

Zusammenfassung

Die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) zeigen Stammvariationen ähnlich wie normale Mikroorganismen. Diese Stammunterschiede werden als Folge von Strukturunterschiede bei der Faltung der PrP^{Sc}-Isoform des Prionproteins betrachtet. PrP^{Sc} entsteht durch posttranslationale Modifizierungen des zellulären Prionproteins (PrP^C) wobei angenommen wird, dass die einzige Komponente der Infektionseinheit das „Prion“ darstellt. Die Entwicklung einer zuverlässigen Methode für die Diskriminierung der einzelnen TSE-Erreger wie Scrapie, BSE und Creutzfeldt-Jakob- Krankheit (CJK) ist eine wichtige, noch immer ungelöste Aufgabe.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Möglichkeiten der Fouriertransform-Infrarot (FT-IR) Spektroskopie für die Charakterisierungen des PrP27-30, des Proteinase K resistenten Kernbereichs von PrP^{Sc} untersucht. Dabei wurden verschiedene FT-IR-Techniken eingesetzt, um die Sekundärstrukturunterschiede, Stabilität und das Wasserstoff-Deuterium Austauschverhalten des PrP27-30 von verschiedenen, auf den Goldhamster adaptierten TSE-Stämme zu untersuchen (263K, ME7-H, 22A-H und BSE-H). Jede dieser Varianten zeigte charakteristische Inkubationszeiten und spezifische Krankheitssymptome. Erstmals wurde die Möglichkeit der FT-IR-Spektroskopie, zwischen den einzelnen Stämmen unterscheiden zu können durch multivariate Clusteranalyse objektiv nachgewiesen. Darüber hinaus wurde die Sekundärstruktur des PrP27-30 anhand von Proben, die in H₂O oder D₂O resuspendiert waren, oder als Trockenproben vorlagen mit der FT-IR Technik vergleichend untersucht. Die temperaturabhängigen Sekundärstruktur-veränderungen und das H/D- Austauschverhalten von PrP27-30 der Stämme 263K, ME7-H und 22A-H wurden dabei in D₂O untersucht, und die Harnstoff-induzierten Strukturveränderungen des PrP27-30 vom 263K in Anwesenheit von 6M Harnstoff charakterisiert.

Die erarbeiteten Ergebnisse zeigten, dass die zweiten Ableitungen der FT-IR-Spektren der getrocknete, oder in H₂O bzw. D₂O suspendierten Proteinproben reproduzierbar stammspezifische spektrale Muster in der Sekundärstruktur-sensitiven Amid-I-Region aufweisen. Die Sekundärstrukturanalyse dieser Spektren belegte die Existenz stammspezifischer Konformationsunterschiede, die hauptsächlich auf unterschiedliche β -Faltblatt Strukturen zurückzuführen sind. Diese spektroskopischen Signaturen konnten durch zusätzliche stammspezifische, spektrale Charakteristika in den Amid-II- und Amid-A-Absorptionsregionen sowie durch verschiedene H/D-Austauschraten der einzelnen PrP27-30-Varianten ergänzt werden, wobei die Letzteren auf die unterschiedliche Flexibilität der

Zusammenfassung

Substrukturen des PrP27-30-Aggregates zurückgeführt wurden. Die Spektren dieser Prionaggregaten können somit als stammspezifische „Fingerabdrücke“ für die Bestimmung und Klassifizierung von TSE-Isolaten dienen. Die multivariate Clusteranalyse zeigte insbesondere, dass die stammspezifischen spektralen Unterschiede am besten in D₂O untersucht werden können.

Das hier entwickelte Vorgehen wurde schließlich auch für die Untersuchung von Unterschieden zwischen CJK-Proben in einem Set humaner Gehirnproben, bestehend aus Proben von sporadischer CJK und Kontrollen festzustellen angewendet. Diese Studien zeigten, dass eine sichere Unterscheidung zwischen den CJK-Stämmen infolge der unterschiedlichen Reinheit der Proben nicht möglich war. Eine Erklärung hierfür könnte eine ungenügende Homogenität der PrP27-30 Proben sein. Um den Einfluss von Proteinkontaminationen auf das Spektrum bei CJD-Proben auszuschließen, wären praktisch reine PrP27-30 Proben erforderlich.

FT-IR-Untersuchungen von PrP27-30 Proben der Stämme 263K, ME7-H und 22A-H, die bis auf 90°C erhitzt wurden, zeigten, dass die Hitzeresistenz der Proben von der thermischen Stabilität der Sekundärstruktur abhängt. Derartige Untersuchungen liefern eine zusätzliche Möglichkeit zur Differenzierung von einzelnen TSE-Stämmen. Zusätzlich strukturelle Unterschiede zwischen den Stämmen könnten aus der Zeitabhängigkeit der Harnstoff-Induzierten Entfaltung, der PrP27-30- Aggregate erhalten werden. Erste Ergebnisse am TSE-Stamm 263K deuteten darauf hin, dass Spektrenunterschiede, die durch das chaotrope Reagenz verursacht werden, ausreichend sein könnten, um zwischen verschiedenen TSE-Formen zu unterscheiden. Darüber hinaus weisen die Temperaturexperimente auch auf eine Schutzfunktion von spezifischen Nichtproteinkomponenten des Prions hin, was offensichtlich auch im Zusammenhang mit der dichten Packung der Proteinaggregate, eine Erklärung für die hohe Stabilität die Prionaggregate bei 90°C liefern könnte, die u.a. durch eine vollständige Resistenz gegenüber dem H/D-Austausch gekennzeichnet ist. Eine längere Behandlung des PrP27-30 mit 6 M Harnstoff verursachte die Entfaltung des größten Teils der Prionproteinaggregate, wobei die spektralen Muster, die für Proteinaggregate charakteristisch sind, auf gegenüber Harnstoffdenaturierung persistierendes PrP27-30 hinweisen.

Die FT-IR-Technik konnte folglich zur Unterscheidung zwischen vier im Goldhamster adaptierte TSE-Stämme erfolgreich eingesetzt werden, wobei die Differenzierung auf stammspezifische Sekundärstruktur-Charakteristika der gereinigten PrP27-30-Isolaten basierte. Die Temperatur-abhängigen Experimente mit und/oder die Harnstoff-induzierte

Denaturierung von PrP²⁷⁻³⁰ können ebenfalls für die Analyse von Stammunterschieden genutzt werden. Die vorliegende Arbeit belegt eindrucksvoll, dass die FT-IR- Spektroskopie ein großes diagnostisches Potential für die Unterscheidung von TSE-Stämmen hat.

Zusammenfassung