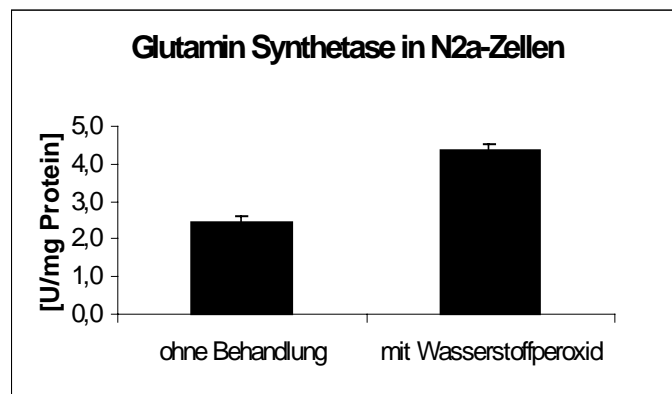


Abbildung 23: Messungen der Glutamin Synthetase Aktivität in unbehandelten N2a-Zellen und Zellen nach Inkubation mit 60 µM Wasserstoffperoxid. (n=3, p < 0,05) ± Standardabweichung

Die Aktivität der Glutamin Synthetase steigt durch Zugabe von Wasserstoffperoxid an. Eine mögliche Erklärung dieses Sachverhaltes ist durch den Abbau von Proteinen während oxidativer Einflüsse gegeben. Beim Auftreten oxidativen Stresses werden Proteine oxidativ geschädigt (siehe Abbildung 22). Als Reaktion auf diese Schädigung werden defekte Proteine abgebaut, wobei Ammoniumionen freigesetzt werden. Es ist möglich, daß die Aktivität der Glutamin Synthetase zur Entgiftung dieser Ionen erhöht wird.

In allen verwendeten Methoden konnte ein Unterschied zwischen den Proben ohne Behandlung und den Zellen, welche Wasserstoffperoxid ausgesetzt waren, festgestellt werden. Sämtliche angewandte Methoden sind demnach zur weiteren Verwendung für die Untersuchung der transgenen Tiere sowie für die Scrapie-Zeitverlaufsstudie geeignet.

Die Messungen in N2a-Zellen sollten lediglich zur Überprüfung der Methoden dienen. Die Zellen wurden aufgrund ihres schnellen Wachstums, also der Verfügbarkeit größerer Materialmengen in relativ geringen Zeiträumen, ausgewählt.

Zur korrekten Prüfung oxidativen Stresses in Bezug auf die physiologische Funktion des Prionproteins wäre eine Untersuchung in Primärzellkultur unter Einfluß mit Wasserstoffperoxid bzw. dem neurotoxischen Peptid (PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶) nötig gewesen.

Da jedoch zur Messung aller Parameter sehr viel Material nötig ist und zur Herstellung der Primärzellkulturen die Tierzucht um ein Vielfaches verstärkt werden müßte, wurde aufgrund der begrenzten Kapazität der Tierhaltungsräume auf die Durchführung der Experimente in Primärzellkultur verzichtet.

5.2 Zelluläres Prionprotein (PrP^c) und antioxidative Mechanismen

Aufgrund der potentiellen antioxidativen Eigenschaft des zellulären Prionproteins wird in PrP-knockout-Mäusen ein verringerter Schutz vor oxidativen Einflüssen erwartet, so daß in diesen Tieren erhöhter oxidativer Stress messbar sein sollte. Da die potentielle antioxidative Funktion des Prionproteins wahrscheinlich mit der Kupferbindung des Proteins einhergeht, wurde getestet, ob in Tieren, welchen die kupferbindende Oktapeptid-Region fehlt (C4-Tiere), Veränderungen im antioxidativen Status detektierbar sind. Zur Überprüfung, ob die postulierten Effekte mit der An- bzw. Abwesenheit des Prionproteins zusammenhängen und nicht durch artifizielle Reaktionen in transgenen Tieren verursacht werden, erfolgte die Messung Prionprotein-überexprimierender Tiere (Tg35), welche auf PrP-knockout-Hintergrund das Prionprotein überexprimieren (vgl. 3.10.). Des Weiteren wurden zur Überprüfung der physiologischen Funktion des Prionproteins Tiere mit weitgreifend verkürztem Prionprotein, welche Ataxie und Gewichtsverlust zeigen (E57- und F35-Tiere), gemessen (vgl. 5.2.3.).

Vor Messung der unterschiedlichen transgenen Mauslinien wurden die Tiere auf Expression des erwarteten (verkürzten) Prionproteins überprüft.

5.2.1 Überprüfung der enthaltenen Transgene

Die Hirne drei Monate alter transgener Tiere (Wildtyp, PrP^{0/0}, C4, Tg35; E57, F35) wurden 1 : 10 in Lysepuffer sonifiziert, zentrifugiert, der Überstand aliquotiert und nach Begasung mit Stickstoff bei -80°C eingefroren. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden die Proben zunächst im Western Blot überprüft, ob auch das richtige (deletierte) Prionprotein exprimiert wurde.

Wildtyp-Tiere (C57 BL x 129 Sv) exprimieren normales PrP. PrP^{0/0}-Tieren wurden Teile des PrP-Gens entfernt und durch ein Neomycinresistenzgen ersetzt, so daß diese Tiere kein PrP exprimieren. C4-Tiere zeigen ein Prionprotein, welches um die Aminosäuren 32-93 verkürzt ist, wohingegen das Prionprotein in E 57-Tieren um AS 32-121 und bei F35-Tieren um AS 32-134 verkürzt ist. Tg35-Tiere produzieren ca. 5 x mehr PrP als eine Wildtyp-Maus (vgl. 3.10).

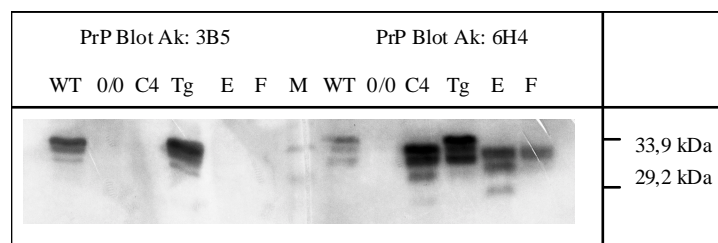


Abbildung 24: Western Blot zur Untersuchung transgener Tiere. Die Detektion erfolgte mit dem 3B5-Maus Antikörper (bindet AS 68-84) (links) und dem 6H4-Maus-Antikörper (bindet AS 144-152) (rechts). Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Maus-Antikörper Alkalische Phosphatase gekoppelt von Dianova verwendet. Es folgte eine Anfärbung mit NBT/BCIP. WT = Wildtyp; 0/0 = PrP^{0/0}; C4 = C4; Tg = Tg35; E = E57; F = F35; M = Längenstandard; Ak = Antikörper

Abbildung 24 zeigt das typische 3- Banden- Muster des Prionproteins (unglykosylierte Form ca. 30 kDa, einfach glykosyliert und doppelt glykosyliert zwischen 30 und 40 kDa). Wildtyp- und Tg35-Tiere zeigen mit beiden Antikörpern das gleiche Bandenmuster, wohingegen bei PrP^{0/0}- Tieren erwartungsgemäß keine Banden für das Prionprotein zu sehen sind. C4-, E57- und F35-Tiere zeigen keine Reaktion mit dem 3B5-Antikörper (AS 68-84), da das Epitop dieses Antikörpers deletiert ist. Mit dem Antikörper 6H4 (AS 144-152) jedoch reagieren auch diese transgenen Linien. Weiterhin ist zu erkennen, daß die Bandenstärke in den transgenen Tieren deutlich größer ist als in Wildtyp-Tieren. Dies ist ein Hinweis darauf, daß in den transgenen Tieren das Prionprotein überexprimiert ist.

Mit Hilfe des Western Blots konnte gezeigt werden, daß die Tiere das erwartete (deletierte) Prionprotein exprimieren. Die Hirnhomogenate wurden zur weiteren Analyse in die verschiedenen Methoden eingesetzt.

5.2.2 Untersuchungen an Wildtyp-, PrP^{0/0}-, C4- und Tg35- Tieren

Zunächst wurden vier verschiedene transgene Linien auf das Auftreten oxidativen Stresses untersucht. Da es Hinweise gibt, daß PrP knockout-Tiere sensibler auf oxidativen Stress reagieren als Wildtyp-Tiere (Brown et al. 1997a) und somit das Vorhandensein des Prionproteins vor oxidativen Schäden schützen soll, wurden diese Tiere auf den Status repräsentativer antioxidativer Schutzmechanismen getestet. Tg35-Tiere produzieren ein Vielfaches an Prionprotein, so daß diese Tiere besonders gut gegen oxidative Einflüsse gewappnet sein sollten, was ein Vergleich mit den anderen Linien interessant werden läßt. Zusätzlich wurden C4-Tiere getestet, da die Deletion der Aminosäuren 32-93 die Oktapeptidregion des PrP betrifft (AS 23-98). Da die Oktapeptidregion für die Kupferbindung und somit für die antioxidativen Eigenschaften des Prionproteins verantwortlich sein soll (Brown et al. 1999), könnte eine Deletion dieser Region Einfluß auf den oxidativen Status der Tiere haben.

5.2.2.1 SOD-Assay

Zur Messung der SOD-Aktivität wurden 10 µg Protein nach Vorschrift (vgl. 4.7.) eingesetzt und die Aktivität unter Bezug der jeweiligen Referenzprobe als Prozent Inhibition ausgedrückt. Es wurden je drei Messungen an sechs verschiedenen Tieren durchgeführt.

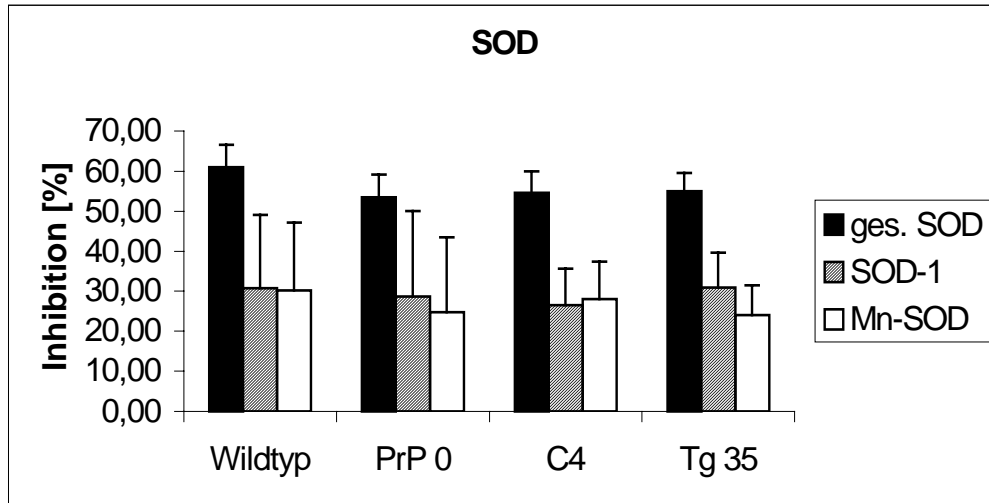


Abbildung 25: SOD-Aktivität transgener Tiere im Vergleich. (n = 6) ± Standardabweichung

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Linien festgestellt werden. Auch die Aktivitäten der SOD-1 und Mn-SOD zeigen in allen Tieren vergleichbare Ergebnisse.

5.2.2.2 Glutathion, Glutathion Reduktase und Glutathion Peroxidase

Die Messung des Glutathion-Haushalts erfolgte, wie im Methodenteil beschrieben (vgl. 4.10.). 100 μ l Überstand nach Fällung mit 10 % TCA wurden zur Glutathion-Messung eingesetzt. Zur Detektion der Reduktase-Aktivität wurden 250 μ g Protein (Hirnhomogenat) und zur Überprüfung der Peroxidase 400 μ g Protein verwendet.

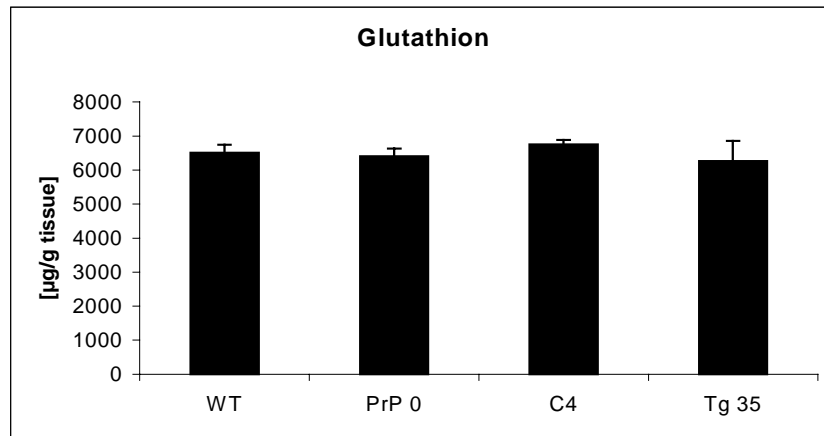


Abbildung 26: Gehalt an gesamt Glutathion in Wildtyp, PrP 0, C 4 und Tg 35-Tieren. Es wurden je sechs Tiere in Doppelbestimmung untersucht. \pm Standardabweichung

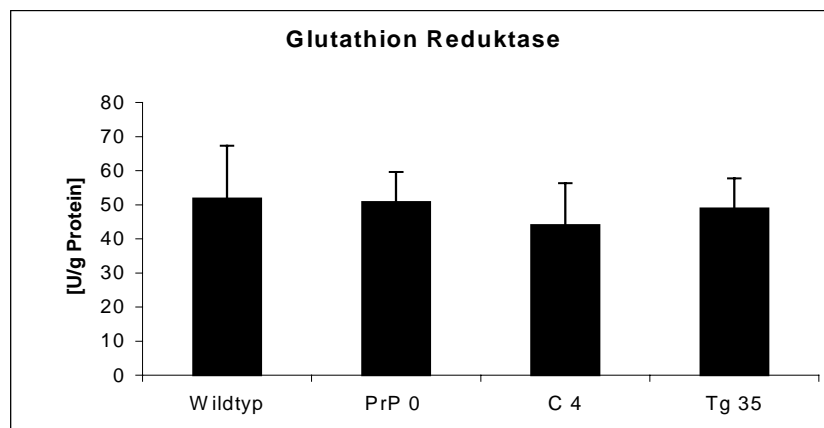


Abbildung 27: Aktivität der Glutathion Reduktase in Wildtyp, PrP 0, C 4 und Tg 35-Tieren. Es wurden je sechs Tiere in Dreifachbestimmung untersucht. \pm Standardabweichung

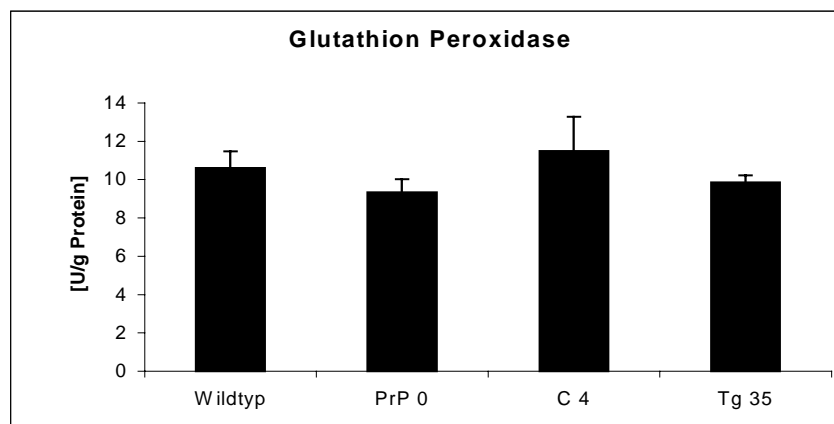


Abbildung 28: Glutathion Peroxidase Aktivität in Wildtyp, PrP 0, C 4 und Tg 35-Tieren. Es wurden je vier Tiere in Doppelbestimmung untersucht. \pm Standardabweichung

In dem Metabolismus des Glutathions konnten keinerlei signifikanten Unterschiede zwischen den Linien festgestellt werden. Weder ist der Glutathion-Spiegel verändert, noch zeigen die Aktivitäten der Glutathion Reduktase und Peroxidase Veränderungen, welche auf das Vorhandensein verschiedener Mengen des Prionproteins oder dessen Verkürzung zurückzuführen sind.

5.2.2.3 Lipid Peroxidation / Protein Oxidation

Zur Überprüfung auf detektierbare oxidative Schäden wurde das Ausmaß der Lipid Peroxidation und der Protein Oxidation gemessen. Dazu wurden 150 µl Hirnhomogenat mit 900 µl 10 % TCA gefällt, zentrifugiert und der Überstand zur Messung der Lipid Peroxidation eingesetzt, während das Pellet auf Carbonylgehalt untersucht wurde. Die Durchführung erfolgte anhand der beschriebenen Methoden (vgl. 4.13. und 4.14.). Die Untersuchung der Lipid Peroxidation wurde in Doppelbestimmung durchgeführt, wohingegen zur Messung der Protein Oxidation so viel Material benötigt wurde, daß nur eine einfache Bestimmung möglich war. Es wurden je sechs Tiere der transgenen Linien getestet.

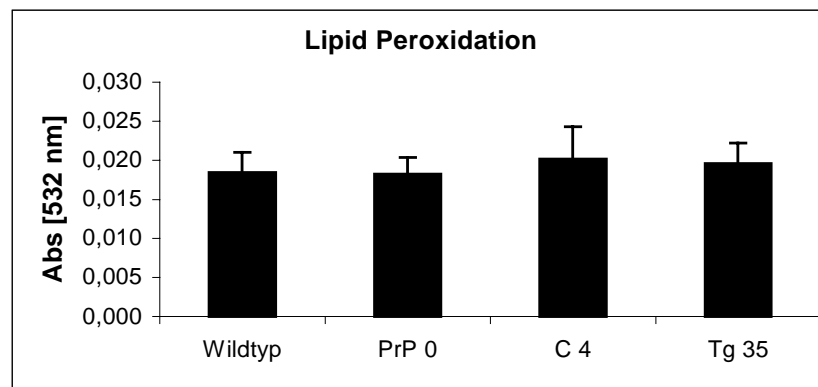


Abbildung 29: Gehalt oxidierter Lipide im Vergleich zwischen verschiedenen transgenen Linien. (n=6) ± Standardabweichung

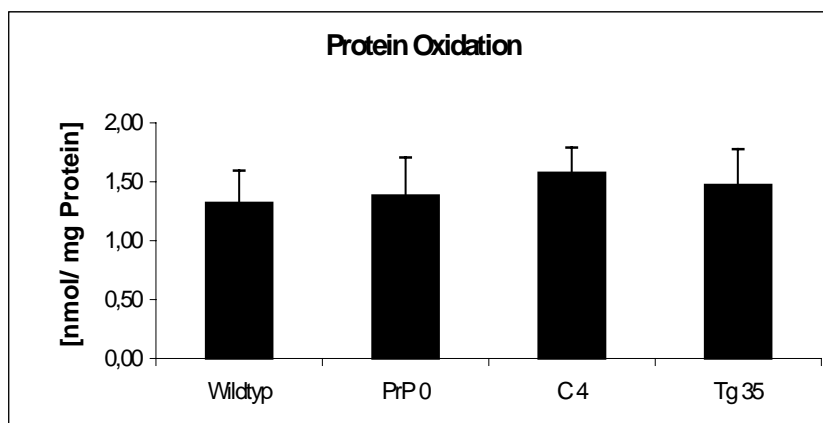


Abbildung 30: Protein Oxidation in unterschiedlichen transgenen Mauslinien. (n=6) ± Standardabweichung

Es konnten keine Hinweise auf ein unterschiedliches Ausmaß oxidativer Schäden in den verschiedenen Mauslinien gefunden werden. Die Unterschiede zwischen den Proben sind nicht signifikant.

5.2.2.4 Glutamin Synthetase

Die Aktivität der Glutamin Synthetase wurde, wie im Methodenteil beschrieben, in Hirnhomogenaten der verschiedenen transgenen Linien gemessen und als Aktivität in U pro mg eingesetztes Protein berechnet (vgl. 4.15.). Es wurden je transgener Linie sechs Tiere in Dreifachbestimmung untersucht.

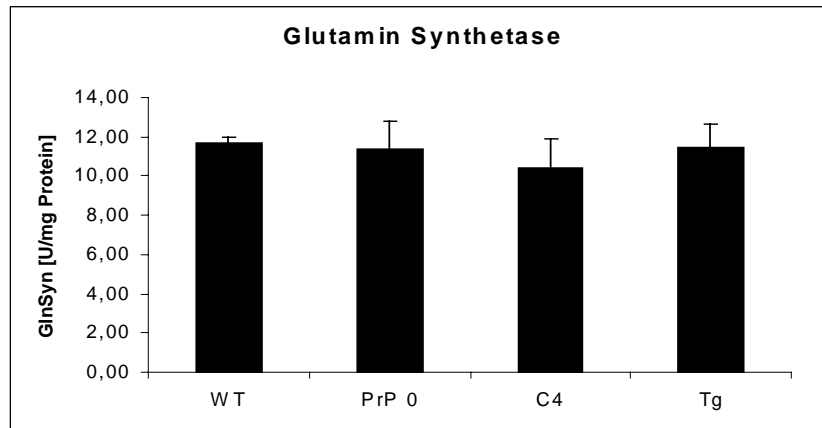


Abbildung 31: Vergleich der verschiedenen transgenen Linien in Bezug auf die Aktivität der Glutamin Synthetase. (n=6) ± Standardabweichung

Zwischen den verschiedenen transgenen Linien konnte kein signifikanter Unterschied in der Aktivität der Glutamin Synthetase festgestellt werden.

Die untersuchten Linien zeigen keine Unterschiede im oxidativen Status. Dies könnte daran liegen, daß die antioxidativen Eigenschaften des Prionproteins erst dann zur Geltung kommen, wenn vermehrter oxidativer Stress vorhanden ist. Es könnte auch sein, daß die transgenen Tiere Kompensationsmechanismen entwickelt haben, da keine der untersuchten Linien verhaltensauffällig ist oder andere Besonderheiten aufweist. Des Weiteren ist denkbar, daß die Tiere erst in fortlaufendem Alter Unterschiede im oxidativen Status aufweisen.

5.2.3 Untersuchungen an E 57- und F 35- Tieren

Zur weiteren Untersuchung der Funktion zellulären Prionproteins wurden verhaltensauffällige transgene Linien näher betrachtet. E57- und F35- Tiere zeigen im Alter von 4-6 Wochen Gewichtsverlust und Ataxie (Shmerling et al. 1998). Da die Verkürzung des Prionproteins in diesen Linien über die Verkürzung in C4-Tieren hinausgeht, diese Tiere aber keine Auffälligkeiten zeigen, ist es möglich, daß in den E- und F-Tieren eine relevante funktionelle Domäne ausgeschaltet ist. Wenn die Funktion des Prionproteins gestört und somit die potentiellen antioxidativen Eigenschaften des Proteins durch die Verkürzung beeinflusst werden, so ist ein Auftreten vermehrten oxidativen Stresses in diesen Tieren möglich. Um diesen Aspekt näher zu analysieren, wurden je vier klinisch kranke E- und F-Tiere sowie vier PrP^{0/0}- Mäuse als Kontrolle untersucht.

5.2.3.1 SOD-Assay

Die Hirnhomogenate je vier klinisch erkrankter E- und F- Tiere sowie von vier Kontrollmäusen (PrP^{0/0}) wurden vorschriftsgemäß (vgl. 4.7.) zur Untersuchung der Aktivität der Superoxid Dismutase eingesetzt. Es wurden Dreifachbestimmungen der Proben durchgeführt.

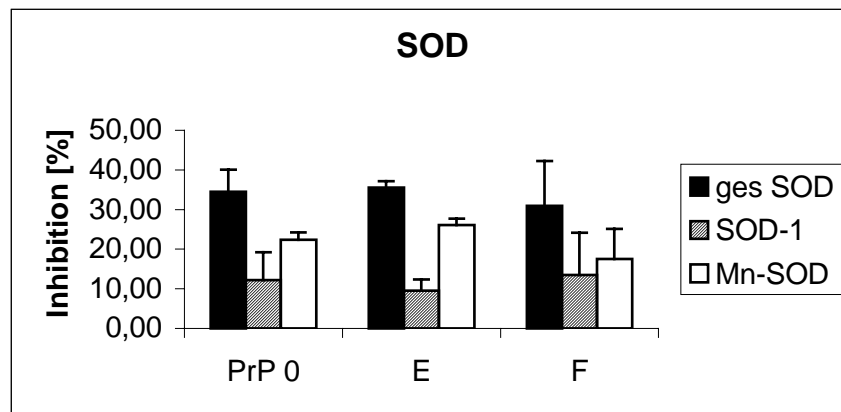


Abbildung 32: Aktivität der SOD in E- und F- Tieren. (n=4) ± Standardabweichung

Zwischen den untersuchten Proben konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Auch die Verhältnisse der verschiedenen Superoxid Dismutasen (SOD-1 und Mn-SOD) liefern keine signifikanten Unterschiede.

5.2.3.2 Glutathion-Stoffwechsel

Zur Bestimmung des Gehalts an Glutathion und der beiden Enzyme Glutathion Reduktase und Peroxidase wurden die Hirnhomogenate, wie im Methodenteil beschrieben, behandelt (vgl. 4.10., 4.11. und 4.12.). Die Messung erfolgte für Glutathion und die Glutathion Peroxidase in Doppelbestimmung, während die Glutathion Reduktase in Dreifachbestimmung quantifiziert wurde.

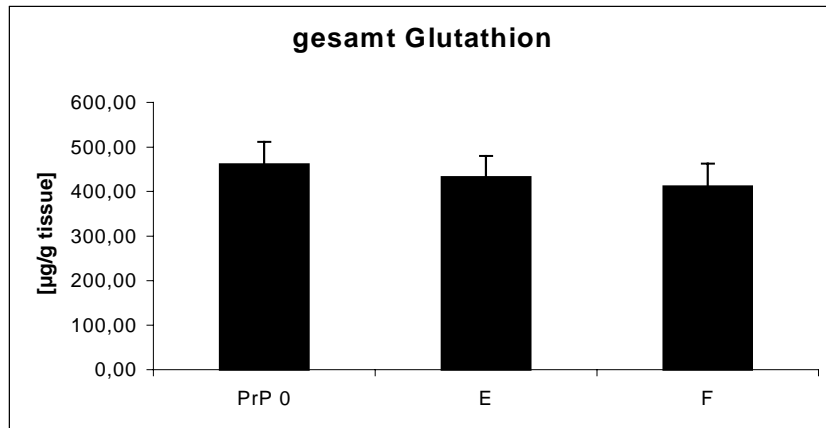


Abbildung 33: Glutathion Gehalt in E- und F- Tieren. (n=4) \pm Standardabweichung

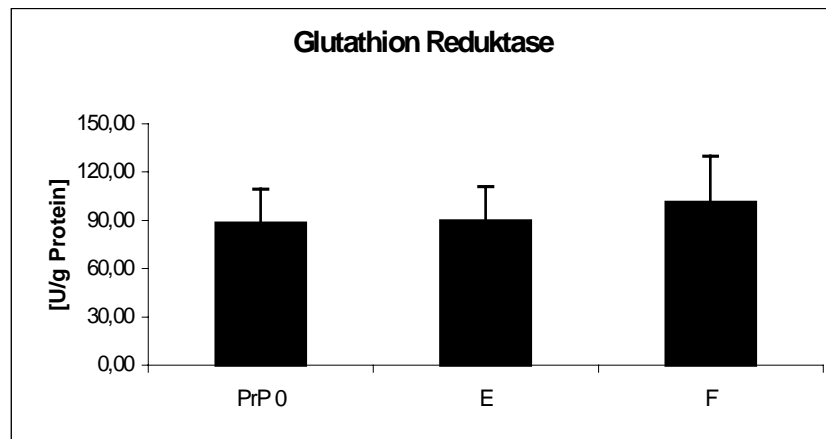


Abbildung 34: Aktivität der Glutathion Reduktase in E57- und F35- Tieren. (n=4) \pm Standardabweichung

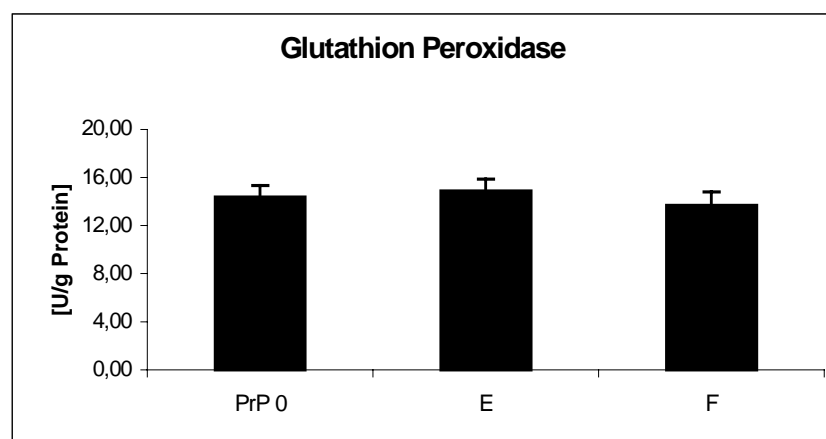


Abbildung 35: Glutathion Peroxidase-Aktivität in E57- und F35- Tieren (n=4) \pm Standardabweichung

Es wurde kein Hinweis gefunden, daß zwischen den gemessenen Proben Unterschiede in Bezug auf den Metabolismus des Glutathions vorliegen. Die gemessenen Proben zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

5.2.3.3 Lipid Peroxidation und Protein Oxidation

Um Aufschluss darüber zu erlangen, ob die auffälligen transgener Tiere vermehrte oxidative Schäden zeigen, wurden die Proben nach Vorschrift in die entsprechenden Methoden (vgl. 4.13. und 4.14.) zur Messung der Lipid Peroxidation und der Protein Oxidation eingesetzt.

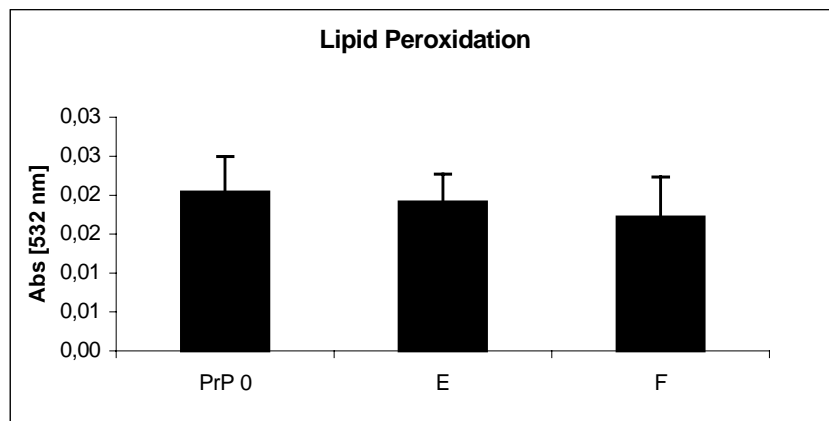


Abbildung 36: Gehalt an Lipid Peroxiden in Hirnhomogenaten ataktischer transgener Tiere mit verkürztem Prion Protein. (n=4) \pm Standardabweichung

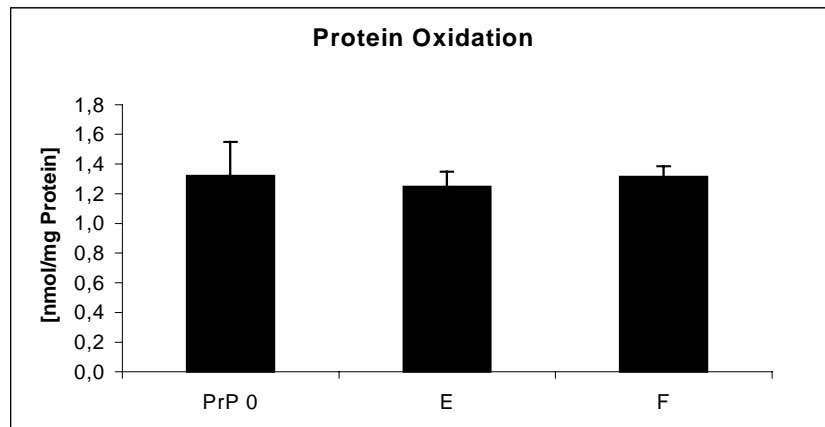


Abbildung 37: Ausmaß der Protein Oxidation in Hirnhomogenaten ataktischer transgener Tiere mit verkürztem Prion Protein. (n=4) \pm Standardabweichung

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben.

5.2.3.4 Glutamin Synthetase

Zur Bestimmung der Glutamin Synthetase-Aktivität wurden je 25 µg Protein verwendet. Gemessen wurden je vier transgene Tiere in Dreifachbestimmung.

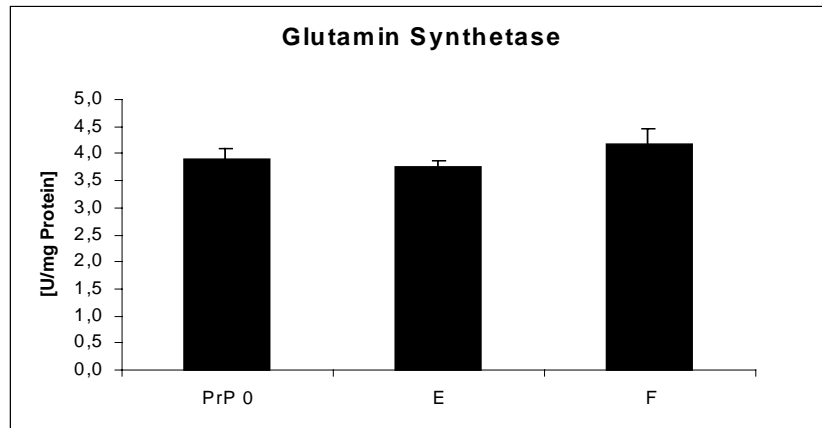


Abbildung 38: Höhe des Gehalts an Glutamin Synthetase in E- und F- Tieren. (n=4) ± Standardabweichung

Die Glutamin Synthetase ist in allen Proben in gleicher Aktivität meßbar. Signifikante Differenzen können nicht gemessen werden.

Es konnten keine Unterschiede zwischen den transgenen Linien und keine Hinweise auf vermehrten oxidativen Stress in den ataktischen E57- und F35-Tieren gefunden werden. Die Meßdaten geben somit keinen Hinweis auf eine relevante Rolle von oxidativem Stress in der Induktion der bei Mäusen der Linien E57 und F35 beobachteten Neurodegeneration.

5.2.4 Messungen im Universitätskrankenhaus Hamburg Eppendorf

Zur weiteren detaillierten Untersuchung der transgenen Tiere erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Biochemischen Stoffwechsellabor des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (unter Leitung von Frau Prof. Beisiegel) die Messung lipophiler und hydrophiler Antioxidantien (Vitamine E und C) sowie gesättigter und ungesättigter Fettsäuren.

Die Messungen erfolgten im Rahmen einer medizinischen Dissertation von Arian Sultan unter Betreuung von Dr. med. Sönke Arlt.

Je eine Hemisphäre der untersuchten transgenen Tiere wurde mit Lysepuffer B versetzt und mit einem Potter-Homogenisator in Glaspistillen nach Vorschrift (vgl. 4.2.) homogenisiert. Die eingefrorenen Proben wurden dann zur weiteren Bearbeitung nach Hamburg gesendet.

5.2.4.1 Hydrophile Antioxidantien: Ascorbat (Vitamin C)

Zur Messung des Gehalts an Ascorbat wurden je sechs Tiere der Linien Wildtyp (WT), PrP^{0/0}, C4 und Tg35 sowie je vier Tiere der Linien E57 und F35 nach Vorschrift (vgl. 4.18.1.) gemessen.

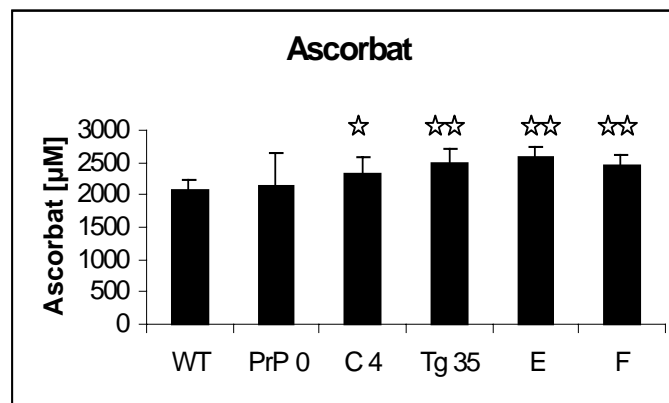


Abbildung 39: Gehalt an Vitamin C in Hirnhomogenaten transgener Tiere. Es wurden je sechs Tiere der Linien Wildtyp (WT), PrP^{0/0}, C4 und Tg 35 sowie je vier Tiere der Linien E57 und F35 gemessen. ± Standardabweichung; ☆ = p < 0,05 vs. WT, ☆☆ = p < 0,01 vs. WT

Die Messungen des Gehalts an Ascorbat zeigen signifikante Unterschiede zwischen C4, Tg35, E57 und F35-Tieren in Bezug auf Wildtyp-Tiere. Da die signifikanten Unterschiede in allen Tieren detektiert werden, welche das Prionprotein überexprimieren, kann hier ein durch das enthaltene Transgen vermittelter Effekt vorliegen. Aufgrund der fehlenden Unterschiede zwischen den einzelnen transgenen Linien ist es wahrscheinlich, daß der Effekt nicht auf das Vorhandensein unterschiedlich trunkierter Prionproteine zurückzuführen ist.

Da Mäuse Ascorbat selbst produzieren können, ist es möglich, daß die Tiere auf oxidativen Stress durch endogene Produktion dieses Antioxidans reagieren. Die vorliegenden Daten geben jedoch keinen Hinweis auf spezifische PrP-vermittelte Veränderungen im antioxidativen Haushalt der Tiere.

5.2.4.2 Lipophile Antioxidantien: α -Tocopherol (Vitamin E)

Der Gehalt an α -Tocopherol wurde nach Vorschrift (vgl. 4.18.2.) in je sechs Tieren der transgenen Linien Wildtyp (WT), PrP^{0/0}, C4 und Tg35 sowie in je vier Tieren der Linien E57 und F35 gemessen.

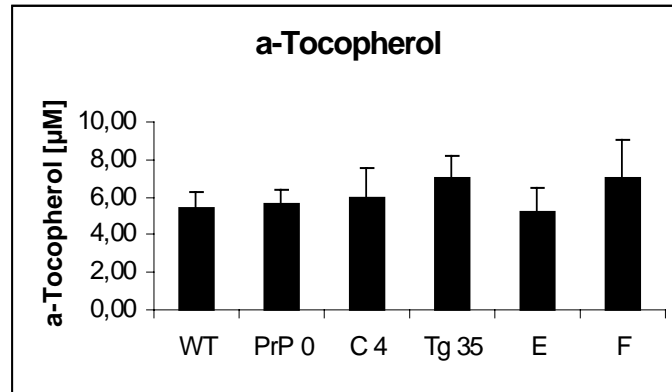


Abbildung 40: Gehalt an Vitamin E in Hirnhomogenaten transgener Tiere. Es wurden je sechs Tiere der Linien Wildtyp (WT), PrP^{0/0}, C4 und Tg 35 sowie je vier Tiere der Linien E57 und F35 gemessen. \pm Standardabweichung; ☆ = p < 0,05 vs. WT, ☆☆☆ = p < 0,01 vs. WT

In den Messungen des Gehalts an α -Tocopherol wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben detektiert.

5.2.4.3 Fettsäuregehalt

Der Gesamtfettsäuregehalt und der Anteil der gesättigten, einfach ungesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren wurde in den transgenen Tieren nach Vorschrift (vgl. 4.18.3.) untersucht.

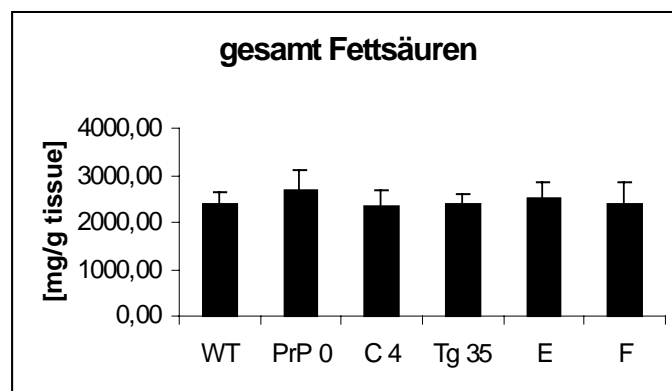


Abbildung 41: Fettsäuregehalt in Hirnhomogenaten transgener Tiere. Es wurden je sechs Tiere der Linien Wildtyp (WT), PrP^{0/0}, C4 und Tg 35 sowie je vier Tiere der Linien E57 und F35 gemessen. \pm Standardabweichung; ☆ = p < 0,05 vs. WT, ☆☆☆ = p < 0,01 vs. WT

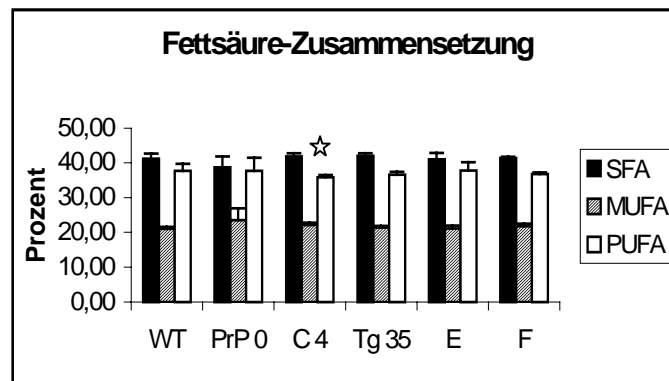


Abbildung 42: Fettsäure-Zusammensetzung in Hirnhomogenaten transgener Tiere. Es wurden je sechs Tiere der Linien Wildtyp (WT), PrP^{0/0}, C4 und Tg 35 sowie je vier Tiere der Linien E57 und F35 gemessen. ± Standardabweichung; ☆ = p < 0,05 vs. WT, ☆☆ = p < 0,01 vs. WT, SFA = gesättigte Fettsäuren, MUFA = einfach ungesättigte Fettsäuren, PUFA = mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Im Gesamtfettsäuregehalt der gemessenen Tiere sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar. In C4-Tieren ist der Gehalt an einfach ungesättigten Fettsäuren in Bezug auf Wildtyp-Tiere signifikant (p < 0,05) erhöht. Da die Unterschiede jedoch sehr gering sind, ist ein Effekt aufgrund der PrP-Expression unwahrscheinlich. In den restlichen Proben konnten keine signifikanten Unterschiede in der Fettsäure-Zusammensetzung festgestellt werden. Insbesondere war bei keinem der transgenen Tiere der Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, Hauptsubstrat der Lipid Peroxidation, verändert.

Da vorzugsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren durch freie Radikale unter Bildung von Lipid Peroxiden angegriffen werden (vgl. 1.5.4.2.), erfolgte durch die Messungen der Fettsäurezusammensetzung und des Gehalts an Lipid Peroxiden (vgl. 5.2.2.3. und 5.2.3.3.) die Untersuchung des Substrats und des Endproduktes der Lipid Peroxidation. Durch die Detektion des wichtigsten lipophilen Antioxidans (α -Tocopherol), welches die Lipid Peroxidation verhindern kann (vgl. 1.5.1.) und des wichtigsten hydrophilen Antioxidans (Vitamin C) welches α -Tocopherol regeneriert und somit weiteren Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) darstellt, erfolgte eine detaillierte Untersuchung der Lipid Peroxidation in Hirngewebe transgener Tiere.

Die Messungen der verschiedenen Parameter (Ascorbat, α -Tocopherol, gesättigte, einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte Fettsäuren) ergaben somit keine Hinweise auf eine antioxidative Funktion des zellulären Prionproteins.

5.3 Oxidativer Stress und Scrapie-Pathogenese

Einhergehend mit der 'loss of function'-Hypothese ist es möglich, daß die potentielle antioxidative Eigenschaft des Prionproteins während der Infektion verloren geht und oxidativer Stress auftritt. Des Weiteren können durch die Aktivierung von Mikroglia durch PrP^{Sc} im Sinne der 'gain of function'-Hypothese vermehrt Superoxidradikale freigesetzt werden, wodurch ebenfalls oxidativer Stress verursacht wird.

Zur Aufklärung dieser Zusammenhänge wurde in einer Scrapie-Zeitverlaufsstudie das Auftreten oxidativen Stresses untersucht.

5.3.1 Western Blot- Untersuchung auf Proteinase K-resistentes PrP

Die infektiöse Form des Scrapie-Agens ist gegen Verdau mit Proteinase K resistent, so daß ein sensitiver Nachweis infektiösen Materials möglich ist. Um die zunehmende Menge der PK-resistenten Form des Prionproteins im Infektionsverlauf zu zeigen, wurden die Proben für 1 Stunde bei 37 °C mit 50 µg/ml Proteinase K verdaut. Zusätzlich wurden Kontrollproben ohne PK angesetzt und zur Western Blot Analyse verwendet.

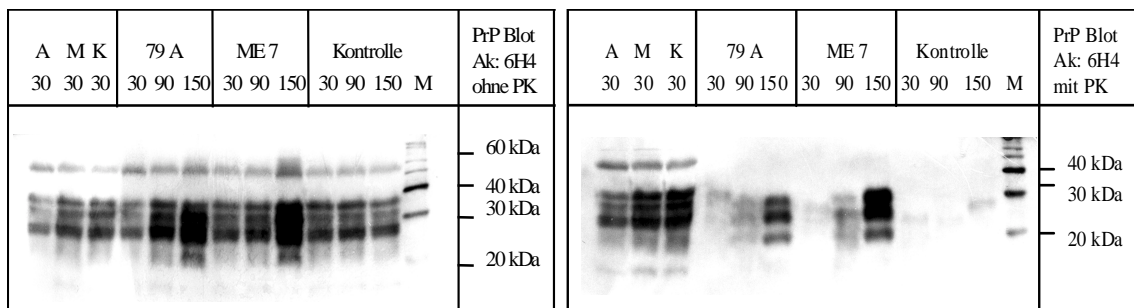


Abbildung 43: Western Blot Analyse auf PK-resistentes PrP. Linkes Bild: Proben 30, 90 und 150 Tage nach Infektion mit den Scrapie-Stämmen ME 7 und 79 A plus Kontrolle ohne Infektion ohne PK-Verdau. A = 79 A, M = ME 7, K = Kontrolle. AMK = unverdaute Kontrollen, 30 Tage nach Infektion (links im Bild). Rechtes Bild: gleiche Reihenfolge wie links, aber nach Inkubation mit PK (50 µg/ml, 1 Stunde bei 37 °C). Die Detektion erfolgte mit dem 6H4-Maus-Antikörper (AS 144-152). Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege- anti-Maus-Antikörper, alkalische Phosphatase gekoppelt von Dianova verwendet. Die Färbung erfolgte mit NBT/BCIP.

In Abbildung 43 ist das typische Bandenmuster für PrP erkennbar. Unglykosyliertes Protein liegt bei 30 kDa, einfach glykosyliertes und doppelt glykosyliertes Prionprotein zwischen 30 und 40 kDa. Zusätzlich ist eine Bande bei ca. 60 kDa zu erkennen, welche dimeres Prionprotein zeigt. Nach PK-Verdau liegen die verdauten Banden niedriger als die unverdauten Kontrollproben, was darauf zurückzuführen ist, daß ein Teil des Proteins durch PK abgespalten wurde. In den Kontrollen ohne Infektion ist kein PK resistentes Protein nachweisbar, wohingegen die Bandenstärke in den Scrapie-Proben 79A und ME7 von 30, 90 bis hin zu 150 Tagen nach Infektion deutlich zunimmt. Es ist erkennbar, daß das Bandenmuster in den beiden Scrapie-Stämmen unterschiedlich ist.

79A zeigt eine starke mittlere Bande für einfach glykosyliertes Protein, wohingegen in ME7 die oberste Bande für doppelt glykosyliertes PrP am stärksten ist. Im Western Blot konnte gezeigt werden, daß die Proben infektiöses Material enthalten und ein Anstieg der Infektiösität während des Zeitverlaufs zu verzeichnen ist. Die Homogenate wurden anschließend auf ihren oxidativen Status untersucht.

5.3.2 SOD-Assay

Die Aktivität der SOD wurde, wie im Methodenteil beschrieben, gemessen (vgl. 4.7.). Pro Probe wurden je Einzelmessung 10 µg Protein zur Detektion mit und ohne Cyanid eingesetzt. Die Aktivitäten wurden als Prozent Inhibition in Bezug auf die jeweilige Nullprobe ausgedrückt. Es wurden je zwei der ME7 und 79A-infizierten Tiere pro Zeitpunkt sowie der entsprechenden Kontrolltiere in Dreifachbestimmung untersucht. Die Kontrollproben 120 Tage nach Infektion konnten aus Materialmangel nicht gemessen werden.

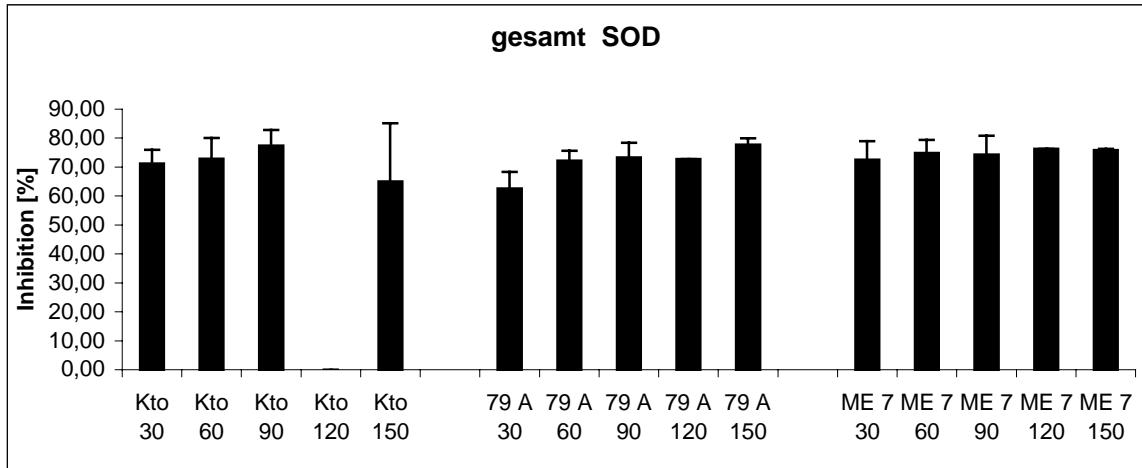


Abbildung 44: Aktivität gesamt SOD im Scrapie-Zeitverlauf plus nicht infizierte Kontrollen. Es wurden pro Zeitpunkt 2 Tiere dreifach gemessen. \pm Standardabweichung

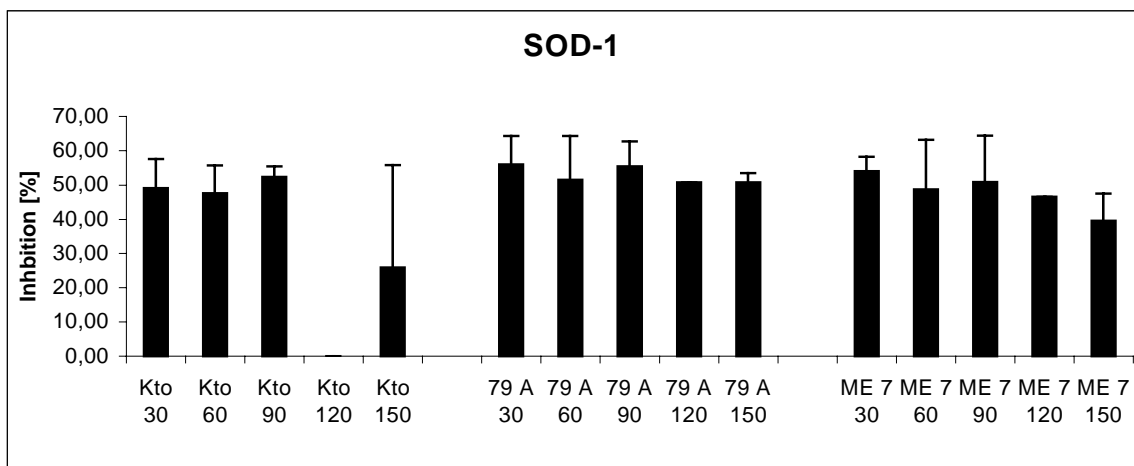


Abbildung 45: Gehalt an SOD-1 im Scrapie-Zeitverlauf. \pm Standardabweichung

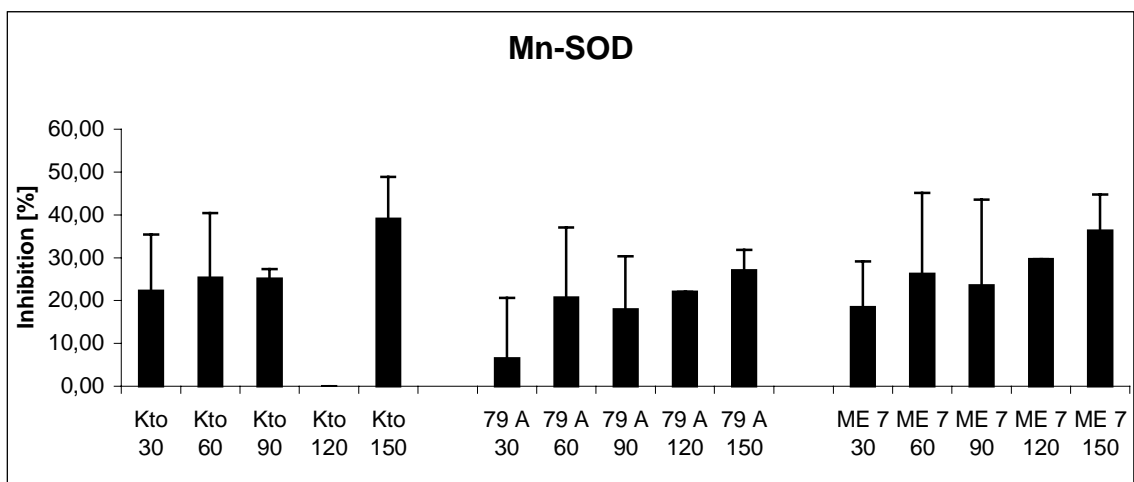


Abbildung 46: Messung der SOD-Aktivität nach Behandlung mit 0,4 mM Cyanid (Mn-SOD). \pm Standardabweichung

Die Aktivität der Gesamt SOD bleibt während des Zeitverlaufs unverändert bei ca. 70 Prozent Inhibition. Im Verlauf der SOD-1 ist jedoch ein Abfall der Inhibition um ca. 10 Prozent (von 50 auf 40 Prozent) zu erkennen und entsprechend dazu nimmt die Mn-SOD im Zeitverlauf zu (von ca. 20 auf 30 Prozent). Da die Differenzen zwischen den Proben nicht signifikant sind, kann hier nur von einer beobachteten Tendenz gesprochen werden, welche aber in allen Proben (ME7, 79A und uninfizierter Kontrolle) präsent ist. Der beobachtete Effekt kann nicht auf die Scrapie-Infektion an sich zurückgeführt werden, da auch die Kontrollproben den gleichen Zeitverlauf zeigen wie infizierte Tiere. Es ist denkbar, daß hier Alterungsprozesse der Tiere eine Rolle spielen. Da die Daten über 70 Prozent Inhibition außerhalb des linearen Bereiches liegen, wurden Kontrollmessungen mit geringeren Proteinmengen durchgeführt, welche aber ebenfalls keine Unterschiede in Bezug auf den Gehalt an Gesamt SOD zeigen (Daten nicht gezeigt).

5.3.3 Glutathion / Glutathion Reduktase / Glutathion Peroxidase

Zur Untersuchung des Glutathion-Haushalts wurden 150 µl Hirnhomogenat mit 900 µl 10 % TCA gefällt. Von dem Überstand wurden 100 µl zur Detektion des Glutathions nach Vorschrift (vgl. 4.10.) eingesetzt. Die Glutathion Reduktase wurde in 250 µg Protein dem Methodenteil entsprechend detektiert (vgl. 4.11.). Die Aktivität der Glutathion Peroxidase konnte mit Hilfe eines Kits der Firma Calbiochem untersucht werden (vgl. 4.12.). Je zwei Tiere der Versuchsgruppen ME7, 79A und Kontrolle wurden zu jedem Zeitpunkt zur Untersuchung des Glutathion Reduktase- Gehalts dreifach bestimmt, wohingegen bei der Messung des Gehalts an Gesamt Glutathion und der Glutathion Peroxidase-Aktivität Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Angegeben ist die Standardabweichung.

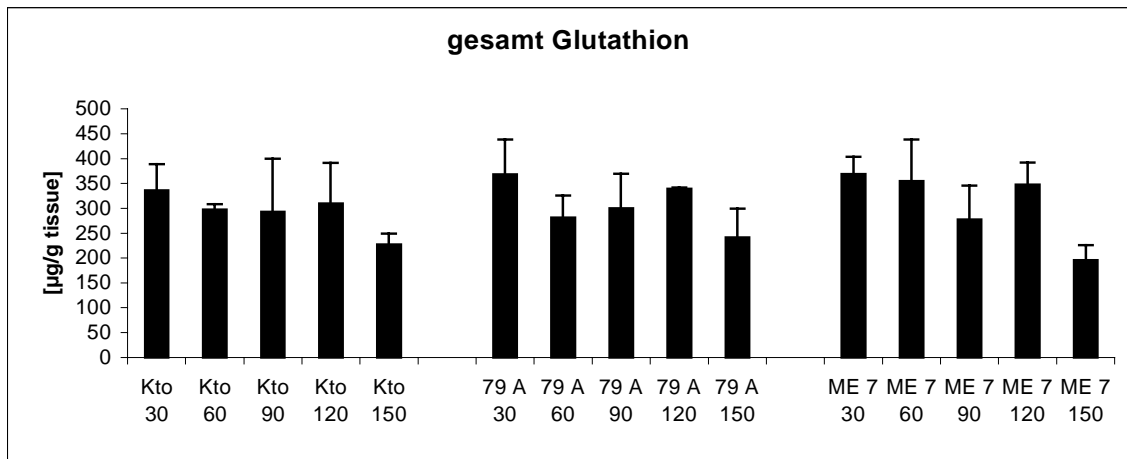


Abbildung 47: Bestimmung des Gehalts an gesamt Glutathion im Scrapie-Zeitverlauf.

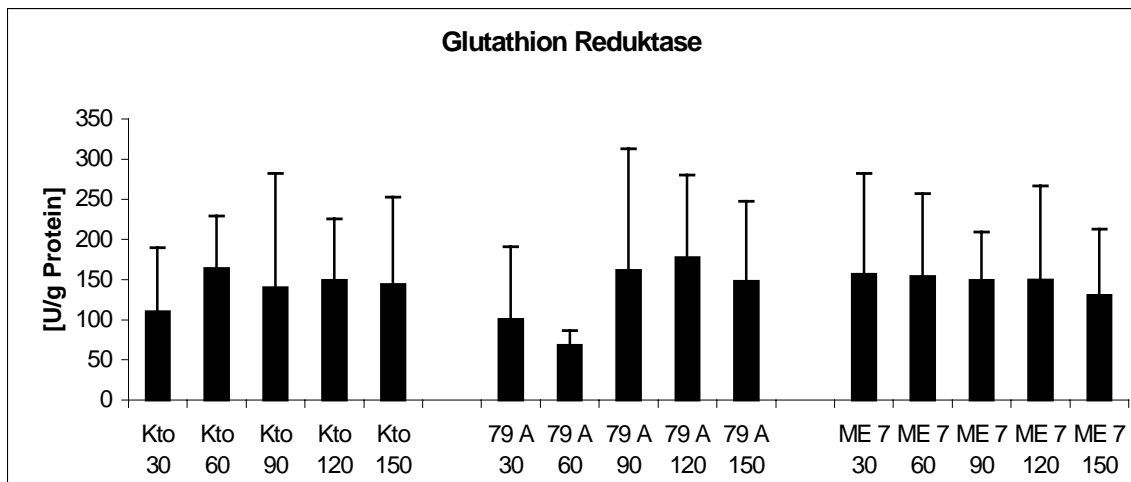


Abbildung 48: Scrapie-Zeitverlauf: Aktivität der Glutathion Reduktase.

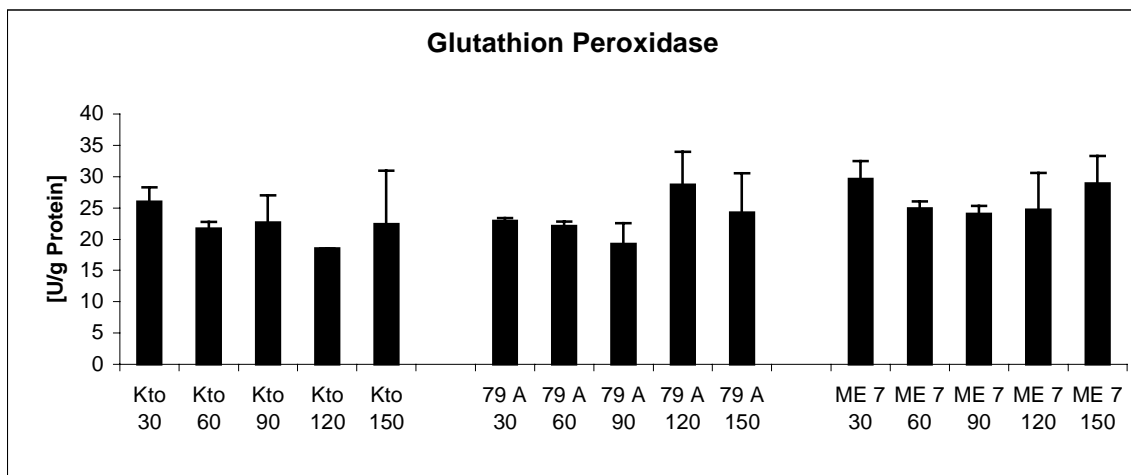


Abbildung 49: Aktivität der Glutathion Peroxidase im Scrapie-Zeitverlauf und entsprechenden Kontrollen.

Der Gehalt des Gesamt Glutathions nimmt sowohl im Scrapie-Zeitverlauf (ME7 und 79A), als auch in den Kontrollproben ohne Infektion ab (von ca. 350 $\mu\text{g/g}$ tissue auf 200-250 $\mu\text{g/g}$ tissue). Im Zeitverlauf sind nicht signifikante Tendenzen der Glutathion-Abnahme detektierbar. Da alle Proben ähnliche Ergebnisse zeigen, kann die Abnahme der Glutathion-Konzentration mit dem Altern der Tiere zusammenhängen. Die Zeitverläufe der Glutathion Reduktase und der Glutathion Peroxidase zeigen keine signifikanten Veränderungen. Aus diesen Daten lassen sich somit keine Hinweise auf vermehrte oxidative Einflüsse während der Scrapie-Infektion ableiten.

5.3.4 Lipid Peroxidation / Protein Oxidation

Zur Untersuchung oxidativer Schäden wurde die Konzentration an oxidierten Proteinen und Lipiden im Zeitverlauf untersucht. Dazu wurden die Homogenate wie beschrieben mit TCA gefällt (vgl. 4.9.). Der Überstand wurde für die Messung der Lipid Peroxide verwendet (vgl. 4.13), während das Pellet auf das Ausmaß der Protein Oxidation untersucht wurde (vgl. 4.14.). Die Bestimmung der Lipid Peroxidation erfolgte in Doppelbestimmung und die der Protein Oxidation aus Materialmangel in Einfachbestimmung. Es wurden je zwei Tiere pro Zeitpunkt untersucht.

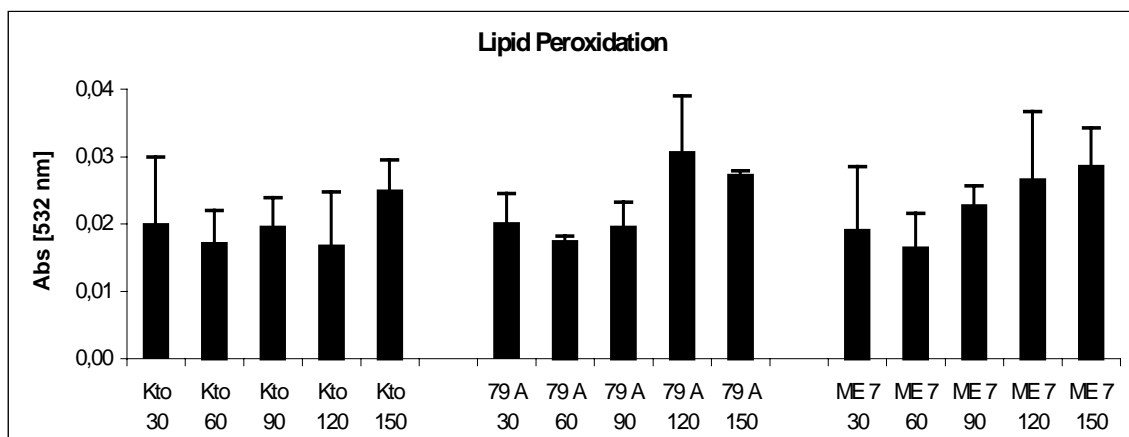


Abbildung 50: Gehalt an Lipid Peroxiden in Scrapie-infizierten und Kontrollproben 30, 60, 90, 120 und 150 Tage nach Inokulation. \pm Standardabweichung

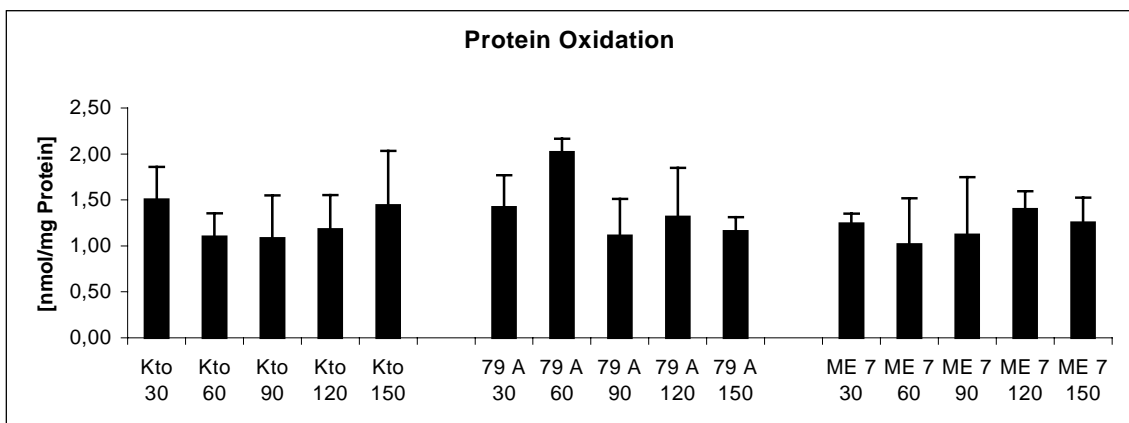


Abbildung 51: Gehalt an oxidiertem Protein in Scrapie-infizierten und Kontrollproben 30, 60, 90, 120 und 150 Tage nach Inokulation. \pm Standardabweichung

Die Konzentration der Lipid Peroxide nimmt mit größer werdendem Zeitabstand sowohl in den Kontrollen als auch in den infizierten Proben zu, wobei der Anstieg in den infizierten Proben leicht erhöht ist, so daß ein vermehrtes Ausmaß der Lipid Peroxidation aufgrund der Prion Infektion im Sinne der 'gain of function'-Hypothese wahrscheinlich ist.

Der Gehalt an oxidierten Proteinen bleibt unverändert. Die Unterschiede zwischen den Proben sind nicht signifikant.

5.3.5 Glutamin Synthetase

Um die Aktivität der Glutamin Synthetase quantifizieren zu können, wurden pro Probe und Messung je 25 µg Protein nach Vorschrift mit Reaktionspuffer versetzt und bei 37°C inkubiert (vgl. 4.15.). Nach 60 Minuten wurde Stopplösung zugefügt und die Absorption bei 505 nm gemessen. Die enthaltene Glutamin Synthetase Aktivität wurde anhand einer Eichgeraden ermittelt. Es wurden je zwei Tiere pro Zeitpunkt in Dreifachbestimmung untersucht.

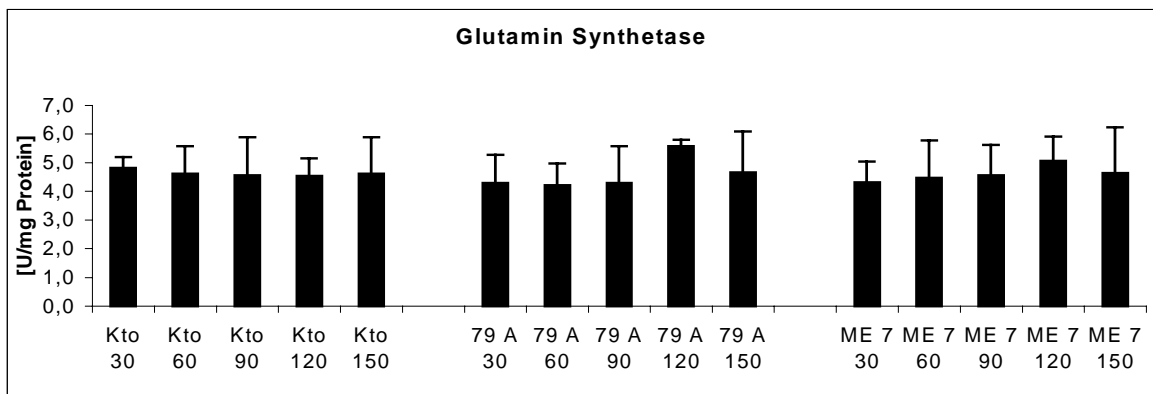


Abbildung 52: Gehalt an Glutamin Synthetase im Scrapie-Zeitverlauf. ± Standardabweichung

Während der Scrapie-Infektion und auch in den Kontrollproben konnte keine signifikante Veränderung der Aktivität der Glutamin Synthetase verzeichnet werden.

Die Untersuchung oxidativen Stresses während der Prion Infektion ergab eine altersbedingte Verschiebung im SOD-Haushalt sowie eine Abnahme des Gehalts an Gesamt Glutathion in infizierten Tieren und Kontrollproben.

Das Ausmaß an Lipid Peroxidation ist in infizierten Tieren in der zweiten Hälfte der Inkubationszeit im Vergleich zu Kontrollproben leicht erhöht, so daß hier ein Hinweis auf vermehrten oxidativen Stress während der Prion Infektion besteht.

6 Diskussion

6.1 Etablierung und Sensitivitätsüberprüfung der verwendeten Methoden

6.1.1 Der Superoxid Dismutase-Assay (SOD-Assay)

Im SOD-Assay nach Oberley und Spitz (1984) werden Superoxid-Radikale durch Reaktion von Xanthin und Xanthin Oxidase freigesetzt, welche dann mit Nitroblautetrazoliumbromid unter Farbreaktion reagieren. Diese Farbreaktion kann bei 560 nm photometrisch als Absorptions-Zunahme detektiert werden. Ist Superoxid Dismutase in dem Reaktionsansatz enthalten, so werden die Superoxid-Radikale abgebaut und die Farbreaktion inhibiert. Die Auswertung erfolgt durch Verrechnung einer Probe mit Hirnhomogenat mit einer Referenzprobe ohne Hirnhomogenat (vgl. 5.1.1.1.) und wird als Prozent Inhibition ausgedrückt.

Zunächst wird die gesamte SOD-Aktivität im Hirnhomogenat gemessen. Zur Trennung der SOD-1 von der Mn-SOD wird dem Ansatz Cyanid zugefügt, welches das Kupfer-Atom aus dem aktiven Zentrum der SOD-1 bindet und somit inhibiert. Die restliche gemessene SOD-Aktivität entspricht der Aktivität der Mn-SOD.

In Messungen mit Cyanid konnte eine Zunahme der Basisreaktion verzeichnet werden (vgl. 5.1.1.1.). Da Cyanid nicht nur die SOD-1, sondern auch Enzyme der Atmungskette (Cytochrom Oxidase) hemmt, ist eine vermehrte Freisetzung von Superoxid-Radikalen aufgrund einer Unterbrechung der Atmungskette möglich und somit eine Zunahme der Basisreaktion des Assays erklärbar (Spitz und Oberley 1989).

Da dieser Effekt aber nicht nur in Proben mit Hirnhomogenat auftritt, sondern ebenfalls in Proben ohne Hirnhomogenat nachweisbar ist (Tabelle 1), ist das Auftreten nicht allein auf die Inhibition der Atmungskette und damit einhergehender zunehmender Superoxid-Bildung zu erklären. Vielmehr können Bestandteile des verwendeten Puffers verantwortlich für den Effekt sein.

Um diese Effekte zu beseitigen, wurden verschiedene Methoden getestet. Zum Einen wurde versucht, den Cyanid-Effekt durch Zugabe weiterer Chelatoren (Thenoyltrifluoraceton und Bathocuproinsulfonat), welche die Atmungskette komplett blockieren, so daß keine Superoxid-Radikale mehr freigesetzt werden, zu beheben (Spitz und Oberley 1989). Es konnte jedoch gezeigt werden, daß der Effekt durch die Behandlung mit den Chelatoren nicht aufzuheben ist (Abbildung 6).

In einem weiteren Ansatz wurde getestet, ob störende Bestandteile des Puffers für die Nebenreaktionen verantwortlich sind, indem Schwermetallatome durch Aufreinigung über Säulenmaterial (Chelex) aus dem Puffer entfernt wurden und je zwei Reaktionsansätze (vor und nach Aufreinigung) mit Kupfersulfat bzw. EDTA versetzt und gemessen wurden. In den Ansätzen vor Aufreinigung konnte in beiden Proben eine Inhibition der Basisreaktion detektiert werden, wohingegen nach Aufreinigung kein Effekt mehr nachzuweisen war, so daß alle weiteren Versuche mit aufgereinigtem Puffer durchgeführt wurden. Der Cyanid-Effekt konnte durch diese Behandlung jedoch nicht behoben werden (vgl. 5.1.1.1.2.).

Als Alternative zur Inhibition mit Cyanid wurde getestet, ob die Trennung der Aktivitäten der SOD-1 und der Mn-SOD durch Ethanol/Chloroform-Extraktion bzw. durch Immunpräzipitation erfolgen kann (vgl. 5.1.1.1.3.).

Zur Untersuchung der Effizienz dieser Methoden erfolgte eine Kontrolle per Western Blot Analyse, welche jedoch zeigte, daß in beiden Verfahren nur eine unvollständige Trennung gelang (Abbildungen 7 und 8), so daß weitere Literaturhinweise herangezogen wurden.

In der Methode nach Meier (Meier et al. 1994) wird die Inhibition der SOD-1 durch Zugabe von Wasserstoffperoxid vorgeschlagen. Die Mn-SOD soll unempfindlicher gegenüber Behandlung mit Wasserstoffperoxid und somit als restliche SOD-Aktivität detektierbar sein.

Da Wasserstoffperoxid aber ein hohes Potential besitzt, organische Substrate wie Proteine oxidativ zu verändern und somit deren Aktivität zu beeinflussen, sind auch andere Nebenreaktionen durch diese Behandlung denkbar. Des Weiteren ist Wasserstoffperoxid ein Endprodukt der Superoxid Dismutase, so daß weitere Hemmeffekte wie Endprodukthemmung möglich sind. Aufgrund der vielen möglichen Nebenreaktionen wurde von dieser Methode abgesehen.

In einer weiteren Methode nach Marklund et al. 1976 wird die Zerfallsrate des Superoxids photometrisch bestimmt. Die Versuchsparameter dieser Methode sind jedoch sehr anfällig, da die Zerfallsrate des Radikals sehr sensibel auf geringe pH-Schwankungen reagiert, so daß auf die Verwendung dieser Methode verzichtet wurde.

Da die Methode nach Oberley und Spitz reproduzierbare Daten liefert und keine effiziente Alternative zu der Inhibition mit Cyanid gefunden wurde, wurde diese Methode zur weiteren Untersuchung transgener Tiere verwendet. Um das Auftreten negativer SOD-Aktivitätswerte zu verhindern, erfolgte die Auswertung durch Verrechnung der Proben mit Homogenat mit und ohne Cyanid mit dem jeweiligen Referenzwert ohne Homogenat mit und ohne Cyanid (vgl. 5.1.1.1.4.).

Ein weiterer Grund, die Methode nach Oberley und Spitz zu verwenden, ist die weite Verbreitung dieser Methode. Mehrere Arbeitsgruppen aus der Prion Forschung detektieren die SOD-Aktivität nach der Methode von Oberley und Spitz (Brown et al. 1997a, Milhavet et al. 2000, Wong et al. 2000).

Die Überprüfung des SOD-Assays nach Oberley und Spitz ergab, daß der Kurvenverlauf der Inhibition in Abhängigkeit von der SOD-Konzentration ab einer Inhibition von 60 Prozent und höher nicht mehr linear verläuft, so daß für eine effiziente Messung die Inhibitionswerte unterhalb von 60 Prozent liegen sollten. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu gewährleisten, wurden je Probe 10 µg Protein zur Messung verwendet. Da unterschiedliche Sauerstoffsättigungen in dem Reaktionspuffer zu Tagesschwankungen der Basisreaktion führen, wurden alle zu vergleichenden Proben gleichzeitig hergestellt und gemessen.

6.1.2 Der Glutathion-Haushalt

Die Quantifizierung des Glutathions nach der Methode von Griffith et al. 1980 erwies sich im Hinblick auf den gesamt-Glutathion-Spiegel als gut auswertbar. Die gemessenen Proben befinden sich im linearen Bereich und die Wiederfindung konnte durch Zumisch-Experimente bestätigt werden (vgl. 5.1.1.2.), so daß diese Methode zur Untersuchung antioxidativer Eigenschaften des zellulären Prionproteins weiter verwendet wurde.

Nach Behandlung mit 2-Vinylpyridin zur Komplexierung des reduzierten Glutathions jedoch konnten keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden (Abbildung 11), so daß die Aktivitäten der Glutathion Reduktase und Glutathion Peroxidase näher untersucht wurden.

Die Etablierung der Methode zur Messung der Aktivität der Glutathion Reduktase erfolgte nach Milhavet et al. 2000, wohingegen zur Messung der Aktivität der Glutathion Peroxidase ein käufliches Kit der Firma Calbiochem verwendet wurde. Die Überprüfung dieser Methoden durch Zugabe verschiedener Mengen Hirnhomogenat zeigte, daß die Aktivitäten der gemessenen Proben innerhalb des linearen Bereiches zu finden sind. Durch Zugabe bestimmter Mengen der entsprechenden Enzyme konnte die Wiederfindung bestätigt werden (vgl. 5.1.1.3. und 5.1.1.4.).

6.1.3 Oxidative Schäden

Zur Messung oxidativer Schäden wie Lipid Peroxidation und Protein Oxidation wurden die Methoden nach Persky et al. 2000 und Levine et al. 1990 verwendet.

Das Ausmaß der Lipid Peroxidation wurde anhand der Absorptionswerte ausgewertet, da aufgrund der Schwerlöslichkeit des verwendeten Malondialdehydbis(diethylacetal) (MDA) in wässrigen Lösungen zwar eine Linearität der einzelnen Eichgeraden detektiert werden konnte, die Reproduzierbarkeit der Eichwerte jedoch wenig gewährleistet war.

Die Auswertung der Protein Oxidation erfolgte durch Berechnung mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten (vgl. 5.1.1.6.), so daß auch hier keine Eichgerade angefertigt wurde.

Da zur Überprüfung der Methoden zur Detektion oxidativer Schäden Zumisch-Experimente als wenig sinnvoll erachtet wurden, erfolgte die Etablierung und Überprüfung dieser Methoden anhand Wasserstoffperoxid-behandelter und unbehandelter N2a-Zellen (vgl. 5.1.2.).

6.1.4 Glutamin Synthetase

Der Gehalt an Glutamin Synthetase konnte mit der Methode nach Vorhaben et al. 1973 und Radak et al. 1998 in Hirnhomogenaten gemessen werden. Zur Überprüfung der Methode wurden unterschiedliche Mengen Protein (Hirnhomogenat) mit und ohne Zugabe aufgereinigter Glutamin Synthetase zur Messung eingesetzt. Die Aktivitäten der gemessenen Proben lagen im linearen Bereich und die Wiederfindung konnte gezeigt werden (vgl. 5.1.1.7.), so daß diese Methode für weitere Untersuchungen in transgenen Tieren verwendet wurde.

6.1.5 Messungen in N2a-Zellen

Zur nochmaligen Überprüfung der verwendeten Methoden wurden Lysate Wasserstoffperoxid-behandelter und unbehandelter Maus Neuroblastoma-Zellen (N2a-Zellen) gemessen.

Da die behandelten Zellen als positiv-Kontrolle zur Detektion oxidativer Schäden dienen sollten und bereits Untersuchungen in Primärzellkultur mit und ohne Wasserstoffperoxid (60 μM , 24 Stunden) durchgeführt wurden (White et al. 1999), erfolgte die Inkubation mit 60 μM Wasserstoffperoxid für 24 Stunden.

Die Viabilität der behandelten Zellen wurde mit Hilfe des MTT-Assays (Brown et al. 1997a) gemessen und zeigte nach Wasserstoffperoxid-Behandlung einen deutlichen Rückgang vitaler Zellen (Abbildung 16), so daß in diesen Zellen ein hohes Ausmaß oxidativer Schäden erwartet wurde.

In den behandelten Zellen konnte ein Rückgang der SOD-Aktivität verzeichnet werden (Abb.17), welcher auf eine Endprodukt-Hemmung durch Wasserstoffperoxid zurückzuführen sein könnte (Meier et al. 1994). Es ist aber auch möglich, daß das Enzym durch die oxidativen Eigenschaften des Wasserstoffperoxids angegriffen und somit inaktiviert wurde (Butterfield et al. 2001). Des Weiteren ist denkbar, daß das Enzym in in geschädigten Zellen bereits degradiert wurde.

Die Messung des Glutathion-Haushalts ergab in Wasserstoffperoxid-behandelten Zellen einen Rückgang des gesamt Glutathions und der Glutathion Peroxidase, aber einen Anstieg der Glutathion Reduktase (Abbildungen 18,19,20). Die Ursache für den Rückgang des Glutathions (Abbildung 18) und der Glutathion Peroxidase (Abbildung 20) kann daran liegen, daß bei auftretendem oxidativen Stress vermehrt Glutathion verbraucht wird oder daß während des Zelltodes vermehrt intrazelluläre Komponenten verloren gehen bzw. geschädigte Proteine degradiert werden. Da aber die Aktivität der Glutathion Reduktase nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid erhöht ist, ist ein Verlust zellulärer Komponenten unwahrscheinlich, da in diesem Fall auch dieses Enzym eine verringerte Aktivität zeigen müßte.

Die erhöhte Aktivität der Glutathion Reduktase (Abbildung 19) dagegen kann einen Abwehrmechanismus der Zelle gegen den induzierten oxidativen Stress darstellen, da so vermehrt reduziertes Glutathion zur Entgiftung von Peroxiden zur Verfügung gestellt wird.

Entgegen der in dieser Arbeit detektierten verringerten Glutathion Peroxidase und erhöhten Glutathion Reduktase-Aktivitäten konnte in einer Studie von White in Primärzellkultur von PrP-knockout-Tieren eine Abnahme der Glutathion Reduktase Aktivität nach Behandlung mit 60 μM Wasserstoffperoxid für 24 Stunden festgestellt werden, wohingegen die Aktivität der Glutathion Peroxidase keine Veränderungen zeigte. In Wildtyp-Tieren zeigten sowohl Glutathion Reduktase als auch Peroxidase keinerlei Veränderungen durch den Einfluß von 60 μM Wasserstoffperoxid (24 Stunden) (White et al. 1999).

Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Arbeit und der von White können der verschiedenen Herkunft der verwendeten Zelltypen zugrundeliegen.

Nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid ist in den Zellen eine deutliche Zunahme oxidativer Schäden zu verzeichnen (vgl. 5.1.2.6. und 5.1.2.7.). Sowohl die Erhöhung des Gehalts an Lipid Peroxiden als auch das vermehrte Ausmaß an Protein Oxidation ist durch die verwendeten Methoden nach Persky et al. 2000 und Levine et al. 1990

sensitiv nachweisbar, so daß diese Methoden zur weiteren Untersuchung transgener Tiere verwendet wurden.

Die Aktivität der Glutamin Synthetase nimmt nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid zu (vgl. 5.1.2.8.). Eine mögliche Ursache für die erhöhte Aktivität kann mit dem vermehrten Abbau oxidativ geschädigter Proteine und der damit einhergehenden vermehrten Freisetzung von Ammoniumionen zusammenhängen. Es ist denkbar, daß die vermehrten Ammoniumionen durch eine erhöhte Glutamin Synthetase Aktivität unter Bildung von Glutamin abgebaut werden.

Durch die Überprüfung der in dieser Arbeit verwendeten Methoden mittels Messung unterschiedlicher Proteinmengen (Hirnhomogenat) mit und ohne Zugabe der jeweiligen Enzyme bzw. Substrate, konnte gezeigt werden, daß der Gehalt der gemessenen Komponenten in den Proben im linearen Meßbereich der jeweiligen Verfahren liegt und die Wiederfindung in den jeweiligen Methoden gewährleistet ist. Mit Hilfe der nochmaligen Kontrolle in oxidativ geschädigten und unbehandelten N2a-Zellen konnte gezeigt werden, daß die verwendeten Methoden zur Detektion des oxidativen Status in Gewebeprobe geeignet sind. Aus diesem Grund erfolgte die weitere Verwendung der getesteten Methoden zur Überprüfung der potentiellen antioxidativen Eigenschaft des zellulären Prionproteins und der Detektion oxidativen Stresses im Scrapie-Zeitverlauf.

6.2 Untersuchungen an transgenen Tieren

Aufgrund der Hinweise auf antioxidative Eigenschaften des Prionproteins (Brown et al. 1999, Brown und Besinger 1998, Brown 2001) ist denkbar, daß Tiere, welche kein PrP exprimieren, weniger Schutz vor oxidativen Einflüssen besitzen. Dieser geringere Schutz vor Oxidantien müsste in Form erhöhter oxidativer Schäden nachweisbar sein, was bereits in Primärzellkultur von PrP-knockout-Tieren im Vergleich mit Wildtyp-Tieren gezeigt werden konnte (Wong et al. 2001a und 2001 b, White et al. 1999).

Um zu überprüfen, ob der gemessene Effekt auf die Expression des Prionproteins zurückzuführen ist und kein Artefakt bedingt durch die Einschleusung eines Transgens vorliegt, wurden transgene Tiere getestet, welche auf PrP-knockout-Hintergrund das Prionprotein überexprimieren (Tg35-Tiere, Fischer et al. 1996). Diese überexprimierenden Tiere sollten wiederum einen vermehrten Schutz vor oxidativen Einflüssen zeigen.

Des Weiteren wurden transgene Tiere untersucht, welchen die kupferbindende Oktapeptid-Region fehlt (C4-Tiere) (Flehsig et al. 2000, Shmerling et al. 1998). Wenn die potentielle antioxidative Eigenschaft des Prionproteins mit der Kupferbindung zusammenhängt (Brown et al. 1997a, Kramer et al. 2001, Whittal et al. 2000), so ist es möglich, daß diese Tiere aufgrund der fehlenden kupferbindenden Region Hinweise auf vermehrten oxidativen Stress zeigen.

Da der Phänotyp der E57- und F35-Tiere (Shmerling et al. 1998) mit einer durch die Deletion bedingten Funktionsstörung des Prionproteins zusammenhängen kann, welche unter Umständen die potentiellen antioxidativen Mechanismen des zellulären Prionproteins betrifft, ist ein Auftreten oxidativen Stresses in diesen Tieren denkbar.

Aus diesem Grund wurden diese transgenen Mauslinien ebenfalls auf ihren antioxidativen Status überprüft.

Zunächst wurden die verwendeten Tiere per Western Blot Analyse auf die Expression der entsprechenden PrP-Transgene untersucht (vgl. 5.2.1.). Da die Tiere die erwarteten (deletierten) Prionproteine exprimierten, konnten die weiteren Untersuchungen auf den oxidativen Status vorgenommen werden.

In der SOD-Messung konnte die von Brown et al. 1997b beschriebene Reduktion der SOD-1 Aktivität in PrP-knockout-Tieren nicht bestätigt werden, welches den Ergebnissen der Studie von Waggoner et al. 2000, welcher ebenfalls keine PrP-abhängige Verschiebung im SOD-Haushalt finden konnte, entspricht.

Die Untersuchungen des Glutathion-Haushalts ergab keine Hinweise auf signifikante Unterschiede zwischen den transgenen Linien.

Die Aktivität der Glutathion Peroxidase zeigt ebenfalls in der Studie von White et al. 1999 keinen Unterschied zwischen PrP-knockout- und Wildtyp-Tieren, so daß die Daten mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse übereinstimmen.

Der von White detektierte reduzierte Gehalt an Glutathion Reduktase in knockout-Tieren konnte in dieser Arbeit jedoch nicht reproduziert werden.

Hinweise auf erhöhte oxidative Schäden in PrP-knockout-Tieren bzw. in Tieren mit verkürztem Prionprotein wurden nicht gefunden, so daß die Ergebnisse von Wong und Klamt (Wong et al. 2001a und 2001b, Klamt et al. 2001) nicht bestätigt werden konnten.

In der Aktivität der Glutamin Synthetase wurden ebenfalls keine Unterschiede zwischen den verschiedenen transgenen Mauslinien gefunden.

Die in Hamburg gemessenen Parameter (α -Tocopherol, gesamt Fettsäuregehalt und Fettsäurezusammensetzung) zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen Linien, wohingegen in Bezug auf Wildtyp-Tiere bei C4, Tg35, E57 und F35-Tieren ein signifikant erhöhter Ascorbat-Gehalt detektiert werden konnte. Da aber sowohl PrP-defiziente bzw. PrP-überexprimierende Tiere sowie Mäuse mit trunkiertem Prionprotein denselben Effekt zeigen, liegen hier wahrscheinlich keine Einflüsse aufgrund der potentiellen antioxidativen Funktion des Prionproteins vor.

Vorzugsweise werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren durch freie Radikale unter Bildung von Lipid Peroxiden angegriffen (vgl. 1.5.4.2.). Somit erfolgte durch die Messungen der Fettsäurezusammensetzung (vgl. 5.2.4.3.) und des Gehalts an Lipid Peroxiden (vgl. 5.2.2.3. und 5.2.3.3.) die Untersuchung des Substrats und des Endproduktes der Lipid Peroxidation. Durch die Detektion des wichtigsten lipophilen Antioxidans (α -Tocopherol, vgl. 5.2.4.2.), welches die Lipid Peroxidation verhindern kann (vgl. 1.5.1.) und des wichtigsten hydrophilen Antioxidans (Vitamin C, vgl. 5.2.4.1.), welches α -Tocopherol regeneriert und somit weitem Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) darstellt, erfolgte eine detaillierte Untersuchung der Lipid Peroxidation in Hirngewebe transgener Tiere, welche keine mit der PrP-Expression klar assoziierten Unterschiede lieferte.

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten geben somit keinen Hinweis auf die potentielle antioxidative Funktion des Prionproteins. Es konnten weder erhöhte oxidative Schäden in PrP-knockout-Tieren noch ein besonderes Aufkommen antioxidativer Schutzmechanismen in überexprimierenden Tieren (Tg35-Tiere) gefunden werden. Weiterhin ergab sich durch die Deletion der Oktapeptid-Region (C4-Tiere) bzw. weitgreifender Deletion großer Abschnitte des Prionproteins (E57- und F35-Tiere) kein Anzeichen oxidativer Beeinflussung, so daß der auftretende Phänotyp der E57- und F35-Tiere (Shmerling et al. 1998) wahrscheinlich mit einer anderen, bisher unbekanntem physiologischen Funktion des Prionproteins zusammenhängt.

Eine mögliche Ursache dafür, daß keine Unterschiede zwischen den verwendeten transgenen Tieren ermittelt werden konnten, kann das Alter der verwendeten Tiere sein. Es ist möglich, daß erst mit fortgeschrittenem Alter der Versuchstiere Unterschiede im oxidativen Status erfassbar sind. So wurden in der Arbeitsgruppe von Klamt et al. 2001 Tiere im Alter von 4-6 Monaten getestet, wohingegen in dieser Arbeit Tiere im Alter von drei Monaten untersucht wurden.

Unwahrscheinlich ist dieser Aspekt jedoch im Hinblick darauf, daß der gefundene Unterschied zwischen PrP-knockout- und Wildtyp-Tieren in Bezug auf den Glutathion Reduktase-Gehalt sowohl in Primäzzellkultur als auch in Hirnhomogenaten 2-Wochen alter Mäuse gezeigt werden konnte (White et al. 1999).

In welchem Alter die verwendeten Tiere in den Studien anderer Arbeitsgruppen waren, wird von diesen nicht angegeben (Wong et al. 2001a und 2001b).

Des Weiteren ist es denkbar, daß Unterschiede zwischen den verschiedenen transgenen Tieren erst nach Auftreten oxidativen Stresses detektierbar sind. Dieser Aspekt wurde durch die Arbeiten von White et al. 1999 durch Zugabe von Wasserstoffperoxid auf Primäzzellkulturen von Wildtyp- und PrP-knockout-Tieren näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß PrP-knockout-Tiere empfindlicher auf oxidative Einflüsse reagieren (Brown et al. 1994, White et al. 1999).

Um diesen Aspekt näher zu untersuchen, wurde überlegt, ob Tests in Primäzzellkultur der verschiedenen transgenen Tiere nach Zugabe von Wasserstoffperoxid bzw. dem neurotoxischen Peptid (PrP¹⁰⁶⁻¹²⁶) sinnvoll sind. Aufgrund der für diese Versuche notwendigen verstärkten Tierzucht und der begrenzten Kapazität der Tierhaltungsräume wurde von diesem Projekt abgesehen.

Bei kritischer Auswertung der Messdaten konnte festgestellt werden, daß in Einzelmessungen zufällige 'Ausreißer', welche bei der Interpretation der Daten mit dem theoretischen Hintergrund konform waren, dazu tendieren ließen, die Ergebnisse in die entsprechende Richtung zu deuten. Bei neutraler Auswertung sämtlicher Datensätze hingegen relativierten sich die Unterschiede zwischen den Proben, so daß keine signifikanten Hinweise auf eine antioxidative Funktion des zellulären Prionproteins detektiert wurden.

6.3 Untersuchungen der Scrapie-Infektion im Zeitverlauf

Während der Prion Infektion wird zelluläres Prionprotein (PrP^c) zu PrP^{Sc} umgewandelt (Caughey et al. 2001). Bedingt durch die Konformationsumwandlung ist es möglich, daß funktionsfähiges zelluläres Prionprotein verloren geht ('loss of function') oder daß durch die Konformationsumwandlung eine neue Funktion des Prionproteins aktiviert wird ('gain of function') (Collinge et al. 1994, Kretzschmar et al. 1997). Im Sinne der 'gain of function'-Hypothese konnte gefunden werden, daß PrP^{Sc} Mikroglia aktiviert, welche vermehrt Superoxid-Radikale freisetzen (Peyrin et al. 1999). Durch die freigesetzten Superoxid-Radikale wird oxidativer Stress induziert, welcher somit in infizierten Zellen detektierbar sein sollte. Des Weiteren ist es möglich, daß einhergehend mit der 'loss of function'-Hypothese funktionsfähiges, potentiell antioxidativ wirksames zelluläres Prionprotein verloren geht, wodurch ebenfalls oxidativer Stress induziert würde.

Zur Überprüfung dieser theoretischen Ansätze wurde in einer Scrapie-Zeitverlaufsstudie (30, 60, 90, 120 und 150 Tage nach Inokulation mit den Scrapie-Stämmen ME7 und 79A) untersucht, ob während des Krankheitsverlaufes vermehrt oxidativer Stress auftritt.

Zunächst wurde per Western Blot Analyse getestet, ob in den verwendeten Proben während des Krankheitsverlaufes die Menge des fehlgefalteten, Proteinase K-resistenten PrP^{Sc} (Oesch et al. 1985) zunimmt. In der Analyse konnte gezeigt werden, daß in den Proben 90, 120 und 150 Tage nach Inokulation in zunehmender Menge PK-resistentes Prionprotein vorhanden war (vgl.5.3.1.). Weiterhin konnten die unterschiedlichen Scrapie-Erregerstämme durch ihr charakteristisches Glykosylierungsmuster identifiziert werden (Sommerville et al. 1997). ME7 zeigt eine deutlich stärkere Bande des zweifach glykosylierten Proteins, wohingegen 79A überwiegend in der einfach glykosylierten Form vorliegt (Abbildung 43).

Bei der Messung der Aktivität der Superoxid Dismutase konnten in der Gesamt-SOD weder Unterschiede im Krankheitsverlauf noch zwischen infizierten und Kontrollproben gefunden werden (vgl. 5.3.2.). Dennoch zeigt sich im Zeitverlauf eine Zunahme der Mn-SOD und eine Abnahme der SOD-1. Somit kann hier eine altersbedingte Verschiebung von SOD-1 zu Mn-SOD, ähnlich der von Brown et al. 1997a beschriebenen Verschiebung bei PrP-knockout-Tieren, vorliegen.

Bei genauerer Betrachtung fällt auf, daß die Werte der gemessenen Gesamt-SOD über 70 Prozent Inhibition, also außerhalb des linearen Bereiches liegen. Aus diesem Grund wurden weitere Messungen mit geringerer Proteinkonzentration vorgenommen, welche ebenfalls bei der Gesamt-SOD keine Unterschiede zwischen den Proben ergaben (Daten nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu anderen Studien in infizierten Zelllinien konnte keine Abnahme der Gesamt-SOD und der Mn-SOD gefunden werden (Milhavet et al. 2000), was auf den Unterschied von in vitro und in vivo Experimenten zurückzuführen sein kann.

Im Glutathion-Haushalt konnten keine Unterschiede in Bezug auf die Aktivitäten der Glutathion Reduktase und Glutathion Peroxidase zwischen den Proben gefunden werden (vgl. 5.3.3.). Der Gehalt an Gesamt Glutathion jedoch nimmt während des Zeitverlaufes sowohl in infizierten als auch in den Kontrollproben ab. Die Ursache für die Abnahme des Glutathions kann mit einem zunehmenden Auftreten oxidativen Stresses während des Alterns zusammenhängen (Butterfield et al. 2001).

Infizierte GT1-Zellen zeigten eine Abnahme der Aktivitäten der Glutathion Reduktase und der Glutathion Peroxidase (Milhavet et al. 2000), was ebenfalls auf den Unterschied zwischen in vivo und in vitro Experimenten zurückzuführen sein kann.

Die Untersuchung oxidativer Schäden ergab keine Unterschiede in Bezug auf das Ausmaß der Protein Oxidation im Scrapie-Zeitverlauf (vgl. 5.3.4.). Die Messung der Lipid Peroxide zeigte jedoch einen Anstieg in der Zeitverlaufsstudie, welcher in den Scrapie-Proben ausgeprägter zu sein scheint als in den Kontrollproben. Unabhängige Kontrollexperimente zeigten tendenziell denselben Effekt (Daten nicht gezeigt). Somit gibt es aufgrund der gezeigten Daten (Abbildung 50) sowie durch die Ergebnisse von Guentchev et al. 2000, welche erhöhte Nitrotyrosin-Werte in Immunhistochemischen Untersuchungen Scrapie-infizierter Tiere zeigen, Hinweise auf ein vermehrtes Auftreten oxidativen Stresses während der Prion Infektion.

Messungen der Aktivität der Glutamin Synthetase im Scrapie-Zeitverlauf ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben (vgl. 5.3.5.).

Während der Untersuchung oxidativen Stresses in der Scrapie-Zeitverlaufsstudie konnten Hinweise auf vermehrten oxidativen Stress während des Alterns gefunden werden. Es wurde eine Verschiebung im SOD-Haushalt sowie eine Abnahme des Gehalts an Gesamt-Glutathion im Alterungsprozess der Tiere sowohl in infizierten Tieren als auch in den Kontrollproben detektiert. Des Weiteren wurde eine Zunahme des Ausmaßes an Lipid Peroxidation gemessen, welche Hinweise auf vermehrten oxidativen Stress während der Prion Infektion liefert. Dieser vermehrte oxidative Stress könnte eine messbare Folge der durch die von aktivierten Mikroglia freigesetzten Superoxid-Radikale darstellen, welches die 'gain of function'-Hypothese unterstützen würde. Zusätzlich könnte ein vermehrtes Ausmaß oxidativen Stresses während der Prion Infektion eine Ursache für die PrP^{Sc}-vermittelte Neurotoxizität darstellen.

7 Zusammenfassung

Prionkrankheiten sind neurodegenerative, tödlich verlaufende Erkrankungen, welche durch apoptotische Nervenzellverluste gekennzeichnet sind und sowohl bei Menschen (Creutzfeldt-Jakob) als auch bei Tieren (BSE) auftreten können.

Während der Erkrankung unterliegt das zelluläre Prionprotein (PrP^c) einer Konformationsumwandlung zu PrP^{Sc} , welches im Hirngewebe akkumuliert und neurotoxische Effekte aufweist.

Zelluläres Prionprotein besitzt kupferbindende Eigenschaften und eine potentielle antioxidative Funktion, welche einen Schutzmechanismus vor oxidativen Schäden im Hirngewebe darstellen kann. Während der Konformationsumwandlung von PrP^c zur infektiösen Form des Prionproteins (PrP^{Sc}) ist ein Verlust an funktionsfähigem, potentiell antioxidativ wirksamen PrP^c möglich, so daß im Sinne der 'loss of function'-Hypothese vermehrtes Auftreten oxidativen Stresses denkbar ist.

Einhergehend mit der 'gain of function'-Hypothese konnte ein neurotoxischer Effekt von PrP^{Sc} nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, daß PrP^{Sc} Mikroglia aktiviert, welche dann vermehrt Superoxid-Radikale freisetzen, so daß vermutlich vermehrter oxidativer Stress während der Prion Infektion induziert wird.

Oxidativer Stress wird durch freie Radikale bzw. reaktive Sauerstoffspezies, welche während der normalen zellulären Aktivität in der Atmungskette entstehen oder durch phagozytierende Zellen (Makrophagen, Mikroglia) gebildet werden, induziert und kann in Form oxidativer Schäden (Protein Oxidation, Lipid Peroxidation und DNA-Schäden) detektiert, sowie anhand der Aktivitäten antioxidativ wirksamer Enzyme (Superoxid Dismutase, Glutathion Peroxidase, Glutathion Reduktase) und der Konzentration nicht enzymatischer Antioxidantien (Glutathion, Vitamin C, Vitamin E) gemessen werden.

Um einen Überblick über den antioxidativen Status in Hirnhomogenaten zu erlangen, wurden verschiedene Methoden zur Detektion antioxidativer Mechanismen etabliert. Es wurden enzymatische Antioxidantien wie die Superoxid Dismutase (SOD) und die Glutathion Peroxidase gemessen sowie enzymatische Hilfsmechanismen (Glutathion Reduktase) und nicht-enzymatische Antioxidantien (Glutathion) untersucht. Zur Detektion direkter oxidativer Schäden wurde der Gehalt an Lipid Peroxiden und das Ausmaß an Protein Oxidation analysiert.

Da Glutamat im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen und oxidativem Stress eine wichtige Rolle zu haben scheint, wurde ebenfalls die Aktivität der Glutamin Synthetase gemessen.

Die verwendeten Methoden wurden auf Sensitivität und Reproduzierbarkeit getestet sowie anhand des Modells Wasserstoffperoxid-behandelter N2a-Zellen überprüft.

Des Weiteren wurden Proben der verwendeten transgenen Tiere zur Messung lipophiler und hydrophiler Antioxidantien (Vitamin E und C) sowie gesättigter und ungesättigter Fettsäuren im Rahmen einer Kollaboration mit dem Biochemischen Stoffwechsellabor des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf untersucht, so daß eine detaillierte Analyse der Lipid Peroxidation (gesättigte Fettsäuren als Substrat, Lipid Peroxide als Produkte der Lipid Peroxidation sowie α -Tocopherol als Schutz vor Lipid Peroxidation und Ascorbat, welches α -Tocopherol regeneriert) erfolgte.

Zur Untersuchung der Funktion des zellulären Prionproteins wurden verschiedene transgene Mauslinien im Hinblick auf ihren oxidativen Status analysiert. In PrP-knockout-Linien sowie in Tieren mit unterschiedlich verkürztem Prionprotein wurde aufgrund des voraussichtlich fehlenden potentiellen antioxidativen Schutzes durch zelluläres Prionprotein vermehrtes Auftreten oxidativen Stresses erwartet. Als Kontrolle, daß eventuelle Effekte auf das Fehlen des Prionproteins zurückzuführen sind und nicht durch Artefakte während der Einschleusung eines Transgens bedingt wurden, erfolgte die Messung PrP-überexprimierender Tiere.

Das Auftreten oxidativen Stresses während der Prion Infektion wurde anhand einer Scrapie-Zeitverlaufsstudie untersucht. Es wurden infizierte Tiere 30, 60, 90, 120 und 150 Tage nach Inokulation mit den Scrapie-Stämmen ME7 und 79A im Vergleich mit nicht infizierten Tieren gleichen Alters auf ihren antioxidativen Status getestet.

In der Untersuchung antioxidativer Mechanismen des zellulären Prionproteins konnten bei der Messung der SOD-Aktivität, des Glutathion-Haushalts (Glutathion, Glutathion Peroxidase und Glutathion Reduktase) sowie in der detaillierten Analyse oxidativer Schäden (Messungen des Ausmaßes an Protein Oxidation sowie des Substrats und Produkts der Lipid Peroxidation als auch der Vitamine E und C als Schutz vor Lipid Peroxidation) keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen transgenen Linien festgestellt werden, welche auf die Expression unterschiedlicher Prionproteine zurückzuführen sind. Die Aktivität der Glutamin Synthetase zeigte in keiner der untersuchten transgenen Linien signifikante Unterschiede.

Weder PrP-knockout-Tiere noch Tiere mit deletierter Oktapeptid-Region wiesen Veränderungen im oxidativen Status auf. Ebenso konnten in PrP-überexprimierenden Tieren keine erhöhten Schutzmechanismen vor oxidativem Stress detektiert werden, so daß die potentielle antioxidative Eigenschaft des Prionproteins in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte und somit der Aspekt der 'loss of function'-Hypothese im Hinblick auf das Auftreten oxidativen Stresses unwahrscheinlich ist.

Im Scrapie-Zeitverlauf konnten in den Aktivitäten der Glutathion Reduktase und Glutathion Peroxidase sowie der Glutamin Synthetase keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Das Ausmaß der Protein Oxidation zeigte keine signifikanten Veränderungen während der Prion Infektion.

Hinweise auf oxidative Beeinflussung während des Alterns lieferten die Messungen der SOD-Aktivität und des Glutathions, da sowohl in infizierten als auch in nicht infizierten Kontrollproben im Zeitverlauf eine Verschiebung des SOD-Haushaltes sowie eine Abnahme des Gehalts an Gesamt Glutathion detektiert werden konnten.

Einen Hinweis auf zusätzlichen oxidativen Stress während der Prion Infektion gaben leicht erhöhte Werte der Lipid Peroxidation in Scrapie-infizierten Tieren in der zweiten Hälfte der Inkubationszeit in Bezug auf nicht infizierte Kontrollproben gleichen Alters. Somit ist ein vermehrtes Auftreten oxidativen Stresses während der Prion Infektion im Sinne der 'gain of function'-Hypothese möglich, welches eine Ursache der PrP^{Sc}-vermittelten Neurotoxizität darstellen könnte.

8 Abkürzungsverzeichnis

In dem folgenden Text wurden für einige Begriffe die englischen Fachtermini verwendet (z.B. Blot, Screening usw.), falls auch in der deutschen Fachliteratur ihre Übersetzung unüblich ist. Für die Abkürzungen englischer Fachausdrücke werden in dieser Übersicht nur zum Teil die deutschen Bedeutungen angegeben.

Es gelten die allgemeinen SI-Einheiten sowie die chemischen Elementsymbole.

Abs	Absorption
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninic Acid
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BCS	Bathocuproinsulfonat
BHT	Butylated Hydroxytoluen
BOA	Best Of All
BR	Broad range
BSA	Bovine Serum Albumin
BSE	bovine spongiform encephalopathy
CJD	Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (disease)
DCIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
DETAPAC	Diethylentriaminpentaessigsäure
DMF	Dimethylformamid
DNPH	Dinitrophenylhydrazin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FFI	fatal familial insomnia
FKS	fetales Kälberserum
FUDR	5-Fluoro-2'-Deoxyuridin
GlnSyn	Glutamin Synthetase
GPx	Glutathion Peroxidase
GR	Glutathion Reduktase
GSH	Glutathion reduziert
GSS	Gerstmann Sträussler Scheinker
GSSG	Glutathion oxidiert
GuaHCl	Guanidiniumchlorid
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IgG	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
kD	kilo Dalton
KP	Kaliumphosphat Puffer
LLME	L-Leucin Methylester
M	Marker
MDA	Malondialdehydbis(diethylacetal)
Min	Minute
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2,4-

	tetrazoliumbromid
MUFA	mono unsaturated fatty acid = einfach ungesättigte Fettsäure
NBT	4-Nitroblautetrazoliumbromid
PBS	Phosphat Buffered Saline
Pen/Strep	Penicillin / Streptomycin
PK	Proteinase k
PrP ^{0/0}	PrP knockout Maus
PrP ^c	zelluläre Form des Prion Proteins
PRNP	Prion Protein Gen
PrP ^{Sc}	fehlgefaltete Form des Prion Proteins
PUFA	poly unsaturated fatty acid = mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RT	Raumtemperatur
SDS	Natiumdodecylsulfat
SFA	saturated fatty acid = gesättigte Fettsäure
SOD	Superoxiddismutase
STABW	Standardabweichung
TBA	Thiobarbitursäure
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
Tg	Transgen
TME	transmissible mink encephalopathy
TSE	transmissible spongiform encephalopathy
TTA	Thenoyltrifluoraceton
U	Units
Vit	Vitamin
WT	Wildtyp

9 Literatur

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1994) Molekularbiologie der Zelle. *VCH Weinheim Verlagsgesellschaft*
- Alper T., Haig D.A., Clarke M.C. (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22** 278-284
- Alper T., Cramp W., Haig D.A. and Clarke M.C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214** 764-766
- Ali B.H., Gayoum A.A.A., El Gawarsha K., Fakhri M. (1991) Lipid peroxidation, glutathione and ascorbic acid concentrations in tissues of mice treated with oltipraz: influence of cysteine and olive oil pretreatments. *Gen. Pharmacol.* **22** (5) 985-990
- Anderson R.G.W. (1993) Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5** 647-652
- Andrews NJ, Farrington CP, Cousens SN, Smith PG, Ward H, Knight RS, Ironside JW, Will RG. (2000) Incidence of variant Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **356** (9228) 481-482
- Andrus P.K., Fleck T.J., Gurney M.E., and Hall E.D. (1998) Protein oxidative damage in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* **71** (5), 2041-8
- Arola L., Palou A., Remesar X., and Alemany M. (1981) Glutamine Synthetase activity in the organs of fed and 24-hours fasted rats. *Horm. Metab. Res.* **13**, 199-202
- Baldwin M.A., Stahl N., Reinders L.G., Gibson B.W., Prusiner S.B., Burlingame A.L. (1990) Permethylated and tandem mass spectroscopy of oligosaccharides having free hexosamine: analysis of the glycoinositol phospholipid anchor glycan from the scrapie prion protein. *Anal. Biochem.* **191** 174-182
- Banati R.B., Schubert B., Rothe G., Gehrmann J., Rudolphi K., Valet G., Kreutzberg G.W. (1994) Modulation of intracellular formation of reactive oxygen intermediates in peritoneal macrophages and microglia / brain macrophages by propentofylline. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **14** 145-149
- Basler K., Oesch B., Scott M., Westaway D., Walchli M., Groth D.F., McKinley M.P., Prusiner S.B. and Weissmann C. (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46** 417-428
- Beckman J.S. (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **9** 836-844
- Benzie IF. (1996) Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **47** (3) 233-261

- Bessen R.A. and Marsh R.F. (1994) Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J. Virol.* **68** 7859-7868
- Borchelt D.R., Taraboulos A., Prusiner S.B. (1992) Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* **267** 16188-16199
- Borchelt D.R., Rogers M., Stahl N., Telling G. und Prusiner S.B. (1993) Release of the cellular prion protein from cultured cells after loss of its glycoinositol phospholipid anchor. *Glycobiology* **3** 319-330
- Brown D.R., Herms J., and Kretzschmar H.A. (1994) Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *NeuroReport* **5**, 2057-2060
- Brown D.R., Schmidt B., and Kretzschmar H.A. (1996) Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **380**, 345-347
- Brown D.R., Qin K., Herms J.W., Madlung A., Mansos M., Strome R., Fraser P.E., Kruck T., von Bohlen A., Schulz-Schaeffer W., Giese A., Westaway D., and Kretzschmar H.A. (1997 a) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**, 684-687
- Brown D.R., Schulz-Schaeffer W.J., Schmidt B., and Hans A. Kretzschmar (1997b) Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurology* **146**, 104-112
- Brown D.R. and Besinger A. (1998) Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem. J.* **334** 423-429
- Brown D.R., Wong B.S., Hafiz F., Clive C., Haswell S.J., and Jones I.M. (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem. Journal* **344**, 1-5
- Brown D.R., Clive C., Haswell S.J. (2001) Antioxidant activity related to copper binding of native prion protein. *Journal of neurochemistry* **76**, 69-76
- Brown P., Gibbs C.J., Amyx H.L., Kingsbury D.T., Rohwer R.G., Sulima M.P., Gajdusek D.C. (1982) Chemical disinfection of Creutzfeldt – Jakob disease virus. *N. Engl. J. Med.* **306** 1279-1282
- Bruce M.E., Dickinson A.G., Fraser H. (1976) Cerebral amyloidosis in scrapie in the mouse: effect of agent strain and mouse genotype. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2** 471-478
- Bruce M.E., McConnel I., Fraser H., and Dickinson A.G. (1991) The disease characteristics of different strains of scrapie in six congenic mouse lines. Complications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J. Gen. Virol.* **72** 595-604
- Bruce M.E. (1993) Scrapie strain variation and mutation *Brit. Med. Bull.* **49** 822-838

- Bruce M.E., McBride P.A., Jeffrey M., Scott J.R. (1994) PrP in pathology and pathogenesis in scrapie-infected mice. *Mol. Neurobiol.* **8** 105-112
- Bruce M.E., Will R.G., Ironside J.W., McConnel I., Drummond D., Suttie A., McCardle L., Chree A., Hope J., Birkett C., Cousens S., Fraser H., Bostock C.J. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389** 498-501
- Büeler 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
- Büeler 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** 1339-1347
- Butterfield D.A., Stadtman E.R. (1997) Protein oxidation processes in aging brain. *Adv. Cell Aging Gerontol.* **2** 161-191
- Butterfield D.A., Kanski J., (2001) Brain protection oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. *mechanisms of ageing and development* **122**, 945-962
- Campbell N.A. (1997) Biologie. *Spektrum Verlag*
- Caughey B., Raymond G.J. (1991) The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J.Biol. Chem.* **266** 18217-18223
- Caughey B., Raymond G.J., Callahan M.A., Wong C., Baron G.S., Xiong L.W. (2001) Interactions and conversions of prion protein isoforms. *Adv. Protein Chem.* **57** 139-169
- Chang W.J., Ying Y.S., Rothberg K.G., Hooper N.M., Turner A.J., Gambliel H.A., DeGuznburg J., Mumby S.M., Gilman A.G., Anderson R.G.W. (1994) Purification and characterization of smooth muscle caveolae. *J. Cell Biol.* **126** 127-138
- Chesebro B., Race R., Wehrly K., Nishio J., Bloom M., Lechner D., Bergstrom S., Robbins K., Mayer L., Keith J.M., et al. (1985) Identification of scrapie-prion protein specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315** 331-333
- Christen Y. (2000) Oxidative stress and Alzheimer`s disease. *Am. J. Clin. Nutr.* **71** 621-629
- Cohen G., Hochstein P. (1963) Glutathione Peroxidase: The primary agent for elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. *Biochemistry* **2** 1420-1428
- Collinge J., Whittington M.A., Sidle K.C.L., Smith C.J., Palmer M.S., Clarke A.R., Jeffrey J.G.R. (1994) Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature* **370** 295-297

- Colton G.A., Gilbert D.L. (1987) Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett.* **223** 284-288
- Coyle J.T., and Puttfarcken P. (1993) Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* **262**, 689-695
- Cuillé J., Chelle P.L. (1936) La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable ? *C R Acad. Sci.* **(III) 203** 1552-1554
- Creutzfeldt H.G. (1920) Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* **57** 1-18
- Davis E.J., Foster T.D., Thomas W.E. (1994) Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res. Bull.* **34** 73-78
- DeArmond S.J., Yang S.L., Lee A., Bowler R., Taraboulos A., Groth D. and Prusiner S.B. (1993) Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** 6449-6453
- Douglas K.T. (1986) Mechanism of action of glutathione dependent enzymes. *Adv. Enzymol.* **59** 103-167
- Edenhofer F., Rieger R., Famulok M., Wendler W., Weiss S., Winnacker E.L. (1996) Prion Protein PrPc interacts with molecular Chaperones of the Hsp60-family. *J. Virol.* **70** 4724
- Eigen M. (1996) Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophysical Chemistry* **63** A1-A18
- 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
- Epp O., Ladenstein R., Wendel A. (1983) The refined structure of the Selenoenzyme Glutathione Peroxidase at 0,2-nm resolution. *Eur. J. Biochem.* **133** 51-69
- Fagan J.M., Bogdan G.S., and Sohar I. (1998) Quantitation of oxidative damage to tissue proteins. *JBC* **31**, 751-757
- Finckh B., Kontush A., Commentz J., Hubner C., Burdelski M., and Kohlschutter A. (1999) High-performance liquid chromatography-coulometric electrochemical detection of ubiquinol 10, ubiquinone 10, carotenoids, and tocopherols in neonatal plasma. *Methods Enzymol* **299**, 341-348
- Fischer M., Rüllicke T., Raeber A., Sailer A., Moser M., Oesch B., Brandtner S., Aguzzi A., Weissmann C. (1996) Prion protein (PrP) with amino-proximal deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie. *EMBO J.* **15** 1255-1264

- Flechsigg E., Shmerling D., Hegyi I., Raeber A.J., Mering C., Aguzzi A., Weissmann C. (2000) Prion protein devoid of the octapeptide region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron* **27** 399-408
- Forloni G., Angeretti N., Chiesa R., Monzani E., Salmona M., Bugiani O., Tagliavini F. (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **362** 534-546
- Fraser H. (1993) Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals. *Brit. Med. Bull.* **49** 792-809
- Freeman B.A., Crapo J.D. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **47** 412-426
- Fridovich I. (1986) Superoxide Dismutases. *Advan. Enzymol.* **58** 61-97
- Gajdusek D.C., Gibbs C.J., Alpers M. (1966) Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209** 794-796
- Gibbs C.J., Gajdusek D.C., Asher D.M., Alpers M.P., Beck E., Daniel P.M., Mathews W.B. (1968) Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* **161** 388-389
- Giese A., Groschup M.H., Hess B., Kretzschmar H.A. (1995) Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol.* **5** 213-221
- Giese A., Brown D.R., Groschup M.H., Feldmann C., Haist I., Kretzschmar H.A. (1998) Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol.* **8** 449-457
- Giese A. und Kretzschmar H.A. (2001) Prion-induced neuronal damage- The mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Current topics in Microbiology and Immunology* **253** 203-217
- Giulivi C., Boveris A., Cadenas E. (1995) Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* **316** (2) 909-916
- Griffith J.S. (1967) Self-replication and scrapie. *Nature* **215** 1043-1044
- Griffith O.W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-Vinylpyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207-212
- Guentchev M., Voigtlander T., Haberler C., Groschup M.H., and Budka H. (2000) Evidence for oxidative stress in experimental prion disease. *Neurobiol. Dis.* **7**, 270-273
- Harris D.A., Falls D.L., Johnson F.A., Fischbach G.D. (1991) A prion-like protein from chicken brain copurifies with an acetylcholine receptor-inducing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** 7664-7668

- Harris D.A., Huber M.T., van Dijken P., Shyng S.L., Chait B.T., Wang R. (1993) Processing of a cellular prion protein: identification of N- and C-terminal cleavage sites. *Biochemistry* **32** 1009-1016
- Harris D.A., Gorondinsky A., Lehmann S., Moulder K. and Shyng S.L. (1996) Cell biology of the prion protein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **207** 77-93
- Harris D.A. (2001) Biosynthesis and cellular processing of the prion protein. *Adv. Protein Chem.* **57** 203-228
- Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schurmann P, Windl O, Brose N, Kretzschmar H. (1999) Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci.* **15** 19 (20) 8866-8875
- Herms J.W., Korte S., Gall S., Schneider I., Dunker S. und Kretzschmar H.A. (2000) Altered intracellular calcium homeostasis in cerebellar granule cells of prion protein- deficient mice. *J.Neurochem.* **75** (4) 1487-1492
- Hissin P.J., and Hilf R. (1976) A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* **74**, 214-226
- Hoernlimann B., Riesner D. und Kretzschmar H.A. (2001) Prionen und Prionerkrankungen. *De Gruyter Berlin*
- Hornshaw M.P., McDermott J.R., Candy J.M. (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **207** 621-629
- Jakob A. (1921) Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befund (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* **70** 132-146
- Karplus P.A., Schultz G.E. (1987) Refined structure of glutathione reductase at 1,54 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **195** 701-729
- Klamt F., Dal-Pizzol F., Conte da Frota M.L., Walz R., Andrades M.E., Da Silva E.G., Brentani R.R., Izquierdo I. and Moreira J.C.F. (2001) Imbalance of antioxidant defense in mice lacking cellular prion protein. *Free Rad. Biol. & Med.* **30** (10) 1137-1144
- Kontush A., Meyer S., Finckh B., Kohlschutter A., and Beisiegel U. (1996) Alpha-tocopherol as a reductant for Cu(II) in human lipoproteins. Triggering role in the initiation of lipoprotein oxidation. *J Biol Chem* **271**, 11106-11112.
- Kramer M.L., Kratzin H.D., Schmidt B., Römer A., Windl O., Liemann S., Hornemann S. und Kretzschmar H.A. (2001) Prion protein binds copper within the physiological range. *J. Biol. Chem.* **276** (20) 16711-16719

- Krasemann S., Groschup M.H., Harmeyer S., Hunsmann G., Bodemer W. (1996) Generation of monoclonal antibodies against human prion proteins in PrP^{0/0} mice. *Molecular Medicine* **2** 725-734
- Kretzschmar H.A., Prusiner S.B., Stowring L.E., DeArmond S.J. (1986) Scrapie proteins are synthesized in neurons. *Am. J. Pathol.* **122** 1-5
- Kretzschmar H.A., Honold G., Seitelberger F., Feucht M., Wessely P., Mehraein P., Budka H. (1991) Prion protein mutation in family first reported by Gerstmann, Strüssler, and Scheinker. *Lancet* **337** 1160
- Kretzschmar H.A., Giese A., Brown D.R., Herms J., Keller B., Schmidt B., Groschup M (1997) Cell death in prion disease. *J. Neural. Transm. (Suppl.)* **50** 191-210
- Kunz B., Sandmeier E., Christen P. (1999) Neurotoxicity of prion peptide 106-126 not confirmed. *FEBS Letters* **458**, 65-68
- Kurschner C., Morgan J.I. (1995) The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **30** 165
- Lansbury PT Jr, Caughey B. (1995) The chemistry of scrapie infection: implications of the 'ice 9' metaphor. *Chem Biol.* **2** (1) 1-5
- Lehmann S., Milhavet O., Mangé A. (1999) Trafficking of the cellular isoform of the prion protein. *Biomed & Pharmacother* **53** 39-46
- Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., and Stadtman E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* **186**, 464-78
- Lipton S.A., Rosenberg P.A. (1994) Excitatory amino acids as final common pathway for neurologic disorders. *New Engl Med* **330** 613-622
- Löffler G. und Petrides P.E. (1998) Biochemie und Pathobiochemie. *Springer Verlag*
- Low M.G. (1989) The glycosyl-phosphatidyl anchor of membrane proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* **988** 427-454
- Massagué J. (1990) Transforming growth factor α : a model for membrane-anchored growth factors. *J. Biol. Chem.* **265** 21393-21396
- Markesbery W.R., Carney J.M. (1999) Oxidative alterations in Alzheimer's disease. *Brain Path.* **9** 133-146
- Marklund S. (1976) Spectrophotometric study of spontaneous disproportionation of superoxide anion radical and sensitive direct assay for superoxide dismutase. *JBC* **251** (23) 7504-7507
- McKinley M.P., Taraboulos A., Kenaga L., Serban D., Stieber A., DeArmond S.J., Prusiner S.B., Gonatas N. (1991) Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab. Invest.* **65** 622-630

- Meier B., Sehn A.P., Michel C., and Saran M. (1994) Reactions of hydrogen peroxide with superoxide dismutase from *Propionibacterium shermanii*- an enzyme which is equally active with iron or manganese- are independent of the prothetic metal. *Arch. Biochem. Biophys.* **313**, No. 2, 296-303
- Meister A. (1983) Selective modification of Glutathione Metabolism, *Science* **220** 472-477
- Milhavet O., McMahon H.E.M., Rachidi W., Nishida N., Katamine S., Mange A., Arlotto M., Casanova D., Riondel J., Favier A., and Lehmann S. (2000) Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress *PNAS* **97** (25) 13937-13942
- Moore R.C., Hope J., McBride P.A., McConnel I., Selfridge J., Melton D.W., Manson J.C. (1998) Mice with gene targetted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent. *Nat. Genet.* **18** 118-125
- Müller W.E.G. et al. (1993) Cytoprotective effect of NMDA receptor antagonists on prion protein gene (PrionSc)-induced toxicity in rat cortical cell cultures. *Eur. J. Pharmacol.* **246** 261-267
- Multhaup G., Ruppert T., Schlicksupp A., Hesse L., Behr D., Masters C.L., and Beyreuther K. (1997) Reactive oxygen species and Alzheimer`s disease. *Biochem. Pharmacol.* **54**, 533-539
- Oberley L.W., and Spitz D.R. (1984) Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol.* **105**, 457-464
- Oesch B., Westaway D., Wälchli M., McKinley M.P., Kent S.B.H., Aebersold R., Barry R.A., Tempst P., Teplow D.B., Hood L.E., et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40** 735-746
- Omaye S. T., Turnbull J. D., and Sauberlich H. E. (1979) Selected methods for the determination of ascorbic acid in animal cells, tissues, and fluids. *Methods Enzymol* **623-11**, -11.
- Padh H. (1990) Cellular functions of ascorbic acid. *Biochem. Cell. Biol.* **68** 1166-1173
- Pan K.M., Stahl N., Prusiner S.B. (1992) Purification and properties of the cellular prion protein from syrian hamster brain. *Protein Sci.* **1** 1343-1352
- Pan K.M., Baldwin M., Nguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fetterick R.J., Cohen F.E. et al. (1993) Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** 10962-10966
- Parchi P., Giese A., Capellari S., Brown P., Schulz-Schaeffer W., Windl O., Zerr I., Budka H., Kopp N., Piccardo P., Poser S., Rojiani A., Streichemberger N., Julien J., Vital C., Ghetti B., Gambetti P., Kretschmar H.A. (1999) Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann. Neurol.* **46** 224-233

- Pauly PC, Harris DA. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem.* **273** (50) 33107-10.
- Perovic S., Schröder H.C., Pergande G., Ushijima H., Müller W.E.G. (1997) Effect of flurpirtine on BCL-2 and Glutathione level in neuronal cells treated in vitro with the prion protein fragment (PrP 106-126). *Exp. Neurol.* **147** 518-524
- Persky A.M., Green P.S., Stublely L., Howell C.O., Zaulyanov L., Brazeau G.A., and Simpkins J.W. (2000) Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **223** (1) 59-66
- Peyrin J.M., Lasmezas C.I., Haik S., Tagliavini F., Salmona M., Williams A., Richie D., Deslys J.P., and Dormont D. (1999) Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines. *Neuroreport* **10** (4), 732-9
- Pflaum M., Will O., Epe B. (1997) Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis* **18** (11) 2225-2231
- Prince R.C., Gunson D.E. (1993) Rising interest in nitric oxide synthase. *TIBS* **18** 35-36
- Prohaska J.R. (1983) Changes in tissue growth, concentrations of copper, iron, cytochrome oxidase and superoxide dismutase subsequent to dietary or genetic copper deficiency in mice. *J. Nutr.* **113** 2048- 2058
- Prusiner S.B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216** 136-144
- Prusiner S.B., McKinley M.P., Bowman K.A., Bolton D.C., Bendheim 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. (1993) Genetic and infectious prion diseases. *Arch. Neurol.* **50** 1129-1153
- Prusiner S.B. (1996) Prions Prions Prions. *Springer Verlag*
- Prusiner S.B. (1998) Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95** 13363-13383
- Radak Z., Asano K., Fu Y., Nakamura A., Nakamoto H., Ohno H., and Goto S. (1998) The effect of high altitude and caloric restriction on reactive carbonyl derivatives and activity of glutamine synthetase in rat brain. *Life Sci.* **62** (15) 1317-22
- Rieger R., Edenhofer F., Lasmezas C.I., Weiss S. (1997) The human 37 kDa laminin receptor precursor interacts with the prion protein in eukaryotic cells. *Nat. Med.* **3** 1383
- Riek R., Hornemann S., Wider G., Glockshuber R., Wüthrich K (1996) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP (23-231). *FEBS Lett.* **413** 282-288

- Riesner D., Kellings K., Wiese U., Wulfert M., Miranda C., Prusiner S.B. (1993) Prions and nucleic acids: search for 'residual' nucleic acids and screening for mutations in the PrP-gene. *Dev. Biol. Stand.* **80** 173-181
- Rothberg K.G., Heuser J., Donzell W.C., Ying Y.S., Glenn J.R., Anderson R.G.W. (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **68** 673-682
- Sachs Angewandte Statistik 8.Auflage *Springer Verlag* ISB N:3-540-60494-4
- Schätzl H.M., Da Costa M., Taylor L., Cohen F., Prusiner S.B. (1995) Prion protein gene variation among primates. *J. Mol. Biol.* **245** 362-374
- Shmerling D., Hegyi I., Fischer M., Blattler T., Brandner S., Gotz J., Rulicke T., Flechsig E., Cozzio A., von Mering C., Hangartner C., Aguzzi A., and Weissmann C. (1998) Expression of amino-terminally truncated PrP in the mouse leading to ataxia and specific cerebellar lesions. *Cell* **93** (2), 203-14
- Shyng S.L., Huber M.T. und Harris D.A. (1993) A prion protein cycles between the cell surface and an endocytic compartment in cultured neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **268** 15922-15928
- Shyng S.L., Heuser J.E. und Harris D.A. (1994) A glycolipid-anchored prion protein is endocytosed via clathrin-coated pits. *J. Cell Biol.* **125** 1239-1250
- Shyng S.L., Moulder K.L., Lesko A. und Harris D.A. (1995) The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *J. Biol. Chem.* **270** 14793-14800
- Sies H. (1993) Efficiency of vitamin E in the human. *VERIS, the Vitamin E Research and Information Service. VERIS, La Grange*
- Sigurdarson B. (1954) A chronic encephalitis of sheep- with general remarks on infectins which develop slowly and some of their special characteristics. *B. Vet. J.* **110** 341-354
- Slater T.F. (1984) Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* **105**, 283-299
- Smith M.A., Rottkamp C.A., Nunomura A., Raina A.K., and Perry G. (2000) Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1502** 139-144
- Sommerville R.A., Chong A., Mulqueen O.U., Birkett C.R., Wood S.C.E.R., Hope J. (1997) Biochemical typing of scrapie strains. *Nature* **386** 564
- Spitz D.R. and Oberley L.W. (1989) An assay for superoxide dismutase in mammalian tissue homogenates. *Anal. Biochem.* **179** 8-18
- Stadtman E.R., Ginsburg A. (1974) The Glutamine Synthetase of *Escherichia coli*: Structure and control. *The Enzymes 3.Aufl. London/New York (Academic Press)* **10** 755-807

- Stahl N., Borchelt D.R., Hsiao K., Prusiner S.B. (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51** 229-240
- Streit W.J., Kreutzberg G.W. (1988) Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J Comp. Neurol.* **268** 248-263
- Stryer L. (1994) *Biochemie. Spektrum Verlag*
- Tagliavini F., Forloni G., D'Ursi P., Bugiani O., Salmona M. (2001) Studies on peptide fragments of prion proteins. *Adv. Protein Chem.* **57** 171-201
- Tainer J.A., Getzoff E.D., Richardson J.S., Richardson D.C. (1983) Structure and Mechanism of Cu,Zn Superoxide Dismutase. *Nature* **306** 284-287
- Tanaka M., Sotomatsu A., Yoshida T., Hirai S., Nishida A (1994) Detection of superoxide production by activated microglia using a sensitive and specific chemiluminescence assay and microglia-mediated PC12h cell death. *J. Neurochem.* **63** 266-270
- Taraboulos A., Serban D., Prusiner S.B. (1990) Scrapie prion proteins accumulate in the cytoplasm of persistently infected cultured cells. *J. Cell Biol.* **110** 2117-2132
- Taraboulos A., Raeber A.J., Borchelt D.R., Serban D., Prusiner S.B. (1992) Synthesis and trafficking of prion proteins in cultured cells. *Mol. Biol. of the Cell* **3** 851-863
- Taraboulos A., Scott M., Semenov A., Avrahami D., Laszlo L., Prusiner S.B. (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell Biol.* **129** 121-132
- Tateishi J., Hikita K., Kitamoto T. und Nagara N. (1987) Experimental Creutzfeldt-Jakob disease: induction of amyloid plaques in rodents. In: Novel Infectious Pathogens Causing Scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. (Prusiner S.B. und M. McKinley; Hrsg) *Academic Press, Orlando, USA* S.451-465
- Tateishi J., Brown P., Kitamoto T., Hoque Z.M., Roos R., Wollman R., Cerevenakova L. und Gajdusek D.C. (1995) First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature* **376** 434-435
- Taylor DM, Fraser H, McConnell I, Brown DA, Brown KL, Lamza KA, Smith GR. (1994) Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch Virol.* **139** (3-4) 313-326
- Teare J.P., PUNCHARD N.A., POWELL J.J., LUMB P.J., MITCHELL W.D., and THOMPSON R.P.H. (1993) Automated spectrophotometric method for determining oxidized and reduced glutathione in liver. *Clin. Chem.* **39** (4) 686-689
- Towbridge I.S., Collawn J.F., Hopkins C.R. (1993) Signal-dependent membrane protein trafficking in the endocytic pathway. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9** 129-161

- Varadarajan S., Yatin S., Aksenova M., and Butterfield D.A. (2000) Review: Alzheimer's amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress and neurotoxicity. *J. Struct. Biol.* **130** (2-3) 184-208
- Voet D. und Voet J.G. (1994) Biochemie. *VCH Weinheim Verlag*
- Vorhaben J.E., Wong L., and Campbell J.W. (1973) Assay for Glutamine activity. *Biochem J.* **135** 893-896
- Waggoner D.J., Drisaldi B., Bartnikas T.B., Casareno R.L.B., Prohaska J.R., Gitlin J.D., and Harris D.A. (2000) Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *JBC* **275** (11) 7455-7458
- Weissmann C. (1991) Spongiform encephalopathies. The Prion's progress. *Nature* **349** 569-571
- Weissmann C., Fischer M., Raeber A., Bueler H., Sailer A., Shmerling D., Rulicke T., Brandner S., Aguzzi A. (1998) The use of transgenic mice in the investigation of transmissible spongiform encephalopathies. *Rev. Sci. Tech.* **17** (1), 278-90
- White A.R., Collins S.J., Maher F., Jobling M.F., Stewart L.R., Thyer J.M., Beyreuther K., Masters C.L. und Cappai R. (1999) Prion protein-deficient Neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen Peroxide Toxicity. *Am. J. Pathol.* **155** (5) 1723-1730
- Whittal R.M., Ball H.L., Cohen F.E., Burlingame A.I., Prusiner s.B. and Baldwin M.A. (2000) Copper binding to octarepeat peptides of the prion protein monitored by mass spectrometry. *Protein Sci* **9** (2) 332-43
- Will R.G., Ironside J.W., Zeidler M., Cousens S.N., Estibeiro K., Alpertovitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofman A., und Smith P.G. (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom. *Lancet* **347** 921-925
- Will RG, Zeidler M, Stewart GE, Macleod MA, Ironside JW, Cousens SN, Mackenzie J, Estibeiro K, Green AJ, Knight RS. (2000) Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* **47** (5) 575-582
- Wong B.S., Pan T., Liu T., Li R., Gambetti P., and Sy MS (2000) Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273** (1) 136-139
- Wong B.S., Liu T., Ri R., Pan T., Petersen R.P., Smith M.A., Gambetti P., Perry G., Manson J.C., Brown D.R., and Sy M.S. (2001 a) Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *Journal of Neurochemistry* **76**, 565-572
- Wong B.S., Liu T., Paisley D., Li R., Pan T., Chen S.G., Perry G., Petersen R.B., Smith M.A., Melton D.W., Gambetti P., Brown D.R., and Sy M.S. (2001 b) Induction of HO-1 and NOS in Doppel-Expressing mice devoid of PrP: Implications for Doppel Function. *Mol. Cell. Neurosci.* **17**, 768-775

10 Anhang: Zahlenwerte der gemessenen Parameter

10.1 Methodenüberprüfung durch Messung unterschiedlicher Proteinmengen

gesamt Glutathion	GSH [μg]	STABW GSH [μg]
75 μl	0,488	0,014
100 μl	0,639	0,040
100 μl + 0,5 μg GSH	1,238	0,122
100 μl + 0,5 μg GSSG	0,423	0,079
oxidiertes Glutathion	GSSG [Abs]	STABW GSSG [Abs]
75 μl	0,01386	0,00003
100 μl	0,01483	0,00059
100 μl + 0,5 μg GSH	0,01431	0,00055
100 μl + 0,5 μg GSSG	0,01773	0,00123
Glutathion Reduktase	GR [U]	STABW GR [U]
25 μl	0,017871	0,006277236
50 μl	0,032545	0,006995401
25 μl + 0,004 U	0,023767	0,006215184
Glutathion Peroxidase	GPx [U]	STABW GPx [U]
10 μl	0,002789	0,000310
20 μl	0,004482	0,000657
10 μl + 0,002 U	0,004294	0,000609
20 μl + 0,002 U	0,006615	0,000810
Glutamin Synthetase	Gln Syn [U]	STABW GlnSyn [U]
25 μg	0,12559369	0,00194401
25 μg + 0,01 U	0,13856287	0,00263004
40 μg	0,19369549	0,00175076
40 μg + 0,01 U	0,21562665	0,00252139

10.2 Zahlenwerte der verschiedenen Eichgeraden

Eichgerade Superoxid Dismutase [U]	Inhibition [%]	STABW Inhibition [%]
0,00	0,00	0,00
0,02	31,11	8,71
0,04	54,21	7,81
0,06	69,73	5,38
0,08	78,18	5,87
0,10	84,14	5,71

Eichgerade GSH [µg]	GSH [Abs]	STABW GSH [Abs]
0,000	0,00000	0,00000
0,125	0,00363	0,00022
0,250	0,00716	0,00026
0,500	0,01215	0,00057
1,000	0,02459	0,00023
2,000	0,04854	0,00413
4,000	0,09316	0,01835

Eichgerade Glutathion Reduktase [U]	Abs/Min	STABW Abs/Min
0,000	0,0000000	0,0000000
0,005	- 0,0001950	0,0000071
0,010	- 0,0003450	0,0000636
0,020	- 0,0005617	0,0000872
0,030	- 0,0008450	0,0001249
0,040	- 0,0011617	0,0002899

Eichgerade Glutathion Peroxidase [U]	Abs/Min	STABW Abs/Min
0,00	0,00000	0,00000
0,01	-0,03990	0,00594
0,02	-0,09770	0,01344
0,03	-0,16120	0,01923

Eichgerade Glutamin Synthetase [U]	Abs	STABW Abs
0,00	0,0000	0,0000
0,10	0,1166	0,0045
0,15	0,1713	0,0036
0,20	0,2088	0,0014
0,30	0,2754	0,0436

10.3 Zahlenwerte der gemessenen Parameter in N2a-Zellen

	MTT [Prozent]	ges. SOD [% Inhibition]	SOD-1 [% Inhibition]	Mn-SOD [% Inhibition]	GSH [µg/g tissue]	GR in U/g Protein	GPX in U/g Protein	TBARS in Abs	ProtCarb in nmol/mg Protein	GlnSyn in U/mg Protein
ohne 1	100,00	22,27	20,45	1,82	690,20	244,58	3,14	0,0288	3,5485333	2,44
ohne 2	100,00	21,46	16,73	4,73	542,71	250,42	2,84	0,0206	3,4892333	2,28
ohne 3	100,00	22,67	20,13	2,55	426,92	231,58	4,06	0,0210	3,9321182	2,58
H2O2 1	32,55	5,67	4,58	1,09	171,63	972,78	-2,23	0,0317	5,5187000	4,21
H2O2 2	51,64	4,05	7,32	-3,27	144,84	1465,06	-0,01	0,0294	5,0131212	4,50
H2O2 3	41,94	0,00	-0,36	0,36	146,99	334,28	-2,46	0,0286	6,1514606	4,39

	MTT [Prozent]	ges. SOD [% Inhibition]	SOD-1 [% Inhibition]	Mn-SOD [% Inhibition]	GSH [µg/g tissue]	GR in U/g Protein	GPX in U/g Protein	TBARS in Abs	ProtCarb in nmol/mg Protein	GlnSyn in U/mg Protein
ohne	100,00	22,13	19,10	3,03	553,28	242,19	3,35	0,0235	3,65663	2,43
H2O2	37,56	3,24	3,84	-0,61	154,49	924,04	-1,57	0,0299	5,56109	4,37

	STABW MTT [Prozent]	STABW ges. SOD [% Inhibition]	STABW SOD-1 [% Inhibition]	STABW Mn-SOD [% Inhibition]	STABW GSH [µg/g tissue]	STABW GR in U/g Protein	STABW GPX in U/g Protein	STABW TBARS in Abs	STABW ProtCarb in nmol/mg Protein	STABW GlnSyn in U/mg Protein
ohne	0,00	0,61843	2,06030	1,51394	131,96	9,65	0,63	0,0046	0,24042	0,15
H2O2	7,92	2,91947	3,89444	2,33785	14,88	566,97	1,36	0,0016	0,57035	0,14

10.4 Zahlenwerte der gemessenen Parameter in transgenen Tieren

	ges. SOD [% Inhibition]	SOD-1 [% Inhibition]	Mn-SOD [% Inhibition]	GSH [µg/g tissue]	GR in U/g Protein	GPX in U/g Protein	TBARS in Abs	ProtCarb in nmol/mg Protein	GlnSyn in U/mg Protein
Wildtyp 1	68,06	34,72	33,33	6156,85	47,401		0,0175	1,27	11,54
Wildtyp 2	65,28	14,66	50,62	6441,49	57,078		0,0170	1,83	12,15
Wildtyp 3	53,62	21,88	31,75	6441,84	62,180	10,63	0,0185	1,25	11,34
Wildtyp 4	56,52	16,84	39,68	6623,44	52,152	9,43	0,0200	1,03	11,66
Wildtyp 5	64,18	64,18	0,00	6877,70	54,238	11,45	0,0225	1,39	11,36
Wildtyp 6	58,21	32,63	25,58	6484,41	37,887	10,97	0,0150	1,14	11,89
PrP 0 1	44,44	6,17	38,27	6176,89	45,740	9,02	0,0195	1,28	9,91
PrP 0 2	58,33	11,42	46,91	6214,72	43,906	8,63	0,0155	1,34	9,72
PrP 0 3	49,28	22,29	26,98	6253,03	49,975		0,0160	1,18	11,47
PrP 0 4	53,62	21,88	31,75	6627,05	54,918		0,0185	1,36	11,46
PrP 0 5	59,70	55,05	4,65	6635,27	56,175	10,23	0,0190	2,02	13,44
PrP 0 6	55,22	55,22	0,00	6551,27	54,482	9,48	0,0210	1,12	12,32
C4 1	51,39	34,10	17,28	6742,21	39,067		0,0225	1,31	8,84
C4 2	55,56	13,58	41,98	7008,93	35,955		0,0275	1,68	8,47
C4 3	46,38	19,39	26,98	6642,42	42,146	8,89	0,0180	1,53	10,50
C4 4	62,32	28,99	33,33	6692,85	47,975	12,56	0,0165	1,63	11,91
C4 5	56,72	38,11	18,60	6746,11	53,041	11,70	0,0180	1,91	11,33
C4 6	55,22	24,99	30,23	6641,71	43,140	12,82	0,0185	1,40	11,61
Tg 35 1	61,11	35,19	25,93	5054,53	53,648		0,0145	1,59	13,69
Tg 35 2	55,56	32,10	23,46	6454,73	47,915		0,0215	0,93	10,98
Tg 35 3	47,83	24,01	23,81	6282,41	42,929	9,66	0,0215	1,31	10,74
Tg 35 4	53,62	17,12	36,51	6491,21	52,776	10,34	0,0195	1,65	11,85
Tg 35 5	53,73	39,78	13,95	6709,28	41,706	9,93	0,0200	1,76	11,07
Tg 35 6	58,21	37,28	20,93	6542,70	54,875	9,47	0,0205	1,61	10,37

	ges. SOD [% Inhibition]	SOD-1 [% Inhibition]	Mn-SOD [% Inhibition]	GSH [µg/g tissue]	GR in U/g Protein	GPX in U/g Protein	TBARS in Abs	ProtCarb in nmol/mg Protein	GlnSyn in U/mg Protein
Wildtyp	60,98	30,82	30,16	6504,289	51,8228932	10,6189	0,0184	1,32	11,66
PrP 0	53,43	28,67	24,76	6409,704	50,8659567	9,3425	0,0183	1,38	11,38
C4	54,60	26,53	28,07	6745,705	44,1170168	11,4934	0,0202	1,58	10,44
Tg 35	55,01	30,91	24,10	6255,811	48,9747434	9,8509	0,0196	1,47	11,46

	STABW ges. SOD [% Inhibition]	STABW SOD-1 [% Inhibition]	STABW Mn-SOD [% Inhibition]	STABW GSH [µg/g tissue]	STABW GR in U/g Protein	STABW GPX in U/g Protein	STABW TBARS in Abs	STABW ProtCarb in nmol/mg Protein	STABW GlnSyn in U/mg Protein
Wildtyp	5,67	18,26	17,04	237,73	15,5291934	0,8649	0,0026	0,28	0,32
PrP 0	5,74	21,41	18,68	216,76	8,78885753	0,6877	0,0021	0,33	1,42
C4	5,35	9,15	9,31	136,81	12,2285939	1,7986	0,0041	0,21	1,47
Tg 35	4,54	8,68	7,36	604,43	8,74989344	0,3766	0,0026	0,31	1,20

10.5 Zahlenwerte der gemessenen Parameter in E 57- und F 35- Tieren

	ges. SOD [% Inhibition]	SOD-1 [% Inhibition]	Mn-SOD [% Inhibition]	GSH [µg/g tissue]	GR in U/g Protein	GPX in U/g Protein	TBARS in Abs	ProtCarb in nmol/mg Protein	GlnSyn in U/mg Protein
O1	26,67	2,57	24,10	472,15	99,00	13,68	0,0192107	1,642	3,98
O2	39,26	19,38	19,88	528,43	85,37	15,07	0,0202870	1,116	3,88
O3	34,07	12,39	21,69	415,48	84,17		0,0155273	1,306	4,07
O4	37,78	14,28	23,49	430,05	84,55		0,0265293	1,215	3,61
E1	34,07	8,77	25,30	375,81	96,36	15,44	0,0153023	1,348	3,68
E2	34,81	7,71	27,11	412,89	98,93	14,83	0,0169363	1,384	3,90
E3	37,78	13,68	24,10	460,19	84,67	13,53	0,0215507	1,564	3,61
E4	35,56	7,84	27,71	481,58	79,24	15,78	0,0227487	1,034	3,80
F1	37,78	8,86	28,92	448,28	122,57	14,99	0,0174763	0,892	3,85
F2	37,78	24,52	13,25	402,55	94,87	14,00	0,0147467	0,832	4,19
F3	34,07	19,62	14,46	343,39	109,69	12,33	0,0122860	1,306	4,50
F4	14,07	0,82	13,25	453,30	77,71	13,31	0,0242367	0,879	4,20

	ges. SOD [% Inhibition]	SOD-1 [% Inhibition]	Mn-SOD [% Inhibition]	GSH [µg/g tissue]	GR in U/g Protein	GPX in U/g Protein	TBARS in Abs	ProtCarb in nmol/mg Protein	GlnSyn in U/mg Protein
PrP 0	34,44	12,16	22,29	461,53	88,27	14,37	0,0203885	1,320	3,89
E	35,56	9,50	26,05	432,62	89,80	14,89	0,0191345	1,246	3,75
F	30,93	13,46	17,47	411,88	101,21	13,66	0,0171864	1,313	4,18

	STABW ges. SOD [% Inhibition]	STABW SOD-1 [% Inhibition]	STABW Mn-SOD [% Inhibition]	STABW GSH [µg/g tissue]	STABW GR in U/g Protein	STABW GPX in U/g Protein	STABW TBARS in Abs	STABW ProtCarb in nmol/mg Protein	STABW GlnSyn in U/mg Protein
PrP 0	5,63	7,04	1,90	50,66	20,95	0,9866	0,00457305	0,2281	0,20
E	1,60	2,83	1,66	47,52	21,16	0,9909	0,00357852	0,1029	0,13
F	11,37	10,66	7,65	51,05	28,64	1,1236	0,00515611	0,0729	0,27

10.6 Zahlenwerte der gemessenen Parameter in Hamburg

	Ascorbat [µM]	a-Tocopherol [µM]	Cholesterol [µg/g tissue]	Gesamt Fettsäuren [mg/g tissue]	gesättigte Fettsäuren [%]	einfach ungesättigte Fettsäuren [%]	mehrfach ungesättigte Fettsäuren [%]
Wildtyp 1	1975,74	3,84	490,67	2199,26	42,80	21,86	35,34
Wildtyp 2	2208,15	5,25	387,00	2235,36	41,68	21,17	37,16
Wildtyp 3	2257,08	6,46	481,33	2671,82	41,44	21,33	37,23
Wildtyp 4	1877,88	5,81	535,33	2604,69	41,43	21,13	37,44
Wildtyp 5	1884,00	5,43	374,00	2196,05	41,31	20,77	37,92
Wildtyp 6	2214,27	5,69	400,33	2515,30	38,33	20,33	41,34
PrP 0 1	1205,11	4,29	308,33	2455,07	34,56	21,91	43,53
PrP 0 2	2526,19	6,22	360,00	3068,34	37,52	21,56	40,93
PrP 0 3	2691,33	6,07	420,00	2585,37	41,99	21,05	36,95
PrP 0 4	2330,47	5,06	431,00	2161,33	42,21	21,80	35,98
PrP 0 5	1994,09	6,42	309,00	2643,09	39,96	24,64	35,40
PrP 0 6	2043,02	5,62	345,00	3238,91	36,39	30,10	33,50
C4 1	2234,28	6,34	309,00	2375,51	40,30	23,15	36,55
C4 2	2399,95	3,07	484,00	2723,43	42,42	22,48	35,10
C4 3	2724,92	7,84	452,50	2733,66	42,25	22,04	35,71
C4 4	2425,44	6,42	384,67	2067,95	41,73	22,36	35,91
C4 5	2094,09	4,95	308,67	2107,14	41,77	21,49	36,74
C4 6	2183,30	6,89	297,33	2084,10	42,94	21,44	35,62
Tg 35 1	2689,69	8,13	398,33	2226,44	42,21	22,44	35,36
Tg 35 2	2683,62	8,33	383,00	2589,75	43,08	21,11	35,81
Tg 35 3	2355,68	6,01	365,00	2650,90	42,15	21,28	36,56
Tg 35 4	2713,98	6,48	313,00	2321,63	41,82	20,82	37,35
Tg 35 5	2222,07	7,47	341,00	2327,42	42,09	21,13	36,79
Tg 35 6	2325,31	5,51	327,00	2205,50	41,02	21,32	37,66
E1	2628,30	4,82	347,00	2159,63	41,40	22,10	36,50
E2	2358,25	7,07	312,33	2413,60	42,70	21,05	36,26
E3	2542,38	4,06	337,50	2605,02	41,50	21,30	37,20
E4	2781,74	4,69	348,50	2926,09	38,36	20,29	41,34
F1	2260,05	4,29	308,50	1676,68	41,04	22,89	36,07
F2	2438,04	6,49	408,50	2657,54	41,55	21,51	36,94
F3	2646,72	8,67	390,00	2642,71	41,96	20,95	37,10
F4	2462,59	8,42	379,50	2558,58	41,20	21,58	37,22

	Ascorbat [μ M]	a-Tocopherol [μ M]	Cholesterol [μ g/g tissue]	Gesamt Fettsäuren [mg/g tissue]	gesättigte Fettsäuren [%]	einfach ungesättigte Fettsäuren [%]	mehrfach ungesättigte Fettsäuren [%]
Wildtyp	2069,52	5,41	444,78	2403,74	41,17	21,10	37,74
PrP 0	2131,70	5,61	362,22	2692,02	38,77	23,51	37,72
C4	2343,66	5,92	372,69	2348,63	41,90	22,16	35,94
Tg 35	2498,39	6,99	354,56	2386,94	42,06	21,35	36,59
E	2577,67	5,16	336,33	2526,08	40,99	21,19	37,82
F	2451,85	6,97	371,63	2383,88	41,44	21,73	36,83

	STABW Ascorbat [μ M]	STABW a-Tocopherol [μ M]	STABW Cholesterol [μ g/g tissue]	STABW Gesamt Fettsäuren [mg/g tissue]	STABW gesättigte Fettsäuren [%]	STABW einfach ungesättigte Fettsäuren [%]	STABW mehrfach ungesättigte Fettsäuren [%]
Wildtyp	176,23	0,87	66,28	218,17	1,49	0,52	1,97
PrP 0	527,96	0,81	53,12	398,06	3,12	3,47	3,76
C4	225,91	1,68	80,92	315,13	0,90	0,65	0,61
Tg 35	220,94	1,16	33,18	188,31	0,66	0,56	0,88
E	176,63	1,32	16,72	323,10	1,85	0,75	2,38
F	158,18	2,03	43,76	473,47	0,41	0,82	0,52

10.7 Werte der gemessenen Parameter in einer Scrapie-Zeitverlaufsstudie

	ges. SOD [% Inhibition]	SOD-1 [% Inhibition]	Mn-SOD [% Inhibition]	GSH [µg/g tissue]	GR in U/g Protein	GPX in U/g Protein	TBARS in Abs	ProtCarb in nmol/mg Protein	GlnSyn in U/mg Protein
79 a 30 1	66,640	50,150	16,480	417,700	164,510	22,610	0,0232	1,669	5,00
79 a 30 2	58,480	61,920	-3,450	318,150	37,200	23,250	0,0168	1,173	3,60
79 a 60 1	74,610	42,340	32,270	312,700	81,360	21,570	0,0179	2,122	4,78
79 a 60 2	69,730	60,600	9,130	249,750	55,710	22,640	0,0167	1,916	3,68
79 a 90 1	76,900	50,190	26,720	349,220	268,710	21,630	0,0222	1,395	5,22
79 a 90 2	69,730	60,600	9,130	251,560	55,110	16,910	0,0168	,832	3,40
79 a 120 1	72,770	50,790	21,980	337,600	250,030	24,980	0,0365	1,692	5,74
79 a 120 2	0,000	0,000	0,000	341,210	104,330	32,440	0,0245	,940	5,42
79 a 150 1	76,250	52,660	23,590	282,550	218,380	28,690	0,0267	1,267	5,68
79 a 150 2	79,270	48,810	30,460	200,190	78,240	19,810	0,0277	1,049	3,64
ME 7 30 1	77,080	51,060	26,020	393,110	245,690	31,670	0,0257	1,320	4,84
ME 7 30 2	67,880	57,020	10,860	344,010	67,940	27,620	0,0123	1,166	3,82
ME 7 60 1	78,090	38,490	39,600	413,750	226,800	25,730	0,0201	1,374	5,42
ME 7 60 2	71,650	58,940	12,710	295,040	80,830	24,180	0,0128	,664	3,56
ME 7 90 1	78,920	41,220	37,700	325,840	191,660	23,140	0,0248	1,565	5,32
ME 7 90 2	69,730	60,470	9,260	229,320	106,610	24,980	0,0205	,682	3,82
ME 7 120 1	76,250	46,540	29,720	378,800	232,350	28,890	0,0337	1,539	5,66
ME 7 120 2	0,000	0,000	0,000	316,300	66,800	20,580	0,0194	1,263	4,46
ME 7 150 1	76,160	33,840	42,320	216,640	188,720	25,770	0,0244	1,446	5,78
ME 7 150 2	75,500	45,170	30,330	174,440	71,830	32,030	0,0326	1,058	3,50
Kto 30 1	74,610	43,030	31,580	373,570	166,850	27,630	0,0270	1,757	5,08
Kto 30 2	67,880	55,040	12,840	298,840	54,100	24,410	0,0127	1,251	4,56
Kto 60 1	77,910	41,880	36,030	289,240	210,270	22,440	0,0206	1,281	5,30
Kto 60 2	67,880	53,320	14,560	304,900	117,500	20,930	0,0136	,921	3,94
Kto 90 1	81,220	54,560	26,650	368,400	240,760	25,750	0,0226	1,413	5,50
Kto 90 2	73,650	50,210	23,440	216,910	38,910	19,580	0,0163	,749	3,62
Kto 120 1	0,000	0,000	0,000	366,960	203,290	0,000	0,0224	1,443	4,98
Kto 120 2	0,000	0,000	0,000	251,100	95,270	18,550	0,0109	,915	4,10
Kto 150 1	50,800	4,790	46,020	242,450	220,730	28,470	0,0216	1,862	5,54
Kto 150 2	79,200	47,020	32,180	212,340	66,550	16,430	0,0282	1,026	3,70

	ges. SOD [% Inhibition]	SOD-1 [% Inhibition]	Mn-SOD [% Inhibition]	GSH [µg/g tissue]	GR in U/g Protein	GPX in U/g Protein	TBARS in Abs	ProtCarb in nmol/mg Protein	GlnSyn in U/mg Protein
Kto 30	71,24	49,04	22,21	336,2	110,47	26,02	0,019882	1,5041379	4,82
Kto 60	72,9	47,6	25,29	297,07	163,88	21,69	0,017066	1,1014091	4,62
Kto 90	77,43	52,39	25,04	292,66	139,83	22,66	0,019445	1,081347	4,56
Kto 120	0	0	0	309,03	149,28	18,55	0,016658	1,179103	4,54
Kto 150	65	25,9	39,1	227,4	143,64	22,45	0,024866	1,4443394	4,62
79 A 30	62,56	56,04	6,52	367,93	100,86	22,93	0,020002	1,4206985	4,30
79 A 60	72,17	51,47	20,7	281,23	68,53	22,1	0,017319	2,0189152	4,22
79 A 90	73,32	55,39	17,92	300,39	161,91	19,27	0,019466	1,1130652	4,30
79 A 120	72,77	50,79	21,98	339,41	177,18	28,71	0,030535	1,3159667	5,58
79 A 150	77,76	50,74	27,03	241,37	148,31	24,25	0,027180	1,1582318	4,66
ME 7 30	72,48	54,04	18,44	368,56	156,81	29,65	0,019015	1,2430894	4,32
ME 7 60	74,87	48,72	26,16	354,39	153,81	24,95	0,016445	1,0189682	4,48
ME 7 90	74,33	50,84	23,48	277,58	149,13	24,06	0,022631	1,123347	4,56
ME 7 120	76,25	46,54	29,72	347,55	149,57	24,73	0,026521	1,4008061	5,06
ME 7 150	75,83	39,5	36,33	195,54	130,28	28,9	0,028492	1,2519909	4,64
	STABW ges. SOD [% Inhibition]	STABW SOD-1 [% Inhibition]	STABW Mn-SOD [% Inhibition]	STABW GSH [µg/g tissue]	STABW GR in U/g Protein	STABW GPX in U/g Protein	STABW TBARS in Abs	STABW ProtCarb in nmol/mg Protein	STABW GlnSyn in U/mg Protein
Kto 30	4,76	8,49	13,25	52,84	79,72	2,28	0,01010	0,3580639	0,38
Kto 60	7,1	8,08	15,18	11,07	65,6	1,07	0,00494	0,2546227	0,96
Kto 90	5,35	3,08	2,28	107,12	142,73	4,36	0,00450	0,4693368	1,34
Kto 120	0	0	0	81,93	76,38	0	0,00813	0,3734895	0,62
Kto 150	20,08	29,86	9,78	21,3	109,02	8,51	0,00466	0,5912655	1,28
79 A 30	5,77	8,32	14,09	70,39	90,02	0,45	0,00450	0,3504871	0,98
79 A 60	3,45	12,91	16,36	44,51	18,14	0,76	0,00089	0,1457668	0,76
79 A 90	5,07	7,36	12,43	69,06	151,04	3,33	0,00382	0,3981804	1,28
79 A 120	0	0	0	2,56	103,03	5,28	0,00848	0,5318	0,22
79 A 150	2,13	2,72	4,86	58,23	99,09	6,28	0,00070	0,1539757	1,44
ME 7 30	6,51	4,21	10,72	34,72	125,69	2,86	0,00949	0,1092823	0,72
ME 7 60	4,55	14,46	19,02	83,94	103,22	1,09	0,00517	0,501838	1,30
ME 7 90	6,5	13,61	20,11	68,25	60,14	1,3	0,00300	0,6245874	1,06
ME 7 120	0	0	0	44,19	117,06	5,88	0,01013	0,1949429	0,86
ME 7 150	0,47	8,01	8,48	29,84	82,65	4,43	0,00581	0,2743703	1,60

Lebenslauf

Familienname: Böll
Vorname: Inga
geb.: 10.02.1974, Essen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Bildungsgang:

1980 – 1984 Grundschule, Essen

1984 – 1993 B.M.V. Gymnasium Essen, Abitur

1993 – 1999 Studium der Biochemie, Universität Hannover

Nov. 1998 – Mai 1999 Diplomarbeit am Institut für Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Hochschule Hannover

Juni 1999 – Okt. 2001 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für
Neuropathologie der Georg-August-Universität
Göttingen und dem Institut für Neuropathologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Kretschmar für die freundliche Überlassung des Themas und den eingeräumten wissenschaftlichen Freiraum bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Dr. Armin Giese danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen und die Betreuung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W. H. Müller, für seine stetige Hilfsbereitschaft und seine Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für die freundliche Übernahme des Korreferats möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Resch recht herzlich bedanken.

Bei Dr. Sönke Arlt möchte ich mich für die freundliche Zusammenarbeit und die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen bedanken.

Allen Mitgliedern des Institutes für Neuropathologie in München sowie den ehemaligen Mitarbeitern des Institutes für Neuropathologie in Göttingen danke ich für den regen Gedankenaustausch bei experimentellen und theoretischen Problemen im Laboralltag.

Dank auch meinem Partner Mirko und allen guten Freunden, die immer für mich da waren.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichten und mich in allen Lebenslagen unterstützt haben.