

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Biochemie und Molekulare Biologie II:
Molekulare Zellbiologie
Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

**Untersuchungen zur antioxidativen Rolle des zellulären Prionproteins
und dessen Rolle im oxidativen Stress Stoffwechsel an genetisch
veränderten Mausmodellen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Arian Sultan

aus Hamburg

Hamburg, 2008

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am:**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg**

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: PD Dr. med. C. Buhmann

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. med. D. Naber

Die vorgelegte Arbeit wurde in der Zeit von Februar 2000 bis Januar 2001 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II; Molekulare Zellbiologie des Zentrums für Experimentelle Medizin des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Frau Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel durchgeführt.

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich, Arian Sultan, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe. Die Benutzung anderer Hilfsmittel als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen wird verneint. Diese Arbeit wurde so oder in ähnlicher Form weder als Dissertation noch bei einer anderen Institution eingereicht.

Hamburg, Mai 2008

Arian Sultan

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung.....	7
1.1 Freie Radikale und Oxidativer Stress.....	7
1.1.1 Definition und Ursachen.....	7
1.2 Rolle von Metallionen bei oxidativem Stress.....	8
1.2.1 Die Fenton Reaktion.....	8
1.2.2 Metallionen im menschlichen Körper.....	8
1.3 Mechanismen der Lipidperoxidation.....	9
1.4 Antioxidantien.....	10
1.4.1 Funktion, Art und Vorkommen von Antioxidantien.....	10
1.4.2 Lipophile Antioxidantien.....	11
1.4.3 Alpha-Tocopherol.....	11
1.4.4 Ubichinon-10, Ubichinol-10, Ubichinon-9, Ubichinol-9.....	12
1.4.5 Hydrophile Antioxidantien.....	14
1.4.6 Ascorbat.....	15
1.5 Prion Erkrankungen.....	16
1.5.1 Definition und Funktion des Prion-Proteins.....	16
1.5.2 Prionproteine als kupferbindende Antioxidantien.....	18
1.5.3 Molekularer Pathomechanismus der Prion-Erkrankung.....	20
1.5.4 Prion-Erkrankung bei Mensch und Tier.....	21
2. Fragestellung der Dissertation.....	23
3. Materialien und Methoden.....	24
3.1 Geräte.....	24
3.1.1 Gaschromatographisches System.....	24
3.1.2 HPLC System.....	24
3.1.3 Spektralphotometer.....	24
3.1.4 Laborzentrifugen.....	24
3.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	24
3.2.1 Für HPLC-Messung b. lipophilen Antioxidantien.....	24
3.2.2 Für HPLC Laufmittel.....	25
3.2.3 Für FA-Bestimmung im Plasma.....	25
3.2.4 Für Vit.C-Bestimmung.....	25
3.2.5 Für Cholesterinbestimmung.....	25
3.2.6 Für Hirnhomogenatherstellung.....	26
3.2.7 Für TBARS Bestimmung.....	26

3.3 Transgene Tiere.....	26
3.4 Methoden.....	28
3.4.1 Herstellung der Hirnhomogenat-Aliquots.....	28
3.4.2 Bestimmung der Fettsäuren.....	29
3.4.3 Cholesterinbestimmung.....	30
3.4.4 Bestimmung der lipophilen Antioxidantien.....	30
3.4.5 Bestimmung von Vitamin C.....	31
3.4.6 Bestimmung der Lipidperoxidation mittels Thiobarbitursäure.....	32
3.5 Verwendete statistische Programme und Testverfahren.....	33
4. Ergebnisse.....	34
4.1 Hydrophile Antioxidantien – Ascorbat (Vitamin C).....	34
4.2 Lipophile Antioxidantien.....	34
4.2.1 α -Tocopherol.....	35
4.2.2 Gesamtubichinon.....	35
4.2.3 Ubichinon 9.....	37
4.2.4 Ubichinon 10.....	37
4.2.5 Gesamt-QH ₂	38
4.2.6 Ubichinol 9.....	39
4.2.7 Ubichinol 10.....	40
4.3 Fettsäuren.....	41
4.3.1 GFS; gesättigte FS; EUFS; Anteil ges.FS/GFS.....	41
4.3.2 Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren.....	41
4.3.3 Anteil der einfach ungesättigten Fettsäuren am Gesamtfettsäurenbestand.....	42
4.3.4 Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren am Gesamtbestand.....	43
4.4 Cholesteringehalt.....	44
4.5 Grafische Darstellung der einzelnen lipophilen Antioxidantien in Bezug auf den Gesamtgehalt der Fettsäuren.....	45
4.5.1 α -Tocopherol-Gehalt/Gesamtfettsäuren.....	45
4.5.2 Ubichinon 9-Gehalt / Gesamtfettsäuren.....	46
4.5.3 Ubichinon 10-Gehalt / Gesamtfettsäuren.....	47
4.5.4 Ubichinol 9 / Gesamtfettsäuren.....	48
4.5.5 Ubichinol 10 / Gesamtfettsäuren.....	48
4.6 Messungen aus München / Thiobarbitursäure-reaktive-Substanzen (TBARS).....	50
4.6.1 Bestimmung der Lipidperoxidation.....	50
5. Diskussion.....	51
5.1 Hydrophile Antioxidantien – Ascorbat.....	52

5.2	Lipophile Antioxidantien.....	53
5.2.1	Alpha-Tocopherol.....	53
5.2.2.	Gesamtubichinon und Gesamtubichinol.....	54
5.3	Fettsäurehaushalt – Lipidperoxidation.....	55
5.4	Cholesterin.....	56
5.5	Lipiperoxidation (TBARS).....	56
6. Zusammenfassung.....		58
7. Literaturverzeichnis.....		59
8. Anhang: Zahlenwerte der gemessenen Parameter.....		64
8.1	Hauptdatei aller Messungen ohne Ausreißer.....	65
8.2	p-Niveau-Mann-Whitney-U-Test.....	75
8.3.	Mittelwert-Tabelle.....	76
9. Abkürzungsverzeichnis.....		77

1. Einleitung:

1.1 Frei Radikale und Oxidativer Stress:

1.1.1 Definition und Ursachen

Ein freies Radikal wird definiert als ein Molekül mit einem oder mehr als einem ungepaarten Elektron. Jedes freie Radikal wird mit einem anderen Molekül reagieren und durch Elektronenpaarbildung neutralisiert. Eine andere Möglichkeit ist, dass ein Radikal mit einem Nichtradikal reagiert, um ein weiteres Elektron zu erhalten. Dabei lösen sie eine Kettenreaktion aus, da durch den Angriff des Radikals zwar dessen Elektron nun paarig ist, aber durch den Angriff ein neues Radikal entstanden ist. Einige Hauptvertreter der freien Radikale sind: O_2^* , OH^* , NO^* . Eines der aggressivsten, aber auch sehr kurzlebigen Radikale ist das Hydroxylradikal (OH^*). Es entsteht durch chemische oder physikalische Einwirkung z.B. UV-Strahlung auf molekularen Sauerstoff. Das Hydroxylradikal hat ein großes Potential oxidative Schäden zu verursachen. So kann es DNA angreifen und zu Veränderungen der Basensequenz oder des restlichen Aufbaus führen und damit Mutationen verursachen. In vivo sind Radikale in der Lage mit Proteinen und ungesättigten Fettsäuren zu reagieren (Lipidperoxidation).

Der Begriff "Oxidativer Stress" bezeichnet das Ungleichgewicht zwischen der Menge an freien Radikalen und den antioxidativ wirkenden Abwehrsystemen. Die meisten Zellen tolerieren in geringem Maße Schäden, die von freien Radikalen induziert worden sind. Sie besitzen Erkennungs- und Reperaturmechanismen zur Beseitigung der entstandenen Schäden, d.h. normalerweise halten sich die Produktion von oxidativen Radikalen und antioxidative Systeme die Waage. Es scheint drei Wege zu geben, wie oxidativer Stress entstehen kann. Entweder durch erhöhte Produktion von freien Radikalen (ubiquitär im Organismus stattfindende biochemische Prozesse, Zigarettenkonsum, UV-Strahlung) oder durch Verringerung der Antioxidantien (Malabsorption oder enzymatische Dysfunktion). Ein dritter möglicher Weg ist eine Erhöhung des Metallionengehaltes, was bewirkt, dass ein größerer Anteil O_2^* und H_2O_2 in schädeninduzierende Hydroxylradikale umgewandelt werden.

Die Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen scheint ebenfalls in engem Zusammenhang mit einer verminderten Aufnahme von Antioxidantien bzw. mangelnder antioxidativ wirkender Mechanismen zu stehen [Gutteridge et al. 1994]. Es wurde auch beobachtet, dass der Organismus scheinbar in der Lage ist sich gegenüber permanenten oxidativen Radikalen durch eine Vermehrung seiner antioxidativen Mechanismen besser zu schützen.

1.2 Rolle von Metallionen bei oxidativem Stress

1.2.1 Die Fenton-Reaktion

Bei Anwesenheit von Eisen(II)-Ionen kann es durch die sog. Fenton-Reaktion zu einer Bildung von Hydroxylradikalen kommen und somit zahlreiche ROS generiert werden, die eine Schlüsselrolle im oxidativen Stoffwechselprozess spielen. Die Redox-Reaktion vom Fenton-Typ wandelt Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch zweiwertige Eisenionen zu einem Hydroxylradikal (OH^{\bullet}) und einem Hydroxyl-Ion um. Die Umwandlung ist durch folgende Reaktionsgleichung beschrieben.

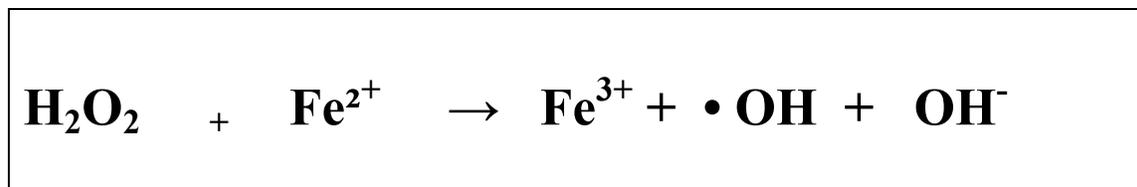
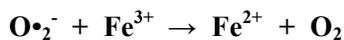


Abbildung Nr. 1 Schematische Darstellung der Redoxreaktion vom Fenton-Typ zur Beschreibung der Fenton-Reaktion

Dieses eine Elektron kann von Metallionen stammen, die verschiedene Wertigkeiten aufweisen. So kann die Fenton-Reaktion z.B. mit Kupfer oder Eisen ablaufen und folgendermaßen aussehen:

Eisen: $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{OH}^{\bullet} + \text{OH}^- + \text{Fe}^{3+}$ [Gutteridge et al. 1994].

Die für diese Reaktion notwendigen Eisen(II)-Ionen entstehen durch vorherige Redoxprozesse:



H_2O_2 ist eine im Organismus ubiquitär vorkommende Verbindung, die bei der zellulären Atmungskette entsteht.

1.2.2 Metallionen im menschlichen Körper

Grundsätzlich sind Metallionen, wie z.B. Kupfer nicht schädlich. Sie kommen in vielen Enzymen wie z.B. Superoxiddismutase oder Cytochromoxidase als Katalysatoren für Oxidationsvorgänge vor. Schädlich bzw. Radikale induzierend sind hohe Konzentrationen von freien Metallionen. Als freie Metallionen erhöhen sie die Autooxidation und können so aus Wasserstoffperoxid Hydroxylradikale bilden. Somit wird auch verständlich, dass in aeroben Organismen weder Eisen noch Kupfer in freier Form vorkommt oder vorkommen sollte. In der Regel ist es an Carrier-Proteine z.B. Albumin gebunden, aber auch Prion-Proteine sind in der Lage solche Metallionen zu binden [Gutteridge et al. 1994].

1.3 Mechanismen der Lipidperoxidation

Die Zellmembranen im menschlichen Organismus müssen eine gewisse Fluidität aufweisen, d.h. ihre einzelnen Bestandteile müssen innerhalb der Lipiddoppelschicht frei beweglich sein. Diese Eigenschaft wird durch die FS-Zusammensetzung beeinflusst. Die mehrfach ungesättigten FS weisen im Vergleich zu gesättigten FS Doppelbindungen auf. Die Doppelbindungen in MUFS bedingen, dass die dazwischen liegenden C-H-Bindungen instabil sind. Dadurch sind sie leichter angreifbar für oxidative Prozesse. Auf diesem Wege kann die Abspaltung eines H-Atoms durch z.B. ein Hydroxylradikal als primärer Schritt der Lipidperoxidation erfolgen. Wird nun in einer weiteren Reaktion Sauerstoff aufgenommen entsteht ein Lipidperoxid-Radikal (LOO^{*}). Durch weitere H-Atom Abspaltungen an anderen Stellen der MUFS wird durch dieses Lipidperoxid-Radikal eine Kettenreaktion ausgelöst, wobei das im ersten Schritt entstandene LOO^{*} zu einem Lipidhydroperoxid (LOOH) wird. Die entstandenen Lipidhydroperoxide werden entweder enzymatisch durch Metallkatalase zu Peroxi- und Alkoxiradikalen, oder durch sekundäre Oxidation unter anderem zu Thiobarbitursäurereaktiven Substanzen (TBARS) abgebaut. Diese einmal begonnene Lipidperoxidradikalkettenreaktion reagiert entweder mit anderen FS weiter oder wird von Antioxidantien unterbrochen.

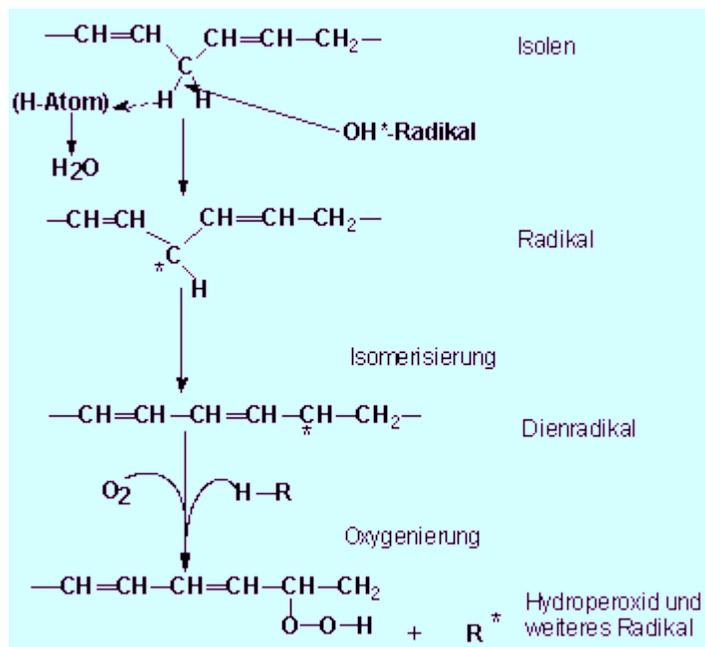


Abb. Nr. 2 Vereinfachte Darstellung der Lipidperoxidation aus Kappus 1982

Ob die hier beschriebenen Lipiperoxidationen in Organismus stattfinden hängt von zahlreichen Faktoren ab. So z.B. von der Anzahl von MUFAS in Membranen und Lipoproteinen und deren lipophilen Antioxidantien, sowie von den hydrophilen Antioxidantien in der sie umgebenden wässrigen Phase. Ein weiterer wichtiger Faktor ist inwieweit der Körper endogenem oder exogenem oxidativen Stress ausgesetzt ist. Außer Lipiden in Zellmembranen sind auch die in Cholesterinestern und Phospholipiden der Lipoproteine enthaltenen MUFA's leicht durch freie Radikale angreifbar, was dann zum bereits beschriebenen Kettenreaktionsmechanismus führt.

1.4 Antioxidantien

1.4.1 Funktion, Art und Vorkommen von Antioxidantien

Es gibt Enzyme, die antioxidativ wirken und einen der Hauptabwehrmechanismen der Zellen gegen oxidativen Stress [Halliwell et al.1994] darstellen. Ein Beispiel für solche Enzyme ist die Superoxiddismutase. Superoxiddismutasen (SOD's) kommen in allen aeroben Organismen vor [Halliwell et al. 1994]. Am Beispiel von E.coli konnte man beobachten was passiert, wenn nicht SOD besitzende Organismen Sauerstoff ausgesetzt sind. Sie erlitten häufig Membranschäden, sie waren nicht in der Lage bestimmte Aminosäuren zu produzieren und sie wiesen eine erhöhte Mutationsrate auf. Die antioxidative Wirkung der SOD wird in folgender Gleichung deutlich: $2O_2^* + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$; SOD katalysiert diese Reaktion im Organismus und benötigt als Coenzym entweder Kupfer oder Zink. Man darf jedoch nicht von der Schlussfolgerung ausgehen, dass je mehr SOD-Aktivität vorhanden ist, desto besser auch das Verteidigungssystem des Körpers ist. Im Gegenteil wirkt zuviel SOD-Aktivität im Vergleich zur angefallenen Radikalmenge eher schädigend auf die Zellen [Halliwell et al.1994].

Neben der enzymatischen Abwehr spielen Antioxidantien eine wichtige Rolle im Abwehrsystem der Organismen vor freien Radikalen. Antioxidantien existieren in Form von lipophilen und hydrophilen Vitaminen. Sie kommen ubiquitär im menschlichen Organismus sowohl intra- als auch extrazellulär vor. Antioxidantien haben die Fähigkeit freie Radikale direkt abzufangen und so radikalinduzierte Kettenreaktionen zu unterbrechen. Als lipophiles Vitamin ist z.B. α -Tocopherol in der Lage Membranlipide vor Peroxidation zu schützen [Sies et al. 1993]. Multiple antioxidative Fähigkeiten weist z.B. Ascorbat aus der Gruppe der hydrophilen Vitamine auf [Padh et al. 1990].

1.4.2 Lipophile Antioxidantien

In die Gruppe der fettlöslichen/lipophilen Antioxidantien gehören α - und γ -Tocopherole, α - und β -Carotinoide und Ubichinole. Diese antioxidativ wirkenden lipophilen Substanzen kommen in Zellmembranen und Lipoproteinen vor. Dort nehmen sie eine Schutzfunktion wahr, da die mehrfachungesättigten Fettsäuren in den Zellmembranen im besonderen Maße anfällig für eine radikalinduzierte Lipidperoxidation sind.

1.4.3 α -Tocopherol

Ein potenter Vertreter aus der Gruppe der Tocopherole (Vitamin E) ist das d- α -Tocopherol oder auch R,R,R- α -Tocopherol genannt. Es ist das im menschlichen Organismus am häufigsten vorkommende und aktivste Tocopherol [Burdon et al. 1995]. Im Darm wird es sehr gut resorbiert und wirkt in seiner Funktion neutralisierend auf Lipidperoxid-Radikale. Tocopherole verhindern Lipidperoxidation, indem sie Lipidperoxid-Radikale schneller abfangen als diese in der Lage sind Fettsäuren in Seitenketten oder andere Membranproteine anzugreifen [Halliwell et al. 1994]. Sie machen dies, indem sie durch eine H-Abspaltung Lipidperoxid-Radikale in Lipidhydroperoxide umwandeln und so die Oxidationskettenreaktion unterbrechen. Das d- α -Tocopherol wird bei dieser Reaktion selbst zu einem Radikal (Chromaxylradikal), das aber relativ reaktionsträge ist. In einem weiteren Schritt reagiert es entweder mit einem anderen Lipidperoxidradikal oder mit einem anderen d- α -Tocopherol-Radikal zu einer nicht radikal wirksamen Substanz. Eine andere Alternative ist, dass es durch hydrophile Antioxidantien (siehe unten) wie z.B. Ascorbat wieder zu d- α -Tocopherol recycelt wird.

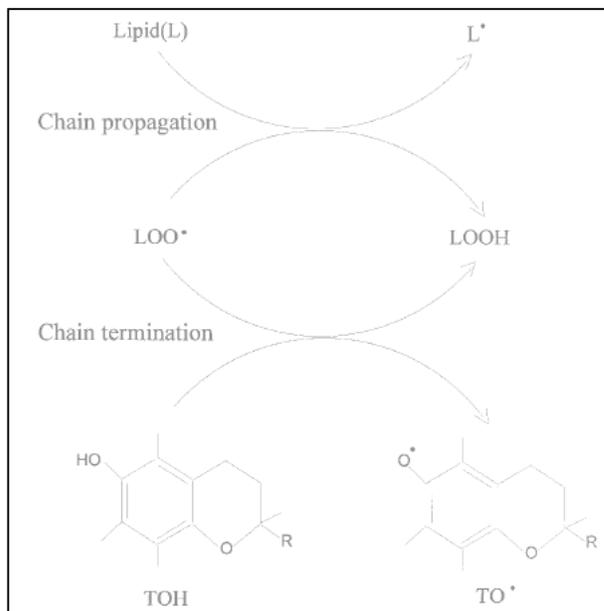


Abbildung Nr. 3 - Radikalfänger Wirkung von α -Tocopherol - Wang/Quinn et al. 1999

1.4.4 Ubichinon-10 (Q 10) / Ubichinol 10 (QH₂10) / Ubichinon-9 (Q9) / Ubichinol 9 (QH₂9)

Ubichinone sind Chinon-Derivate mit lipophiler Isoprenoid Seitenkette. Als reduzierte, phenolische Form wird es Ubichinol genannt. In einer weiteren Reaktion wird das Ubichinol wieder zu Ubichinon oxidiert unter Reduktion von Cytochrom C. Der Name Ubichinon/Ubichinol beruht auf der Tatsache, dass es ein lipidlöslicher Bestandteil von Membranen und Plasma des menschlichen Organismus ist und somit ubiquitär vorkommt. Es ist bekannt, dass Ubichinon-10/Ubichinol als Elektronen-Carrier der mitochondrialen Atmungskette fungiert [Mitchell et al. 1982]. Die Funktion der Ubichinole besteht in ihrer Redoxeigenschaft in mitochondrialen Elektronentransportsystemen [Mitchell et al. 1982]. Ubichinol-10 ist im Vergleich zu d- α -Tocopherol nahezu ebenbürtig in der Lage antioxidativ zu wirken und die radikalinduzierten Kettenreaktionen zu unterbrechen, indem es Radikale abfängt [Booth et al. 1982]. Es konnte nachgewiesen werden, dass Ubichinol in Phosphatidylcholinliposomen Lipidperoxidation zu verhindern vermag. Daher ging man davon aus, dass es in der inneren Mitochondrienmembran als ebenbürtiges Antioxidanz wirkt, was durch die 10fach höheren Konzentrationen an Ubichinonen und Ubichinolen im Vergleich zu d- α -Tocopherol begründet wurde [Frei et al. 1990]. Trotz eines gewissen prooxidativen Effektes verringert sich die antioxidative Wirkung von Ubichinol-10 bei metallioneninduzierter Lipidperoxidation nicht, da in Lipoproteinen keine signifikante Reduktion der Metallionen durch Ubichinol-10 stattfindet [Kontush et al. 1994; Tribble et al. 1994]. Man beobachtete, dass sich die Funktion des Ubichinol-10 am stärksten in der ersten Phase der Lipidperoxidation zeigt. Zu diesem Zeitpunkt wird die Bildung von Lipidperoxidradikalen fast vollständig unterbunden. Außerdem wurde eine signifikante Verlangsamung des α -Tocopherol-Verbrauches ermittelt [Stocker et al. 1994]. Im Gegenzug sind ein Anstieg der Peroxidbildung und ein erhöhter Verbrauch an α -Tocopherol dann zu verzeichnen gewesen, wenn das gesamte Ubichinol-10 zu Ubichinon-10 oxidiert worden ist.

Von α -Tocopherol wissen wir, dass es durch Ascorbat wieder reduziert werden kann, dies ist bei Ubichinol-10 nicht möglich. Man weiß jedoch, dass Ubichinol-10 durch verschiedene in Membranen lokalisierte Enzyme und Elektronentransport-Carrier reduziert werden kann [Maguire; Wilson; Packer; Mehlhorn, Serbinova, Kagan et al. 1989]. Ubichinol-10 ist im Vergleich zu α -Tocopherol in der Lipiddoppelmembran tendenziell zentral/mittig (hydrophober Anteil) lokalisiert. α -Tocopherol geht mit seiner Hydroxylgruppe, nahe der wasserlöslichen Seite,

eine Hydrogenbindung mit der Carbonylgruppe der Phospholipide ein und die hydrophobe Phytlylseitengruppe ist im Inneren der Membran eingebettet [Ekiel et al., 1988].

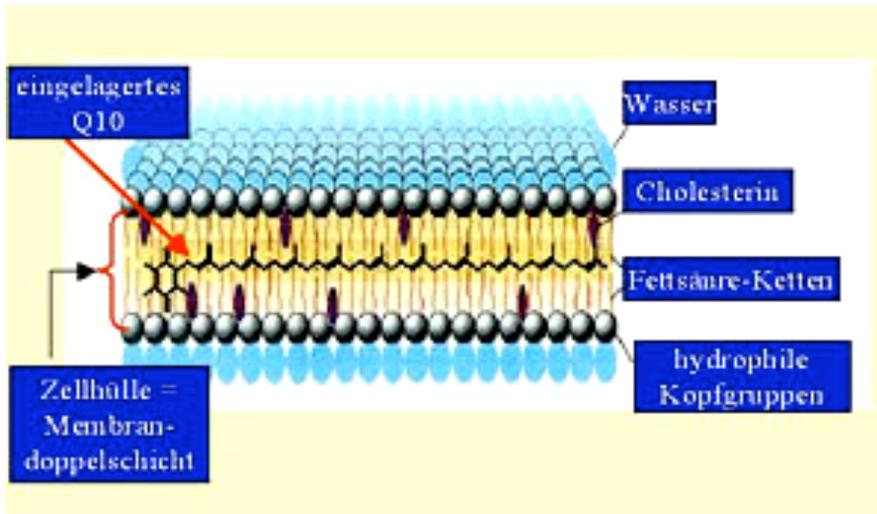


Abbildung Nr. 4 (mit freundlicher Genehmigung von Intervallor)

Angesichts der genannten Erkenntnissen geht man auch davon aus, dass Ubichinol-10 mit zu den wichtigsten lipophilen Antioxidantien gehört, da Peroxylradikale auf ihrem Diffusionsweg von der inneren zur äußeren Zellschicht als erstes von den Ubichinolen abgefangen werden und der dann verbleibende Rest an Peroxylradikalen erst von α -Tocopherol gebunden wird [Frei et al. 1990]. Somit spielt Ubichinol eine mindestens ebenso wichtige Rolle im lipophilen Antioxidantien Abwehrsystem wie α -Tocopherol [Frei et al. 1990].

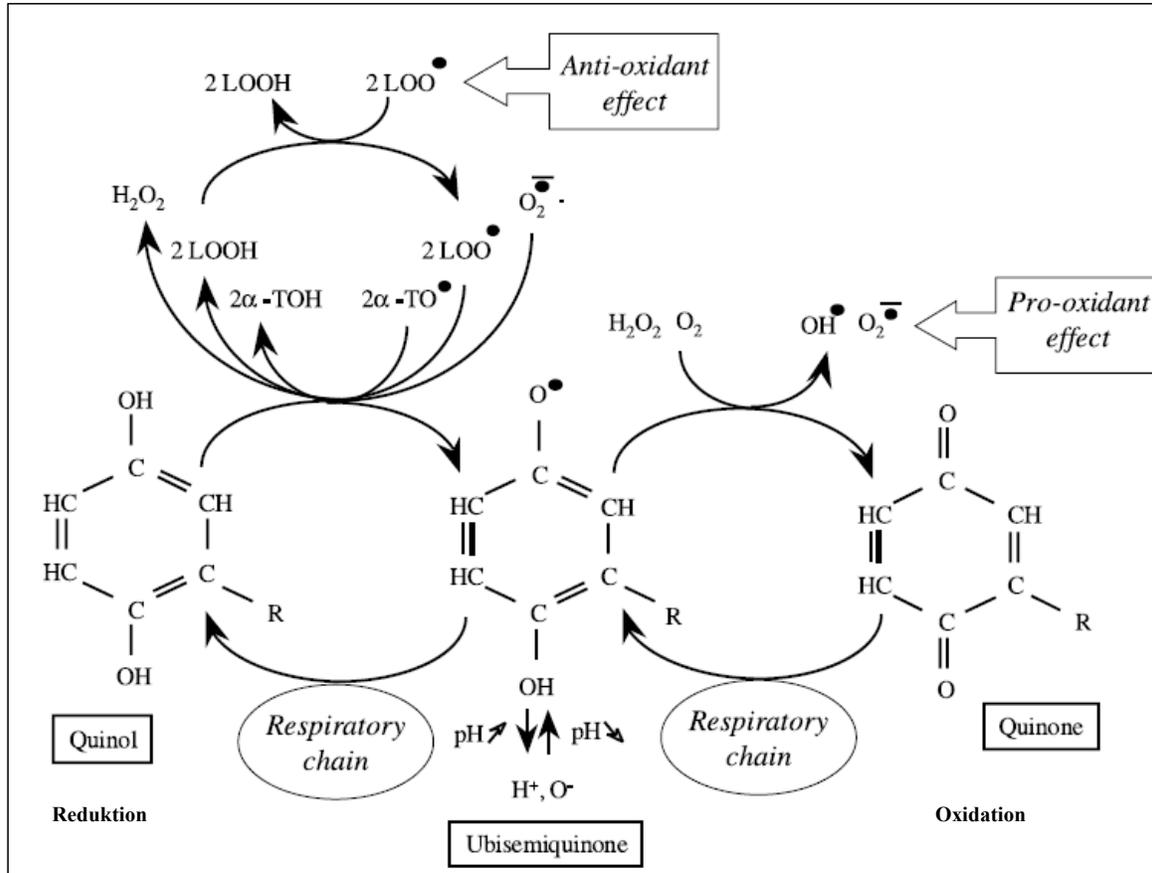


Abb. Nr. 5: Mögliche anti- und prooxidative Reaktion katalysiert durch Ubichinone V. Geromel et al. 2002

1.4.5 Hydrophile Antioxidantien

Zwei Vertreter aus der Gruppe der hydrophilen Antioxidantien sind Harnsäure und Ascorbat. Hydrophil bedeutet hier, dass diese Antioxidantien in allen H_2O -haltigen Kompartimenten des Organismus in Lösung sind. Eine weitere Eigenschaft der hydrophilen Antioxidantien ist, dass sie im Vergleich zu den lipophilen Antioxidantien vom menschlichen Organismus nicht gespeichert werden können. Die Harnsäure entsteht endogen beim Abbau von Purinen, wobei das Ascorbat exogen zu geführt werden muss, da der menschliche Körper nicht in der Lage ist dieses Vitamin selbst zu synthetisieren.

1.4.6 Ascorbat

Ascorbat (Vitamin C) ist das wichtigste hydrophile Antioxidans. Es kommt in der Nahrung wie z.B. Obst und Gemüse, aber auch in Grünteessorten vor. Primaten sind nicht in der Lage Ascorbat endogen zu produzieren, da ihnen zur Biosynthese aus Glucuronsäure die L-Gluconolacton-Oxidase fehlt. Vitamin C ist neben der Kollagen- und Karnitinsynthese auch an der Neurotransmittersynthese beteiligt [Bode et al. 1997]. Ascorbat ist ein äußerst potenter Radikalfänger und zeigt eine bessere Plasmawirksamkeit als Bilirubin und Harnsäure [Niki et al. 1991]. Es ist in der Lage α -Tocopherol in Lipoproteinen und Membranen zu regenerieren [Gutteridge et al. 1994], indem Ascorbat über Monodehydroaskorbat zu Dehydroaskorbat (DHA) oxidiert. Die NADH-Monodehydroaskorbat- und Glutathiondehydroaskorbatreduktase können beide Substanzen wieder zu Ascorbat reduzieren [Niki et al. 1991]. Vitamin C hat jedoch auch prooxidative Eigenschaften. So konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit einer deutlich gesteigerten exogenen Ascorbatzufuhr eine Zunahme von 8-Oxoguanin als Marker für Sauerstoffinduzierte DNS Schädigung zu verzeichnen war [Podmore et al. 1998]. Die Konzentration und der damit verbundene Effekt der antioxidativen Wirkung von Vitamin C und E können durch eine kombinierte Gabe beider Substanzen erhöht werden [Kontush et al. 2001].

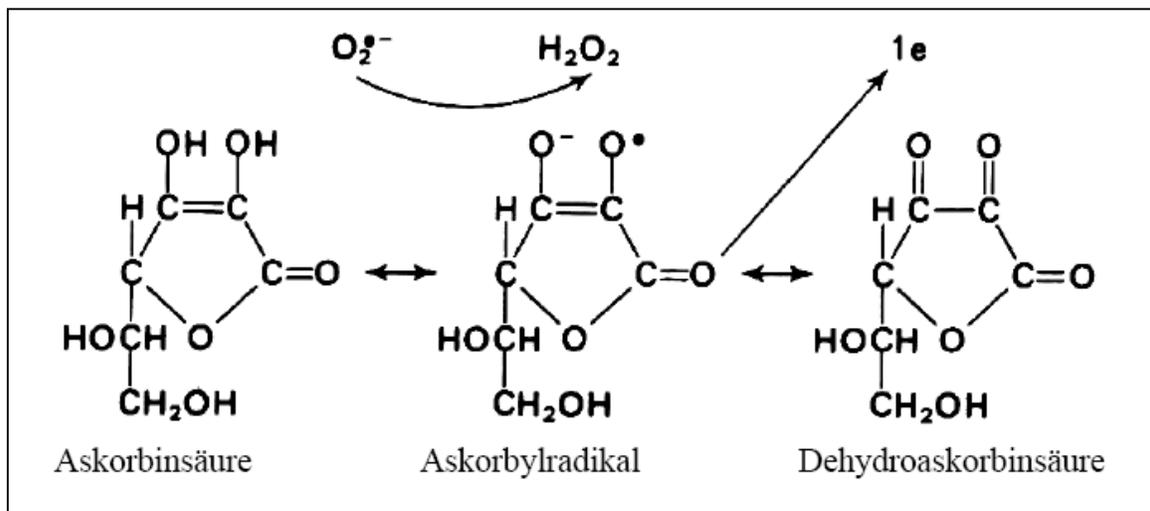


Abb. Nr. 6: Ascorbat Redoxstufen (Elstner 1990).

1.5 Prion-Erkrankung

1.5.1 Definition und Funktionen des Prionproteins

Prionen (aus dem engl. Proteinaceous infectious particle) kommen im menschlichen und tierischen Körper vor. Das Prionprotein ist ein auf Zelloberflächen lokalisiertes Glykoprotein und wird von Neuronen, Glia- und anderen Körperzellen exprimiert [Brown 1999a; Moser et al. 1995; Brown et al. 1998a; Brown et al. 1998b]. Prionen können in einer physiologischen (PrP^{C}) und einer pathogenen Form (PrP^{Sc}) vorliegen. Die physiologische Form ist vorwiegend durch eine alpha-helikale Form charakterisiert, wohingegen die pathologische Form als Beta-Faltblatt vorliegt. Die pathogene Form ist hauptsächlich verantwortlich für die damit assoziierten Erkrankungen wie Creutzfeldt-Jakob (Mensch) und BSE (Rind). Prionen spielen jedoch auch eine wichtige Rolle bei antioxidativen Abwehrmechanismen und bei der Neurogenese.

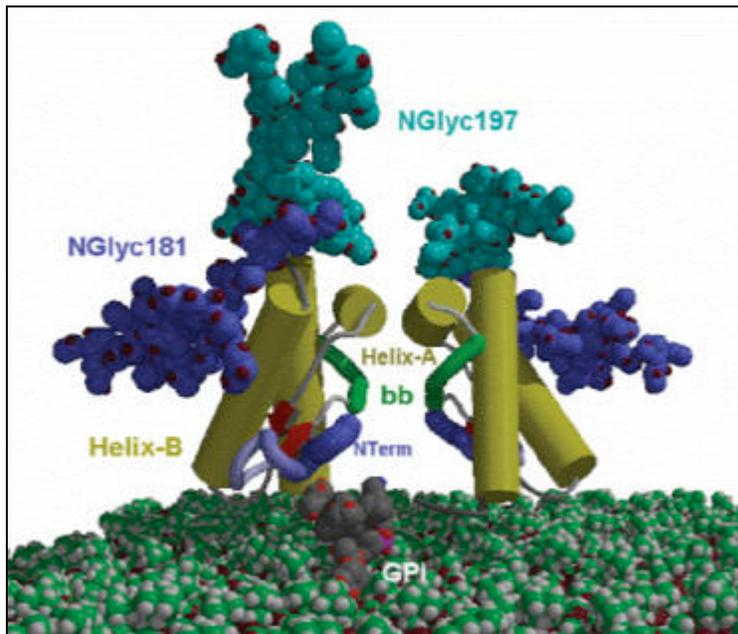


Abb.: Nr. 7 3-D Computermodell zweier Prionproteine, die in vertikaler Position mit der Zelloberfläche in Verbindung stehen (Mit freundlicher Genehmigung der John Curtin School of Medical Research).

Die maßgeblich durch Pruisiner propagierte “Prionenhypothese“ [Prusiner 1982] unterscheidet zwei Formen des Prionproteins. Er geht davon aus, dass das Protein in einer zellulären (PrP^{C}) und einer infektiösen Form (PrP^{Sc}) vorkommt [Prusiner et al. 1998]. 1996 beschrieb Griffith, dass ein Protein in der Lage ist infektiös zu agieren und sich zu replizieren [Griffith et al. 1996]. Der entscheidende Unterschied liegt in der Konformation der einzelnen Formen [Pan et al. 1993]. Durch bisher ungeklärte Interferenzen der einzelnen Konformationsformen kann die zelluläre in die infektiöse Form überführt werden. Somit ist eine Replikation der infektiösen Form ohne

unmittelbare Einflußnahme von Nukleinsäuren möglich [Prusiner et al. 1998]. Weiterhin wird angenommen, dass Fehlfaltungen oder Spontanmutationen zur Konformationsänderung des zellulären zur infektiösen Form führen [Prusiner et al. 1993, Prusiner et al. 1998]. Diese theoretischen Annahmen führten zur Etablierung des Begriffes "Prion" [Prusiner 1982]. In diesem Zusammenhang werden in der Medizin Erkrankungen aus dem Formenkreis der spongiformen Encephalopathien auch als sog. Prion-Diseases bezeichnet. Untersuchungen an Knockout-Mäusen, die kein Prionprotein exprimieren und damit resistent gegen Infektionen mit dem Erreger waren, untermauerten diese These [Büeler et al. 1993]. Somit stand fest, dass das infektiöse Prionprotein mit dem zellulären Prionprotein in irgendeine Wechselwirkung treten musste [Weisman 1991, Moore et al. 1998].

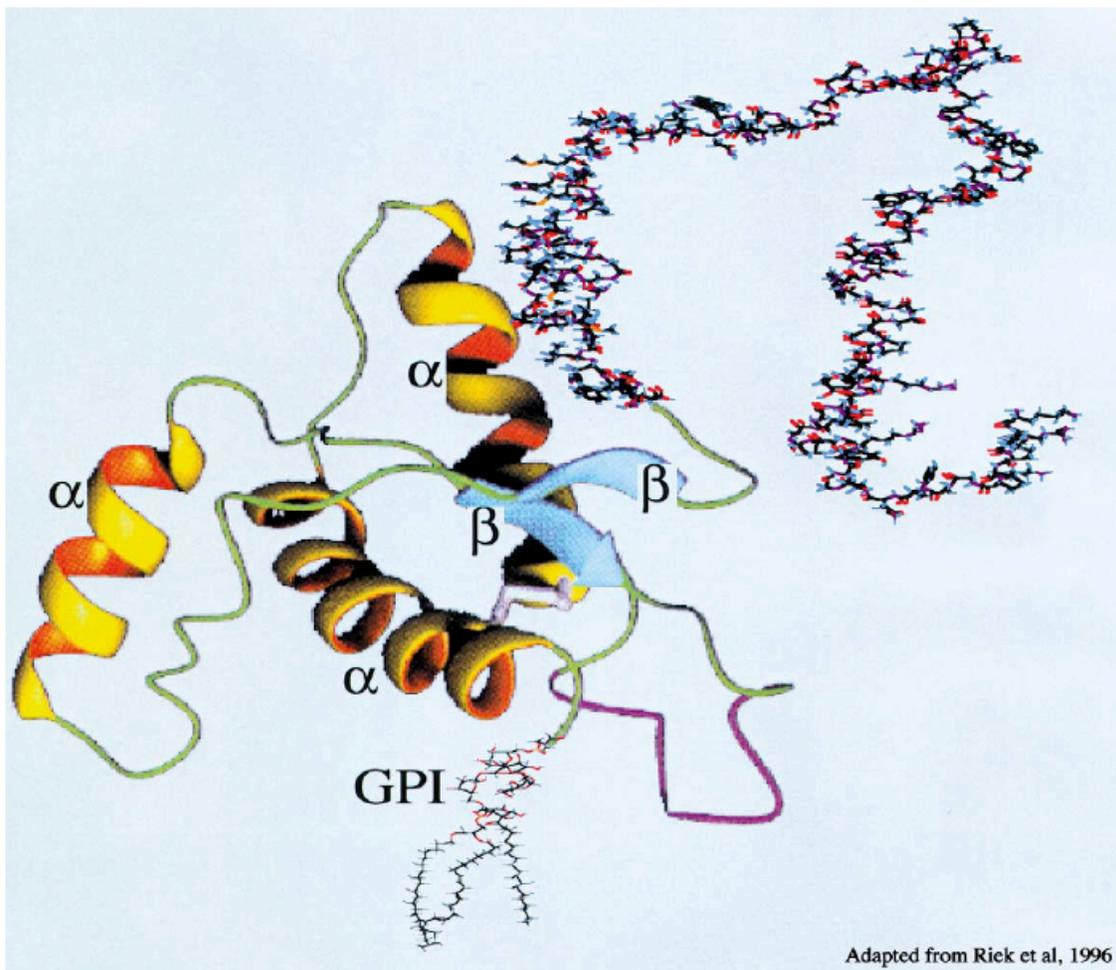


Fig. 2. Three-dimensional structure of the cellular PrP.

Abbildung Nr. 8 Darstellung der Drei-Dimensionalen Struktur des zellulären Prionprotein mit dem sog. GPI-Anker, der zur Anheftung an der zellulären Oberfläche dient [Riek et al, 1996].

Die pathogenen Prionen enthalten im Vergleich zu pathogenen Viren und Bakterien keine DNA oder RNA. Sie sind weder hitze- noch säurelabil, auch werden sie durch UV-Strahlung und aggressive Chemikalien nicht denaturiert [Alper et al. 1966; Brown et al. 1982; Prusiner et al. 1982]. Jedoch zeigten sie eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Proteinasen [Taylor et al. 1994].

Wie oben bereits erwähnt versteht man unter der Prion-Erkrankung die posttranslationale Umwandlung von normalen Prion-Proteinen ($\text{PrP}^{(C)}$) in ein pathogenes Isomer ($\text{PrP}^{(Sc)}$) ausgelöst durch die sog. infektiösen Prionen. Es gibt drei angenommene Wege der Genese – die sog. “Prionhypothese“ [Prusiner 1982]: 1. Eine seltene spontane Umwandlung des normalen Prion-Proteins in das pathologische Isomer; 2. Ein infektiöser Kontakt zwischen normalem Prion-Protein und dem pathologischen Isomer und 3. Eine erblich bedingte Mutation des Prion-Proteingens [Prusiner 1989; Doyle et al. 1998]. Alle drei Infektionswege haben eine ungewöhnlich lange Inkubationszeit weshalb der Erreger auch als “Slow Virus“ bezeichnet wurde [Sigurdarson 1954]. Wobei die Bezeichnung “Virus“ irreführend ist, da keine entsprechende Nukleinsäure isoliert werden konnte [Riesner et al. 1993], sondern vielmehr ein Protein, welches als besagtes Prionprotein bezeichnet wurde [Prusiner et al. 1983, Oesch et al. 1985].

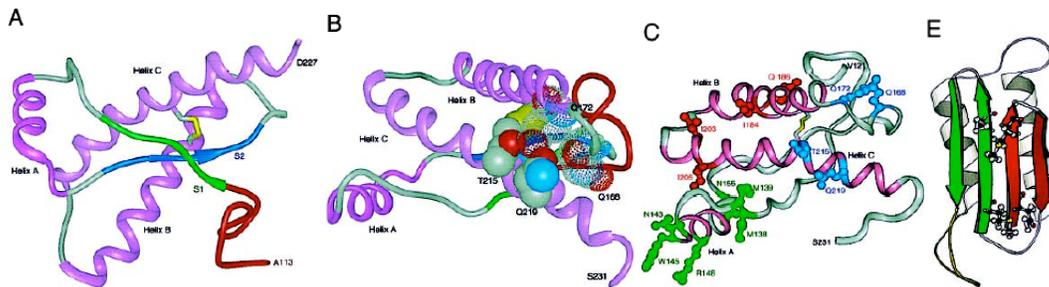


Abbildung Nr. 9 Darstellung der Umwandlung von $\text{PrP}^{(C)}$ zur $\text{PrP}^{(Sc)}$ Form [Prusiner 1998].

1.5.2 Prionproteine als kupferbindende Antioxidation

Wie zu Beginn bereits erwähnt spielen Prionproteine eine bedeutende Rolle im oxidativen Stoffwechsel. Sie sind in der Lage Metallionen zu binden, so z.B. Kupfer [Brown et al. 1997; Hornshaw et al. 1995; Stöckel et al. 1998]. Des weiteren wurde eine Superoxiddismutase ähnliche Funktion (in vitro) beobachtet. Somit kann man sagen, dass Prion-Proteine die zellulären Abwehrmechanismen gegen oxidativen Stress unterstützen [Wong et al. 2000; Brown et al. 1999].

Kupfer ist ein im menschlichen Organismus ubiquitär vorkommendes Spurenelement. Die Konzentration von Kupfer im Serum des Menschen beträgt 10-15 μM im Hirn jedoch 80 μM , dennoch ist die Konzentration in verschiedenen Hirnarealen unterschiedlich. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass fast kein freies Kupfermolekül in den Zellen vorkommt. Man kann also davon ausgehen, dass Kupfer immer nur in gebundener Form an z.B. Ceruloplasmin vorliegt. Das Metalion Kupfer spielt in vielen biochemischen Stoffwechselprozessen als prosthetische Gruppe in Schlüsselenzymen eine wichtige Rolle. So z.B. bei der Cytochrom C Oxidase und der Superoxiddismutase. Insbesondere bei biochemischen Stoffwechselprozessen im Zentralnervensystem hat Kupfer eine fundamentale Rolle [Harris and Gitlin 1996; Culotta and Gitlin 1999; Waggoner et al. 1999]. Die Bedeutung des Kupfers und seine Funktion werden deutlich, wenn es zu Störungen des Kupferhaushaltes kommt. Es gibt zahlreiche Erkrankungen, die mit einer Dysfunktion des Kupferstoffwechsels assoziiert sind. Als Beispiele seien der Morbus Menke, der Morbus Wilson, die amyotrophe Lateralsklerose und die Prion-Erkrankung erwähnt [Waggoner et al. 1999].

Kupfergebundenes PrP hat bei physiologischen Kupferkonzentrationen eine antioxidative Wirkung. Es gibt jedoch Situationen wie z.B. Entzündungen, bei denen ein Ungleichgewicht der Kupferkonzentration auftreten kann. Bei einem Rückgang der Kupferwerte ist nicht genügend kupfergebundenes PrP vorhanden, somit können die Prion-Proteine nicht ihre SOD-ähnliche Funktion wahrnehmen und damit verringert sich die antioxidative Wirkung der Prionproteine. Eine ähnliche Beobachtung wurde schon in früheren Studien gemacht. Es konnte gezeigt werden, dass Cuprizone, ein kupferbindender Chelator, ähnliche neuropathologische Degenerationen verursacht, wie sie in Mäusen mit der Prion-Erkrankung anzutreffen sind [Waggoner et al. 1999; Kimberlin 1974 und Pattison et al. 1971]. Somit wurde schon damals ein Zusammenhang zwischen Kupfer und dem Pathomechanismus der Prion-Erkrankung vermutet. Wenn im Vergleich zum zuvor Erwähnten die Kupferkonzentration erhöht ist, kann eine vermehrte Produktion von Prion-Proteinen als Gegenmaßnahme zum oxidativen Stress festgestellt werden. Des Weiteren kann eine Anhäufung von Kupfer zur Folge haben, dass bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid Peroxidionen gebildet werden und diese wiederum die "Octapeptid-Region" am N-terminalen Ende der Prion-Proteine angreifen. Der Angriff auf die "Octapeptid-Region" hätte dann wieder einen Verlust der antioxidativen Wirkung zur Folge [Jimenez-Heute et al. 1998; Wong et al. 2000; Wong et al. 2000]. Es zeigte sich, dass Wildtyp-Mäuse eine 15-mal höhere Konzentration von Kupfer²⁺ haben als Knockout-Mäuse. Aufgrund dieser Beobachtung wird angenommen, dass das normale Prion-Protein eine tragende Rolle in der Aufnahme von Kupfer aus dem Organismus bzw. aus dem Extrazellulärraum spielt [Pauly und Harris 1998]. In

Abwesenheit von PrP^c konnte man einen Anstieg von oxidativen Schäden an Lipoproteinen und eine Abnahme der SOD-Aktivität in allen Strukturen feststellen [Klamt et al. 2001].

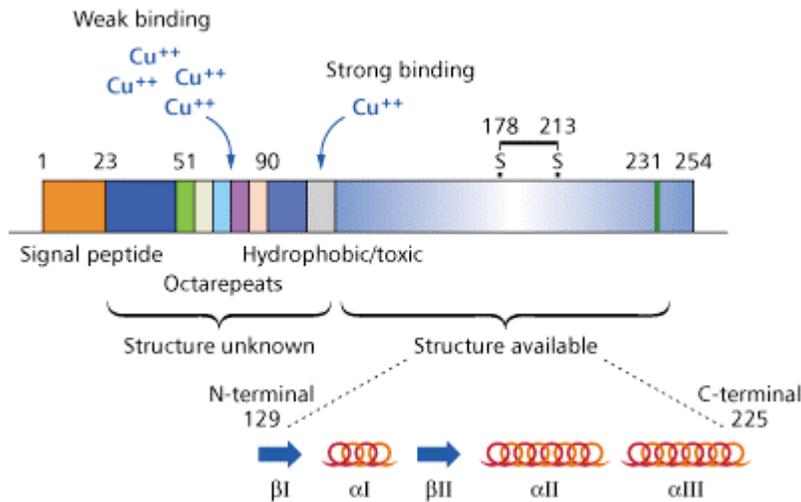


Abb.: Nr. 10 Detaillierte Darstellung des Prion Proteins insbesondere der Kupferbindenden Region [I. Jones et al. 2002]

1.5.3 Molekularer Pathomechanismus der Prion-Erkrankung

Die Strukturänderung des Proteins erfolgt hauptsächlich am N-terminalen Ende, insbesondere in der Region der sog. "Octarepeats", welches die Hauptbindungsstelle für Kupfermoleküle ist. Die Umwandlung hat zur Folge, dass sich die Proteinstruktur von einer α -Helix in eine β -Faltblattstruktur ändert [Pan et al. 1993].

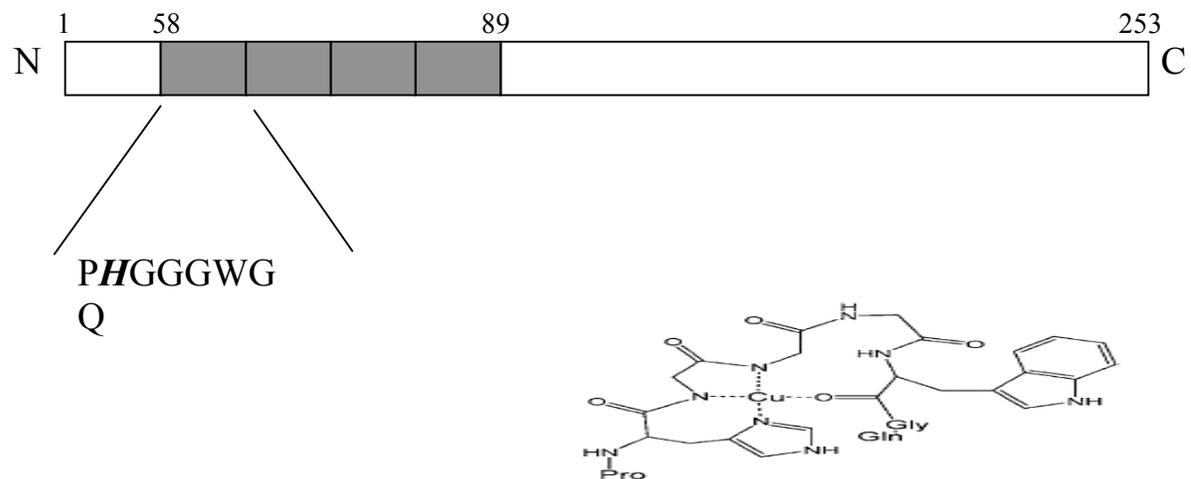


Abb.: Nr. 11 Darstellung eines

Prionproteins mit besonderer Hervorhebung der Sequenz der sog. Octapeptidregion am N-terminalen Ende des Prion-Proteins. Es stellt die Hauptbindungsstelle des Prionprotein für Kupferionen dar. Im zweiten Bild wird die Bindung eines Cu-Moleküls in diesem Sequenzbereich dargestellt [Aronoff-Spencer et al. 2000].

Bei einer Änderung der Konformität der Prion-Proteine, also einer Überführung in das pathogene Isomer, führt dies auch zu einer Änderung im Bindungsverhalten von Metallionen und somit zu einer signifikanten Abnahme der Cu/Zn-Superoxiddismutase-ähnlichen Aktivität der Proteine. Dies hat zur Folge, dass nicht nur die antioxidative Wirkung der Prion-Proteine abnimmt, sondern auch, dass durch das entstandene Metallionen-Ungleichgewicht die Neuronen nun erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt sind [Eide 1998; Wong et al. 2000]. Des Weiteren kommt es in betroffenen Hirnen zu einer Akkumulation von PrP^(Sc), das sich dann zu Amyloid-Plaques umformen kann. Diese Plaques wirken neurodegenerativ auf das Hirngewebe [Klamt et al. 2001]. Dies wiederum ist durch die Tatsache zu erklären, dass durch die Konformationsänderung der Prion-Proteine eine erhöhte Resistenz gegenüber Proteinase K [Oesch et al. 1985] und die Bildung unlöslicher Aggregate [Prusiner et al. 1983] zu beobachten war. Bei Knockout Mäusen, bei denen das Prion-Protein ganz fehlt wurde eine Zunahme der oxidativen Kettenreaktionen bzw. eine erhöhte Lipid- und Proteinperoxidation festgestellt, im Gegenzug nahm die Superoxiddismutase Aktivität ab [Klamt et al. 2001].

1.5.4 Prion-Erkrankung bei Mensch und Tier

Übertragbare spongiforme Encephalopathien sind neurodegenerative, letal verlaufende, mit apoptotischen Nervenzellverlusten, Astroglie und Proteinablagerungen assoziierte Erkrankungen [Giese et al. 1995]. Zum Formenkreis der übertragbaren spongiformen Encephalopathien gehört die menschliche Prion-Erkrankung. Sie ist charakterisiert durch eine schnelle progressive Demenz und cerebelläre Ataxie, die durch die spongiforme Degeneration und astrozytäre Gliosis verursacht wird [Prusiner, 1997]. Eine Ursache für den Nervenzelluntergang bei der Prionenerkrankung könnte in der durch das pathogene Prionprotein induzierten Umwandlung von körpereigenen, gesunden PrP, in das pathogene, funktionslose, Isomer liegen. Es kann dadurch zu einer Akkumulation von funktionslosem PrP kommen, oder das transformierte PrP nimmt eine neue Funktion an, was beides neurotoxisch wirken könnte. Beide Mechanismen stellen zwei Theorien dar, die als “loss of function“ und als “gain of function“ bezeichnet werden [Collinge et al. 1994; Kretzschmar et al. 1997]. Außer der “gain of function“ Hypothese konnte ebenfalls ein toxischer Effekt von PrP^(Sc) nachgewiesen werden [Müller et al. 1993]. Im Vergleich zu anderen infektiösen Erkrankungen zeigt der menschliche Organismus bei dieser Form keinerlei immunologische Abwehrreaktionen im klassischen Sinne [Prusiner 1993 u.1998]. Beispiele für beim Menschen vorkommende infektiöse, spongiforme Encephalopathien sind der sporadisch auftretende Morbus Kreutzfeldt-Jakob, das hereditäre Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom, die ebenfalls erblich bedingte “Fatal Familial

Insomnia“ (familiäre, tödliche Schlaflosigkeit und die erworbene Kuru [Kretzschmar et al. 1991]. Die Kuru-Krankheit trat gehäuft in Papua-Neuguinea auf. Dort wurde sie durch rituellen Kannibalismus übertragen, indem die Eingeborenen das ungekochte Hirn ihrer Verstorbenen aßen, die ebenfalls Träger dieses sogenannten “Slow-Viruses“ waren [Hadlow 1959].

Bereits 1936 wurde von Cuillè und Chelle erstmals die Übertragbarkeit von Scrapie nachgewiesen, jedoch auch in Jahre später stattfindenden Experimenten konnte eine übertragbare, spongiforme Encephalopathie nachgewiesen werden, z.B. durch Inokulierung von Mäusen mit scrapieinfizierten Schafshirnhomogenaten [Gibbs et al. 1968; Tateishi et al. 1995]. Die erste Übertragung der menschlichen Prionenerkrankung Kuru auf ein Tier (Schimpanse) gelang 1996 [Gajdusek et al. 1966] und lieferte damit bedeutende Hinweise für die infektiöse Genese dieser Erkrankung. Im Jahre 1994 wurde in Großbritannien der erste Fall einer eventuell neuen Variante des Morbus Creutzfeldt-Jakob bei Teenagern und jungen Erwachsenen beobachtet und zu einem späteren Zeitpunkt wurde ein weiterer Fall in Frankreich beobachtet [Will et al. 1996]. Außer dem ungewöhnlich jungem Alter der Patienten traten PrP-Amyloid-Plaques umgeben von spongiformer Degeneration als charakteristisches klinisches Bild auf [Ironsides 1997]. Dieses punktuelle geographische Vorkommen und die Besonderheiten dieser jugendlichen Creutzfeldt-Jakob- Erkrankung lassen vermuten, dass BSE-Prionen auf den Menschen übertragen worden sind [Prusiner et al. 1998]. Eine mögliche Übertragung der BSE-Prionen könnte durch das Konsumieren von kontaminierten Lebensmitteln verursacht worden sein [Will et al. 1996; Bruce et al. 1997].

Spongiforme Encephalopathien sind auch bei Tieren bekannt. Einige Erkrankungen aus dieser Gruppe sind die bovine spongiforme Encephalopathie (BSE) bei Rindern, Scrapie bei Schafen, feline spongiforme Encephalopathie (FSE) bei Katzen und die transmissible Nerz Encephalopathie (TME) bei Nerzen.

2. Fragestellung der Dissertation

In den letzten Jahren hat sich die Ansicht durchgesetzt, dass das sog. Prion-Protein (PrP) regulierend in den oxidativen Stoffwechsel eingreift. Es sorgt für ein "Oxidatives Gleichgewicht" im Zentralnervensystem.

Vor diesem Hintergrund stellte sich nun die Frage, wenn also Prionproteine regulierend in das oxidative Gleichgewicht im Zentralnervensystem eingreifen, ist dann bei transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen tatsächlich eine Veränderung des oxidativen Status festzustellen. Zu diesem Zweck wurden sechs verschiedene Mauslinien untersucht. Neben Wildtyp- und Knockouttieren wurden Tiere untersucht, die das Prionprotein überexprimieren und somit einen verbesserten antioxidativen Schutz aufweisen müssten. Und es wurden Tiere mit einem verkürzten, in seiner Funktion beeinträchtigten Prionprotein untersucht. Aufgrund der eingeschränkten antioxidativen Funktion des Prionproteins wurden bei diesen Tieren erhöhte oxidative Stressparameter erwartet. Zur Überprüfung der Hypothese wurden die Konzentration sowohl der hydrophilen als auch der lipophilen Antioxidantien als oxidative Stressparameter in Hirnhomogenatproben bestimmt.

Außerdem wurde das Ausmaß der Lipidperoxidation als direktes Indiz für die Höhe des oxidativen Stresses in diesen Mauslinien anhand der Fettsäurezusammensetzung der einfach- und mehrfachgesättigten und ungesättigten Fettsäuren und deren Anteil am Bestand der Gesamtfettsäuren bestimmt.

3. Materialien und Methoden:

3.1. Geräte:

3.1.1 Gaschromatographisches System (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA):

Gaschromatograph Hewlett-Packard 5890 Series II

Gaschromatische Säule HP-5MS, 30 m Länge, 0,25 mm innerer Durchmesser, 0,25 µm Filmdicke

3.1.2 HPLC- System (Agilent 1100 Waldbronn, Germany):

HPLC-Säule: LiChrospher® 100; RP-18 ,5µm (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Elektrochemischer Detektor Coulochem II (Environmental Sciences Assoc., Bedford, USA)

Analytical Cell Modell 5011 (Environmental Sciences Assoc., Bedford, USA)

Conditioning Cell Modell 5021 (Environmental Sciences Assoc., Bedford, USA)

Spritze: HP 250 µl, (Hewlett Packard, Palo Alto, USA)

3.1.3 Spektralphotometer Modell 150-20 (Hitachi, Japan)

3.1.4 Laborzentrifugen

Laborzentrifuge Biofuge fresco (Heraeus, Deutschland)

3.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

3.2.1 Für die HPLC-Messung bei lipophilen Antioxidantien:

- Delta Tocopherol (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland)
- Gamma Tocopherol (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland)
- Alpha Tocopherol (Fluka, Neu-Ulm, Deutschland)
- Q 7 (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland)
- Q 9 (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland)
- Q 10 (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland)
- QH₂9
- QH₂10

- Hexan (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

3.2.2 Für das HPLC-Laufmittel:

- Lithium Perchlorate (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 2-Propanol HPLC-Grade (Aldrich-Sigma, Steinheim, Deutschland)
- Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

3.2.3 Für Bestimmung der FA im Plasma mittels GC-FID:

- Heptadekansäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Butylhydroxytoluol (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland)
- Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Acetylchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Toluol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Na₂CO₃ (Merck, Darmstadt, Deutschland)

3.2.4 Für Bestimmung von Vitamin C:

- MPO 5-Metaphosphatsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP) (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland):
50 mg DCIP ad 500 ml Wasser
- Citrat-Acetat-Puffer: 22g Trinatriumcitratdihydrat ad 100 ml Wasser, pH 4,15
- Ascorbat (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland)
- Trinatriumcitratdihydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)

3.2.5 Für Bestimmung des Cholesteringehalt:

- Chol CHOD-PAP-Methode (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland)

3.2.6 Für Herstellung der Hirnhomogenate:

- **Lysepuffer A:** 0,05 M Kaliumphosphatpuffer (Merck, Darmstadt, Deutschland), 100 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,2 % Sarcosyl (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland), 5 Tabletten Boehringer complete Protease Inhibitor Mix ad 50 ml Puffer, kupferfrei pH 7,8
- **Lysepuffer B:** 100µM Butylated Hydroxytoluene (BHT) (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland), 1 mM EDTA (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland), 1 x PBS kupferfrei pH 7,6
- 1 x PBS (Phosphate Buffered Saline) (Seromed): 9,55 g Instamed PBS Dulbecco/l bidest. Wasser

3.2.7 Für Bestimmung der TBARS:

- TBA (Thiobarbitursäure) (Sigma Chemie, Taufkirchen, Deutschland): 1% in Wasser

3.3 Transgene Tiere

In unseren Experimenten wurde die Funktion des Prionproteins an verschiedenen transgenen Mauslinien eruiert. Hierzu untersuchten wir unterschiedliche Tierlinien, die das Prionprotein sowohl quantitativ, als auch qualitativ unterschiedlich exprimieren. Somit wurden Mäuse untersucht, die das Prionprotein überexprimieren, bzw. ein deletiertes Prionprotein aufweisen. Unter Standardbedingungen erfolgte die Zucht der Tiere in den institutseigenen Tierhaltungsräumen des Zentrums für Neuropathologie und Prionenforschung der LMU München unter der Leitung von Prof. Dr. Hans A. Kretzschmar. In dieser Arbeit kamen sechs verschiedene Mausmodelle zum Einsatz.

Wildtyp-Mäuse: Die Tiere wurden durch Kreuzung zwei verschiedener Wildtyp-Linien (C57/BL6 und 129/Sv) entwickelt. Sie exprimieren ein genetisch unverändertes Prionprotein. Alle anderen Mauslinien mit Prionproteinmutationen basieren auf dieser genetischen Matrix. Da diese Tiere ein normales unverändertes Prionprotein exprimieren, kann von einer normalen antioxidativen Funktion des Prionproteins ausgegangen werden. Somit können die hier detektierten oxidativen Stressparameter als Kontrollparameter angesehen werden. Aufgrund des unveränderten Prionproteins wurde in dieser Gruppe keine erhöhter oxidativer Stress erwartet.

Knockout-Mäuse (PrP^{0/0}): In der Knockout-Gruppe wurden Abschnitte des Prionprotein-Gens entfernt und durch Neomycinresistenzgenabschnitte ersetzt. Diese Gruppe exprimiert kein Prionprotein und ist somit gegenüber Infektionen mit Prionen resistent. Diese Gruppe wurde vor dem Hintergrund der C57/BL6 mit 129/Sv-Wildtyp generiert (Fischer et al. 1996 und Bueler et al. 1992; 1993). Aufgrund des fehlenden antioxidativen Schutzes, bedingt durch das fehlende Prionprotein, wurde in dieser Gruppe eine deutliche Erhöhung der oxidativen Stessparameter erwartet. Ein erhöhter Verbrauch an Ascorbat und lipophilen Antioxidantien, sowie eine erhöhte Lipidperoxidation wären somit Ausdruck einer verstärkten Oxidation.

Tg35-Mäuse: Diese Mäuse zeichnen sich dadurch aus, dass sie vier bis fünffach mehr PrP als Wildtyp-Mäuse exprimieren. Klinisch zeigten sie ab dem 4. Lebensmonat eine Parese der Hinterläufe. Bei Infektionen mit Scrapie-Erregern zeigen die Tg35 Mäuse eine kürzere Inkubationszeit als Wildtyp-Tiere (Fischer et al. 1996). Basierend auf der Hypothese der antioxidativen Funktion des Prionproteins sollten diese Tiere einen besonders guten antioxidativen Schutz aufweisen. Somit sollten hier, im Vergleich zu allen anderen Mausreihen, die höchsten Werte der lipophilen und hydrophilen Antioxidantien und keine gesteigerte Lipidperoxidation gemessen werden.

C4-Mäuse: Bei diesen Tieren wird ein Prionprotein exprimiert, dem die Oktapeptid-Region (Aminosäuren 32-93) und damit die kupferbindende Region fehlt. Dieser Region wird eine Schlüsselrolle in der antioxidativen Funktion des Prionproteins zugesprochen. Die Reihe zeigt sich homozygot für das Transgen (Shmerling et al. 1998) und produziert viermal so viel PrP im Vergleich zum Wildtyp. Bei C4-Mäusen ist eine Infektion mit Scrapie möglich, wobei die Inkubationszeit um das 30fache prolongiert ist (Flechsing et al. 2000). Aufgrund der fehlenden kupferbindenden Region wird in dieser Gruppe ein Verlust der antioxidativen Funktion des Prionproteins erwartet. Hier wird, im Vergleich zur Wildtyp und Tg35 Gruppe, mehr Oxidation und somit einer stärkerer Verbrauch von lipophilen und hydrophilen Antioxidantien erwartet.

E57-Mäuse: In dieser Gruppe wurde das Prionprotein um die Aminosäuren 32-121 verkürzt. Damit fehlt auch dieser Gruppe die kupferbindende Domäne. Das verkürzte Prionprotein wird 6fach häufiger exprimiert im Vergleich zum Wildtyp. Im Vergleich zur den C4-Tieren zeigen die Tiere der E57-Gruppe im Alter von 6-8 Wochen eine Parese der Hinterläufe, sowie eine Ataxie und Gewichtsverlust auf. (Shmerling et al. 1998). Durch die Überexprimierung des verkürzten Prionproteins könnte noch ein gewisser antioxidativer Schutz bestehen. Man würde dann eine geringere Oxidation in dieser Gruppe im Vergleich zu Wildtypmäusen erwarten.

F35-Mäuse: Diese Tiere exprimieren ein um die Aminosäuren 32-134 verkürztes Prionprotein. Damit sind sie ebenfalls um den N-terminalen kupferbindenden Anteil verkürzt. Im Vergleich zur C4 Gruppe liegt jedoch eine um 41 Aminosäuren längere Deletion vor. Die Expression liegt 2-fach über der im Vergleich zum Wildtyp. Im Alter von 3-4 Wochen zeigen diese Mäuse eine Ataxie und eine Parese der Hinterläufe. Des weitern weisen sie Tremor und Gewichtsverlust auf (Shmerling et al. 1998). Durch Kreuzung mit Wildtyp-Mäusen erfolgte die Zucht der E57- und F35-Mäuse, da die alleinige Expression des verkürzten Prionproteins zu einer Ataxie und Parese der Hinterläufe und außerdem zu Infertilität führte. Um die Weiterzucht durch Kontrolle des genetischen Hintergrundes zu sichern, wurden Schwanz-Biopsien entnommen und es erfolgte eine Überprüfung der DNA der Mäuse mittels PCR. Für die Zucht wurden nur heterozygote Tiere eingesetzt, welche das verkürzte und das Wildtyp-Prionprotein enthielten. Kranke Tiere, die nur das verkürzte Prionprotein-Gen zeigten, wurden zu Versuchszwecken eingesetzt. Im Vergleich zu Wildtyp-Tieren würde man einen besseren antioxidativen Schutz erwarten. Aufgrund der längeren Deletion könnte der Verbrauch der Antioxidantien bei diesen Tieren im Vergleich zu C4 Tieren verstärkt sein.

3.4. Methoden

3.4.1. Herstellung der Hirnhomogenat-Aliquots

Die Hirnhomogenate wurden von Frau Dr. rer. Nat. Inga Böll an der LMU in München vorbereitet und anschließend gefroren an die Uniklinik Eppendorf in Hamburg gesandt. Dabei wurden Hirne von drei Monate alten Mäusen (Wt; PrP^{-/-}; C4; Tg57; E57; F35) herausgenommen, in Hemisphären geteilt und in 1,8 ml Kryoröhrchen von Nunc einzeln gewogen. Der längeren Haltbarkeit wegen, wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren. Pro Tier wurden zwei Ansätze angefertigt: Die eine Hemisphäre wurde für die Messungen in München verwandt, wohingegen die andere Hemisphäre nach Hamburg verschickt worden ist, um hier, im Rahmen dieser Dissertation, unter anderen Gesichtspunkten (siehe unten) untersucht zu werden. Die Trennung der Ansätze war notwendig, da zur Herstellung der Hirnhomogenate unterschiedliche Homogenisierungs-Methoden und Puffersysteme angewandt worden sind. Zur Vorbereitung der Proben für die einzelnen Messungen sind die Hemisphären jeweils in einem 15 ml Falcon-Gefäß 1 + 9 mit einem Lysepuffer A versetzt worden und mit einem Sonikator (Sonoplus, Bandelin) bei 60 % Leistung für 2 x 30 Sekunden auf Eis homogenisiert. Anschließend wurden die Proben in 2 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bei 4°C für 10 Minuten bei 10.000 rpm (Tisch-

Kühlzentrifuge 5415R, Eppendorf) zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in 150 µl aliquotiert (ca. 10 Aliquots) und nach Begasung mit Stickstoff bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

In einem zweiten Schritt fand dann die Vorbereitung der Proben für meine Messungen in Hamburg statt. Dazu wurden die Hemisphären 1 + 9 erneut mit einem Lysepuffer B versetzt. Anschließend erfolgte das Homogenisieren bei 500 rpm mit einem Potter-Homogenisator in Glaspistillen (Schütt) für fünf Minuten auf Eis. Als nächstes werden die Proben bei 4°C für 20 Sekunden bei 10.000 rpm (Tisch-Kühlzentrifuge 541R, Eppendorf) anzentrifugiert und dann wird der Überstand in 250 µl aliquotiert (vier Aliquots). Als finaler Schritt wird das ganze mit Stickstoff begast und bei -80°C eingefroren.

3.4.2. Bestimmung der Fettsäuren

Die Messung der Fettsäuren erfolgt mittels Gas Chromatographie mit Flame Ionisation Detection (GC-FID) unter äußerst hohen Temperaturen (250-300°C) [Kontush et al. 1996]. Damit die Fettsäuren bei diesen Temperaturen stabil bleiben, werden sie nach ihrer Extraktion aus den Homogenaten metyliert. Anschließend werden die Fettsäuren von den Lipiden durch Hydrolyse abgespalten, um den Gehalt der Gesamtfettsäuren zu bestimmen. Die einzelnen Fettsäuren – (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) bilden zusammengefasst den Gesamtfettsäurenbestand. Bei den Messungen habe ich jeweils die gesättigten, die einfach ungesättigten und die mehrfach ungesättigten (PUFA's) Fettsäuren summiert und dann ihren prozentualen Anteil an den Gesamtfettsäuren bestimmt. Die Konzentrationen der einzelnen Fettsäuren wurden mittels der Software des GC (HP ChemStation) ermittelt. Die jeweilige Probe wird aufgetaut und nach dem Auftauen gevortext. Daraufhin werden zu 100µl Homogenatprobe 100 µl Heptadecansäure (17:0)-Lösung (200mg/l im Ethanol) als Standard, 25 µl Butylhydroxytoluol als Antioxidanz (es vermindert die Oxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren) und 2000 µl Methanol : Toluol 4: 1 v/v in ein Pyrex-Röhrchen hinzupipettiert. Im nächsten Schritt werden 200 µl Acetylchlorid zur Hydrolyse langsam unter Vortexen hinzugefügt. Daraufhin werden die Pyrex-Röhrchen 1 Std. bei 80°C im Trockenschrank inkubiert. Die Röhrchen läßt man ca. 5 min. bei Raumtemperatur abkühlen und versetzt sie dann vorsichtig (Schaumbildung möglich) mit je 5 ml 6% wässriger Lösung von Na₂CO₃. Anschließend werden die Röhrchen wieder verschlossen 30 Sekunden gevortext und 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Ungefähr 250 µl der oberen Toluolphase werden in ein

Eppendorf-Röhrchen abpipettiert und unter Stickstoff abgedampft. Der im Eppendorf-Röhrchen verbleibende Niederschlag wird in 20 µl Toluol aufgenommen. Die Spritze, mit der die Probe in die GC-FID-Anlage eingespritzt wird, wird wie folgt beschickt: 1 µl Toluol, 1 µl Luft, 1 µl Probe und wieder 1 µl Luft. Mit Hilfe der speziellen Software HP ChemStation wurde die Konzentration der Fettsäuren bestimmt. Aus der Summe des Gehaltes von insgesamt 23 Fettsäuren (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) setzt sich der Gesamtfettsäuregehalt zusammen. Die gesättigten, die einfach ungesättigten und die mehrfach ungesättigten Fettsäuren wurden jeweils summiert und anschließend wurde ihr prozentualer Anteil an den Gesamtfettsäuren bestimmt.

3.4.3. Cholesterinbestimmung:

Die eingefrorenen Proben werden aufgetaut und einmal für ca. 10 Sekunden gevortext. Dann entnimmt man 10 µl Probe und gibt 1000 µl Reagenz hinzu und vortext es erneut für ca. 10 Sekunden. Danach lässt man das Gemisch für 15 min bei Raumtemperatur stehen, nach dieser Zeit kann die Probe photometrisch gemessen werden. Dazu wird eine Küvette mit dem Cholesterin-Kit in den Lichtgang des Photometers gestellt und anschließend wird das Photometer gegen dieses Medium eingenußt. Nun können die einzelnen Ansätze (Doppelwerte) gemessen werden.

3.4.4. Bestimmung der lipophilen Antioxidantien

Die Bestimmung der lipophilen Antioxidantien wie α -Tocopherol und Ubichinon erfolgte mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) [Finck et al. 1999]. Die Bestimmung der α -Tocopherol-Konzentration und Ubichinon-Konzentration und die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mittels spezieller Software (EZChrom, Pharmacia, Schweden). Von der aufgetauten und gevortexten Probe werden 100 µl entnommen und mit 100 µl Standardlösung versetzt, die sich folgendermaßen zusammensetzt: 30 µl Q7 (1,5 µM); 40 µl Delta- Tocopherol (6µM); 30 µl ETOH. Nach kurzem Vortexen werden dem Ganzen 500 µl Hexan hinzugefügt. Anschließend wird es erneut gevortext und 3 min. bei 13000 rpm (Tischzentrifuge, Eppendorf) und 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wird abgenommen, in 400 µl Hexan aufgenommen und anschließend abgedampft. Als letzten Schritt nimmt man den Niederschlag in 200 µl ETOH auf und 150 µl des Gemisches werden in die HPLC-Anlage eingespritzt. Methanol,

Ethanol und 2-Propanolol im Verhältnis 18:5:2 dienen als Laufmittel. Pro Liter des Laufgemisches werden 1,425 g Lithiumperchlorat zugegeben. Delta-Tocopherol dient während der Messung als interner Standard. Für die Bestimmung der lipophilen Antioxidantien mittels HPLC-Messung, wurden drei externe Standards mit unterschiedlichen Konzentrationen benutzt.

3.4.5. Bestimmung von Vitamin C

Bei der Bestimmung der Ascorbatkonzentration im Hirngewebe wurde die Vitamin C-abhängige Reduktion des Farbstoffes 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCIP) bei einer Absorption von 520 nm gemessen [Omaye et al. 1979]. Nach dem Auftauen und vortexen der Probe werden 200µl Homogenat entnommen und erst mit 200µl 10% iger und dann mit weiteren 300µl 5% iger Metaphosphorsäure in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen versetzt und bei 13000 rpm (Tischzentrifuge, Eppendorf) 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Vom Überstand werden 400 µl abpipettiert und mit 200µl Citrat-Acetat-Puffer vermischt. Bei der photometrischen Messung wird der Probe 200µl 2,6 Dichlorphenolindophenol hinzu gegeben und anschließend kurz gevortext. Das Photometer wird gegen Luft eingenußt und nach dem Mischen der Proben und dem Verstreichen von 30 Sekunden nach Zugabe des Farbstoffes wird die Absorption bei 520 nm bestimmt. Nach dieser ersten Messung werden einige Ascorbat-Kristalle in die Küvette getan und mit Hilfe eines Spatels aufgelöst. Es muß soviel Ascorbat hinzugefügt werden, dass das DCIP vollständig reduziert worden ist, dies ist an einer Entfärbung der Probe zu erkennen. Daraufhin wird erneut gemessen. Bei jeder Vitamin C Bestimmung werden zu den erhaltenen Werten jeweils auch zwei Blindwerte benötigt. Dazu werden 400 µl 5% Metaphosphorsäure mit 200µl Citrat-Acetat-Puffer vermischt. Als nächstes werden 200µl DCIP hinzugegeben und nach 30 Sekunden die Absorption bei 520 nm bestimmt. Wie auch bei den Proben wird eine zweite Messung nach Zugabe des Ascorbats durchgeführt. Für die einzelnen Proben werden nach folgender Formel die Werte berechnet: $Absorption = (Reagenzblindwert - Reagenzblindwert \text{ nach Reduktion}) - (Probe - Probe \text{ nach Reduktion})$. Um nun eine Vit. C Konzentration für die errechneten Absorptionswerte zu erhalten, muß eine Eichgerade erstellt werden. Dazu werden als Standards 200 mg Ascorbat im Meßkolben mit einer 5% Metaphosphorsäure auf 10 ml aufgefüllt. Davon werden 100µl ebenfalls mit einer 5% Metaphosphorsäure auf 1 ml, davon noch einmal 100µl auf 1ml und davon nach einmal 100 µl auf 1 ml aufgefüllt. Die auf diese Art erstellte Eichlösung mit einer Vitamin C Konzentration von 20 µg/ml wird in einer Verdünnungsreihe in sechs Schritten jeweils im Verhältnis 1:1 mit 5%iger Metaphosphorsäure versetzt, und von jedem Verdünnungsschritt werden 2 * 400µl in Reagenzgläser abpipettiert. Das weitere Vorgehen und

die Messungen entsprechen den der Homogenat-Proben. Aus den auf diesem Wege erhaltenen Vitamin C Absorptionswerten für die Konzentrationen 20 µg/ml; 10 µg/ml; 5 µg/ml; 2,5 µg/ml; 1,25 µg/ml und 0,625 µg/ml wird die Eichgerade erstellt.

3.4.6. Bestimmung der Lipidperoxidation mittels thiobarbitursäurereaktiver Substanzen

Wie bereits im Teil Einleitung erklärt reagieren Lipidperoxidationsprodukte, auch thiobarbitursäurereaktive Substanzen genannt, unter Aufkochen mit Thiobarbitursäure zu einem purpurfarbenen Konglomerat, das dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 532 nm bestimmt werden kann. Die Quantifizierung erfolgt in der Regel anhand einer Eichgeraden. Zur Herstellung der Eichgeraden dient Malondialdehydbisdiethylacetal (MDA), welches in wässrigen Medien schwer löslich ist. Somit ist zwar die Linearität der einzelnen Eichgeraden gesichert, jedoch ist die Reproduzierbarkeit während der Herstellung der Eichwerte nur minimal gewährleistet. Vor diesem Hintergrund wurde hier auf die Anwendung einer Eichgeraden verzichtet und dafür wurden die Absorptionswerte verglichen. Aus Gründen der Reproduzierbarkeit und um mögliche Tagesschwankungen in der Methodik zu minimieren, wurden alle zu vergleichenden Proben zeitgleich fertig gestellt und gemessen [Persky et al. 2000, Slater 1984]. In einem ersten Schritt werden die Homogenate mit 10 %iger TCA gefällt, indem man 150 µl Homogenat mit 900 µl 10 %iger TCA versetzt, anschließend vortext und das Gemisch zehn Minuten bei 10.000 rpm in einer Eppendorf-Tischkühlzentrifuge zentrifugiert. Von dem so entstandenen Überstand werden 750 µl abpipettiert und mit 1 %iger TBA versetzt. Anschließend wird alles gemischt und 20 Minuten bei 95 °C gekocht. Danach werden die Proben mittels Eis abgekühlt und nun kann die Messung der Extinktion bei 532 nm photometrisch erfolgen. Die Messung einer Leerprobe aus 750 µl 10 % iger TCA und 150 µl 1 %iger TBA dient hier als Referenzwert.

Die Messungen der TBARS wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Dr. rer. nat. Inga Böll in der LMU München durchgeführt.

Laut Angabe von Frau Dr. rer. Nat. Böll erfolgte die Überprüfung dieser Methode mittels wasserstoffperoxidbehandelten und unbehandelten N2a-Zellen. Anhand der TBARS-Methode zeigte sich in vorherigen Studien bei Knockout-Mäusen eine Erhöhung der Lipidperoxidation im Vergleich zur Wildtypgruppe, was als Hinweis für oxidativen Stress gedeutet werden kann [Klamt et al. 2001].

3.5. Verwendete statistische Programme und Testverfahren

Alle gemessenen Parameter sind durch die Statistika Statistiksoftware zusammengefasst und ausgewertet worden. Auch die Testverfahren sind mit Hilfe von Statistika berechnet worden. Als statistischer Test für nicht parametrische Verfahren wurde der Mann-Whitney-U-Test eingesetzt. Soweit nicht anders angegeben wurde der Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt.

4. Ergebnisse:

4.1. Hydrophile Antioxidantien – Ascorbat (Vitamin C)

Die Proben der einzelnen transgenen Tiere wurden, wie bereits im Teil Methoden und Materialien beschrieben, für die Messung der Ascorbatkonzentrationen im Hirnhomogenat entsprechend vorbereitet. Bei den Untersuchungen wurden stets Doppelwerte bestimmt und immer mehrere verschiedene transgene Tiere innerhalb einer Messung untersucht

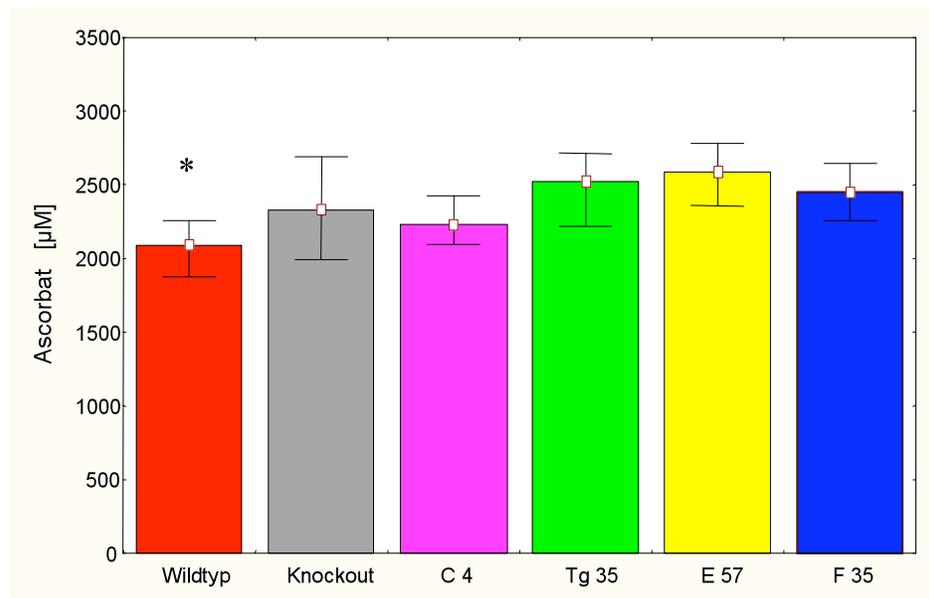


Abbildung 12: Ascorbatgehalt in Hirnhomogenaten der transgenen Tiere [je sechsmal Wildtyp, Knockout, C4 und Tg 35 (erhöhte Prion-Protein-Produktion); außerdem je vier mal E57 und F35 (verkürztes Prion-Protein). * p= 0,006 vs. Knockout und alle transgenen Reihen.

Wie man der Grafik entnehmen kann, weisen alle transgenen Tierreihen im Vergleich zu den Wildtyptieren signifikant höhere Ascorbatkonzentrationen auf. Gegenüber den Tieren mit einer erhöhten Prioprotein Produktion (Tg 35) entspricht dies der Erwartung. Erstaunlich ist jedoch, dass die Ascorbatkonzentration in den Mausreihen mit einer verminderten oder mutierten Prionprotein Produktion im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist. Hier hätte man ein inverses Ergebnis erwartet.

4.2 Lipophile Antioxidantien

Zur Bestimmung der lipophilen Antioxidantien wurden die Proben nach Vorschrift/Anleitung vorbereitet und anschließend mittels eines HPLC-Gerätes bestimmt.

4.2.1. Alpha-Tocopherol

Die Messungen der α -Tocopherol-Konzentration erfolgten in Hirnhomogenaten von sechs Tieren der Gruppen Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und von Tieren der Gruppen E57 und F35.

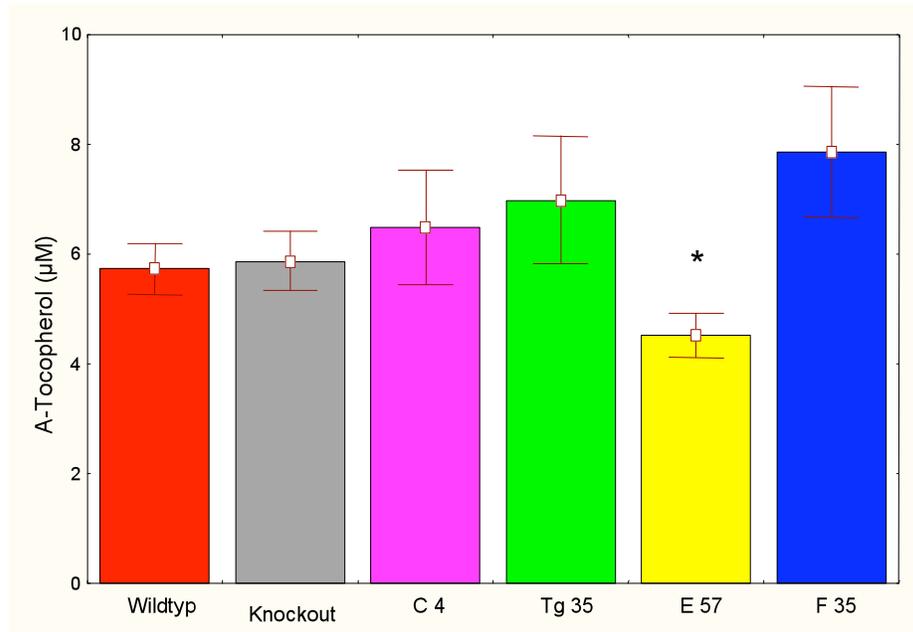


Abbildung Nr. 13: α -Tocopherol-Gehalt in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren.

Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen. * $p=0,02$ vs. Wildtyp, Knockout, C4, Tg 35 und F 35.

Bei der Bestimmung der α -Tocopherolwerte wiesen die Tiere der F 35 Gruppe die höchsten Werte auf. Diese Tiere zeigen sehr früh klinische Symptome und produzieren die doppelte Menge eines verkürzten Prionproteins. Signifikant in dieser Messreihe waren die deutlich erniedrigten α -Tocopherol Werte in der Gruppe der E57 Tiere. Diese Tiere exprimieren ein im Vergleich zum Wildtyp um die kupferbindende Region verkürztes Prionprotein in doppeltem Maße. Damit fehlt den transgenen Tieren die Region, die eine Schlüsselrolle in der antioxidativen Funktion des Prionproteins spielt. Diese deutlich verringerten Tocopherolwerte könnten auf erhöhten oxidativen Stress mit einem konsekutiven Mehrverbrauch an α -Tocopherol deuten.

4.2.2 Gesamtubichinon

Gesamtubichinon beschreibt die Untereinheiten Coenzym Q 9 und Q 10 zusammen. Die Coenzyme Q sind sowohl essenzielle Antioxidantien als auch Elektronencarrier in der inneren

Mitochondrienmembran. Ubichinon dient als Fänger für freie Radikale und ROS. Somit stellt der Verbrauch von Ubichinon einen Indikator für das Ausmaß des oxidativen Stresses dar.

Es ergaben sich beim Vergleich der Messergebnisse für Q9 und Q10 signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen transgenen Tiergruppen. Die Tiere der Knockout Gruppe, denen das Prion Protein und damit seine vermeintliche antioxidative Wirkung fehlt zeigen bei der Bestimmung des Gesamtubichinon eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den Tieren der C4 Gruppe auf. Bei den Knockouttieren hätte man auch eine deutliche Abnahme Ubichinonkonzentration als Zeichen des erhöhten Verbrauches erwarten können. Die hier vorliegenden Ergebnisse könnten jedoch auch als eine reflektorische Mehrsynthese von Ubichinon als Reaktion auf den erhöhten oxidativen Stress interpretiert werden.

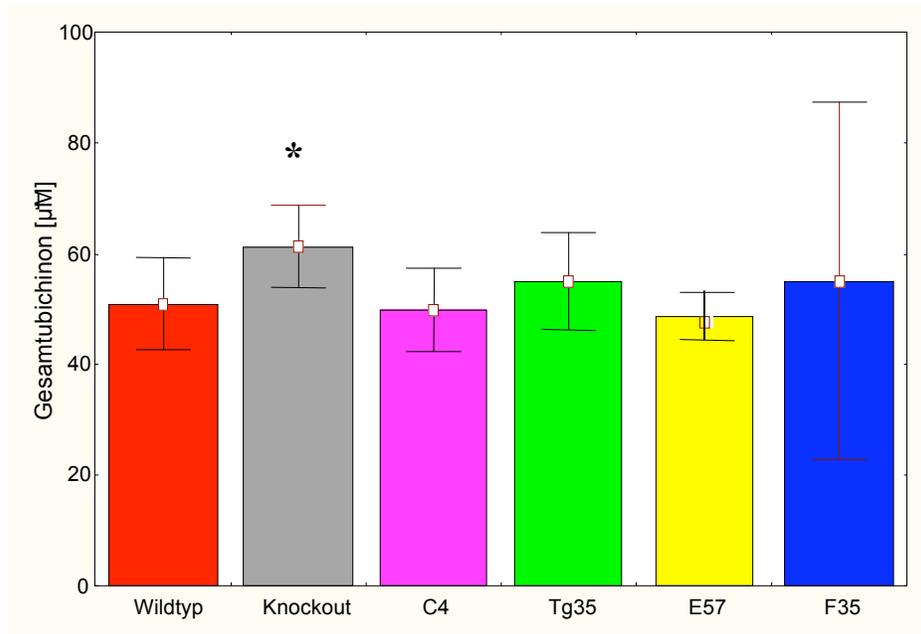


Abbildung Nr. 14: Gehalt des Gesamtubichinon in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen.). * $p=0,03$ vs. C 4

Besonders in der F35 Gruppe kam es zu großen Standardabweichung, die durch große Unterschiede in den Einzelmessungen bei geringer Fallzahl (Q9 und Q10) bedingt sind.

4.2.3 Ubichinon 9

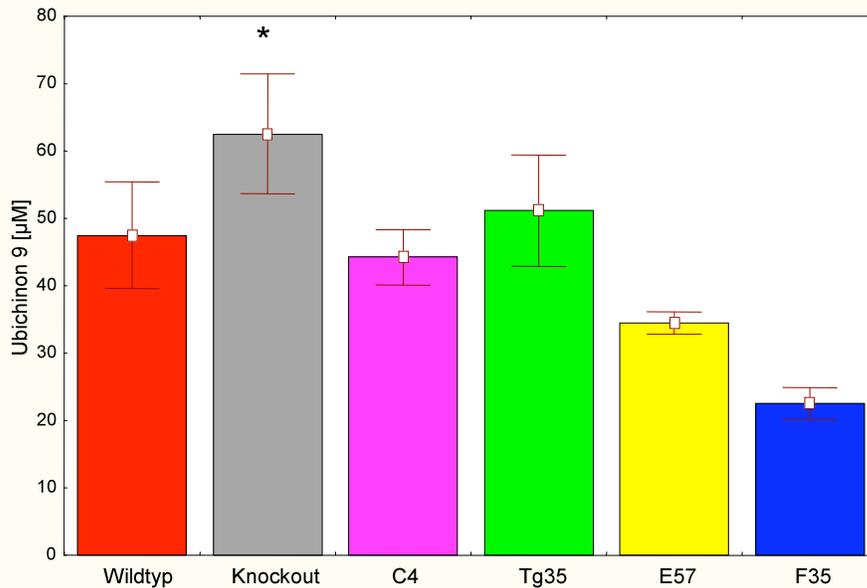


Abbildung Nr. 15: Gehalt an Ubichinon 9 in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen. * $p=0,03$ vs. C4

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich beim Vergleich von Knockout-Tieren mit C4 Tieren. Knockout-Tiere, die also das Prionprotein nicht exprimieren, weisen eine signifikant höhere Konzentration an Ubichinon 9 auf als C4 Tiere, die eine erhöhte Menge eines verkürzten Prionprotein produzieren, dem die kupferbindende Region fehlt. Als weiterer signifikanter Unterschied lies sich eine Erhöhung der Q9 Konzentration bei Knockout Tieren im Vergleich zu Wildtyp-tieren feststellen. Diese Ergebnisse entsprechen der Erwartung, wenn man davon ausgeht, dass es zu einer Mehrsynthese von Q9 bei erhöhtem oxidativem Stress kommt.

4.2.4 Ubichinon 10

Bei der Bestimmung des Gehaltes an Q 10 zeigten die F35-Tiere die höchste Konzentration an Q 10 und die C4 Tiere die niedrigste. Es ließen sich zwischen den Tieren der Gruppen Knockout und C4 signifikante Unterschiede feststellen. Dabei ist die Konzentration von Ubichinon 10 bei Tieren der Knockout-Gruppe gegenüber Tieren der Gruppe C4 signifikant erhöht.

Auch hier bestätigten die Tiere der Knockout Gruppe die Erwartungen. Die hohe Standardabweichung bei den E57 Tieren ist mit uneinheitlichen Resultaten und nur geringer Fallzahl in dieser Gruppe zu erklären.

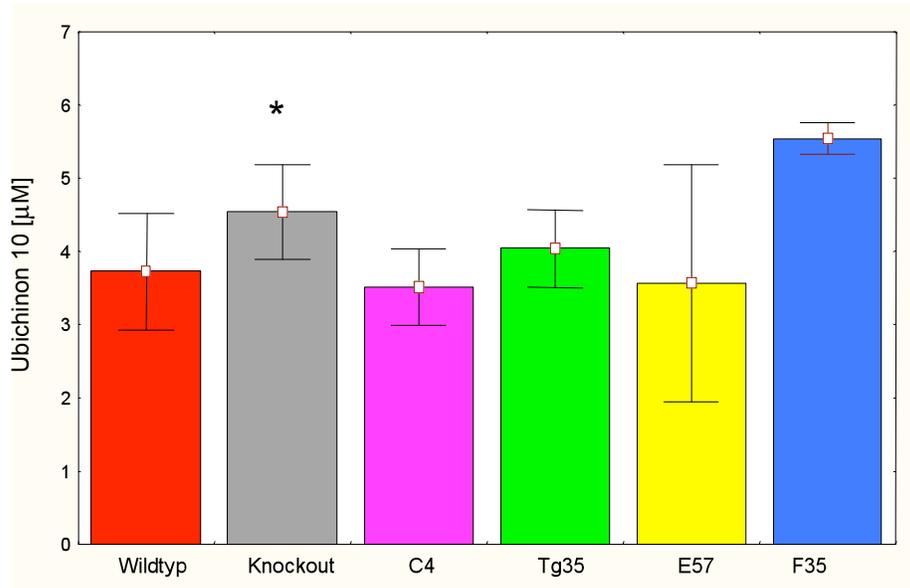


Abbildung Nr. 16: : Gehalt an Ubichinon 10 in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen. * $p=0,03$ vs. C4

4.2.5 Gesamtubichinol

Die Menge des Gesamt-QH₂ ergibt sich aus der Summe der Konzentrationen für QH₂9 und QH₂10. Unter Ubichinol versteht man die reduzierte Form des Ubichinon. Es entsteht über die Zwischenstufe Semichinon durch die Aufnahme von 2 Elektronen. Die Höhe des Ubichinols stellt einen indirekten Marker für die Höhe des oxidativen Stresses dar. In beiden Untergruppen, Ubichinol 9 und 10 zeigte sich der zu erwartende Trend bei den Knockouttieren und den Tieren mit einem Verlust ihrer antioxidativen Funktion des Prionproteins (C4). Der gezeigte Trend konnte jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtubichinonkonzentration aufweisen.

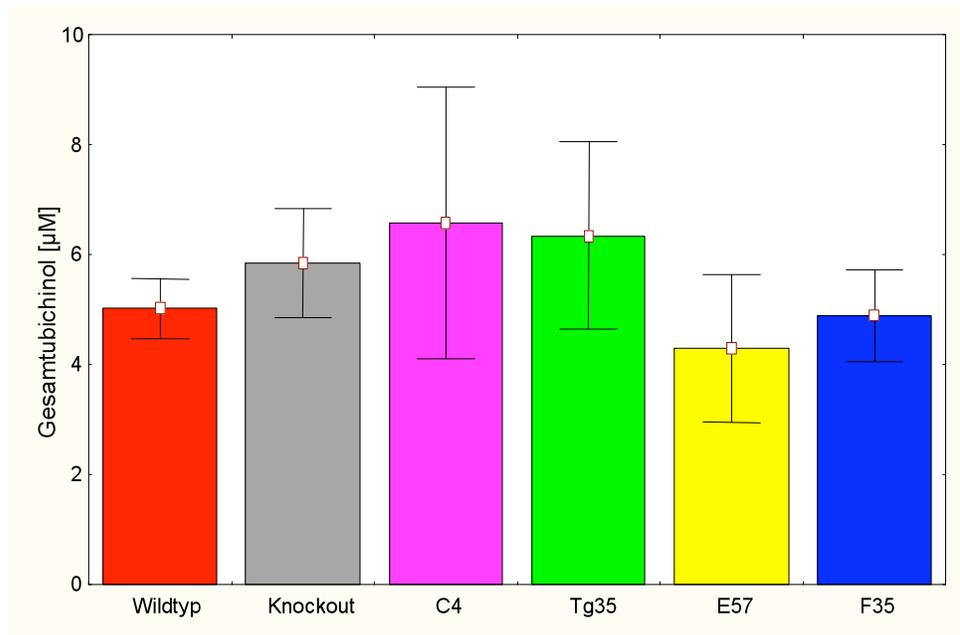


Abbildung Nr. 17: Gehalt des Gesamtubichinol in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen.

4.2.6 Ubichinol 9

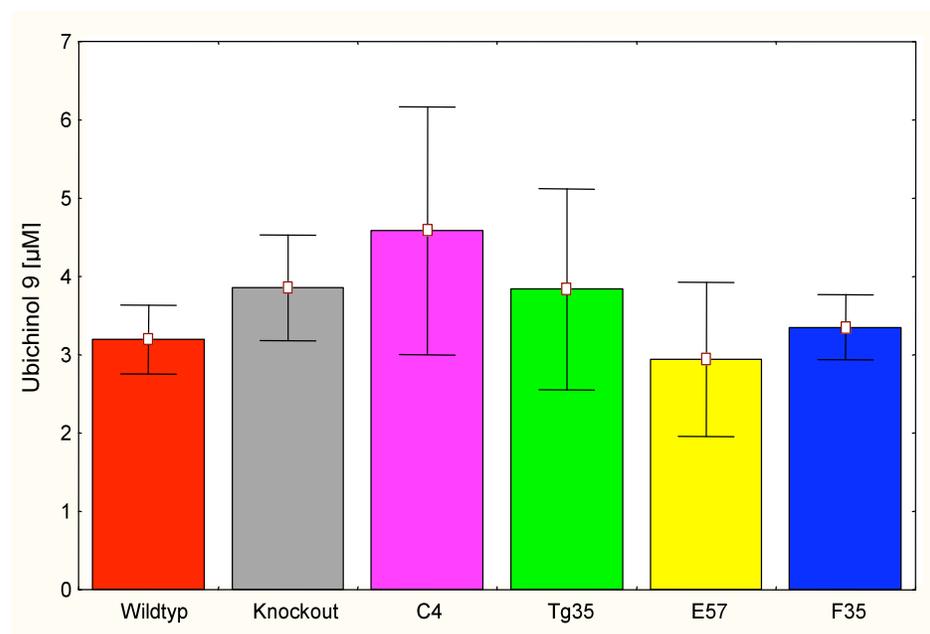


Abbildung Nr. 18: Gehalt an Ubichinol 9 in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen.

Bei den hier durchgeführten Messungen zur Bestimmung des Gehalts an Ubichinol 9 wiesen die C4 Tiere die höchste Konzentration und die E57 die niedrigste Konzentration auf.

Der gezeigte Trend einer vermehrten Ubichinolkonzentration als Ausdruck eines erhöhten oxidativen Stresses in der Gruppe der Knockout und C4 Tiere entspricht den Erwartungen. Eine Signifikanz des Trends ist jedoch nicht nachweisbar.

4.2.7 Ubichinol 10:

Bei der Bestimmung der Ubichinol 10 Konzentration zeigte die F35 Linie die niedrigsten Werte und die Knockout Tiere unter anderen die höchsten Werte. Die Werte in der F35 Gruppe zeigen eine signifikante Erniedrigung gegenüber der Knockoutgruppe. Diese Tiere exprimieren ein verkürztes PrP ohne den kupferbindenden N-terminalen Anteil. Sie produzieren dieses verkürzte Prionprotein jedoch zweimal häufiger als Knockout Tiere. Somit scheint noch eine restliche antioxidative Funktion erhalten zu sein. Dies würde die niedrigere Konzentration von Ubichinol erklären.

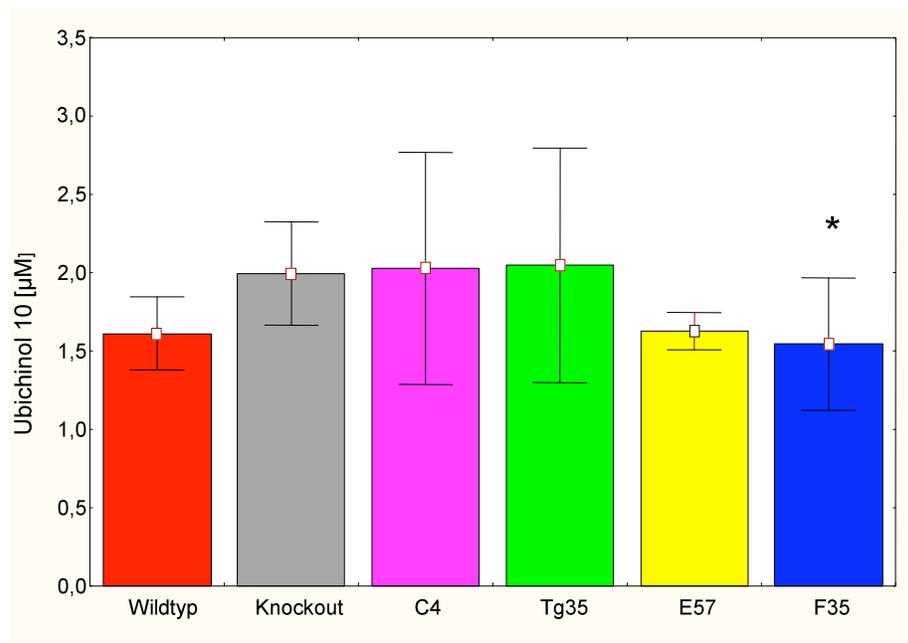


Abbildung Nr. 19: Gehalt an Ubichinol 10 in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen. * $p=0,03$ vs. Knockout.

4.3. Fettsäuren:

Bei allen Mausreihen wurde der Anteil der Gesamtfettsäuren, der Anteil an gesättigten, einfach ungesättigten und mehrfach ungesättigten Fettsäuren bestimmt. Die Detektion der einzelnen Fettsäuren erfolgte gaschromatographisch.

4.3.1 Gehalt der Gesamtfettsäuren, gesättigten Fettsäuren, einfach ungesättigte Fettsäuren und Verhältnis der gesättigten Fettsäuren am Gesamtfettsäurenbestand

Hier dargestellt sind die Mittelwerte der Tierreihen in Bezug auf deren Fettsäurenbestand.

Als Zeichen erhöhten oxidativen Stresses wäre mitunter eine Abnahme der ungesättigten FS bei den Knockouttieren und den Tieren mit verändertem Prionprotein erwartet worden. Signifikante Unterschiede waren jedoch nicht zu detektieren, daher wurde auf eine Darstellung in Form eines Säulendiagrammes verzichtet und die tabellarische Form gewählt.

	Wildtyp	Knockout	C4	Tg35	E57	F35
Gesamtfettsäuren Mittelwerte [mg/g]	2403,7	2692,0	2348,6	2386,9	2526,1	2383,9
Gesättigte FS Mittelwerte [mg/g]	988,5	1038,8	984,3	1004,7	1032,0	988,8
Einfachungesättigte FS Mittelwerte [mg/g]	507,0	573,2	521,1	509,3	533,5	515,2
Verhältnis gesättigte FS/ Gesamtfettsäuren [%]	41,7	38,8	42,2	42,1	41,0	41,4

Abbildung Nr. 20: Tabellarische Darstellung der Mittelwerte der Gesamtfettsäuren; der gesättigten FS; der einfachungesättigten FS und das Verhältnis der FS um Gesamtfettsäurenbestand.

4.3.2. Gehalt der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (MUFS – mehrfach ungesättigte Fettsäuren):

Die Bestimmung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren zeigte die höchsten Konzentrationen in der Gruppe der Knockouttiere. Die niedrigsten Werte wurden in der Gruppe der C4 Tiere und

Tg35 detektiert. Die hier beschriebenen Unterschiede erwiesen sich als statistisch signifikant. Tiere der C4 Gruppe überexprimieren ein verkürztes PrP ohne die kupferbindende Domäne. Den Knockouttieren fehlt das Protein hingegen gänzlich.

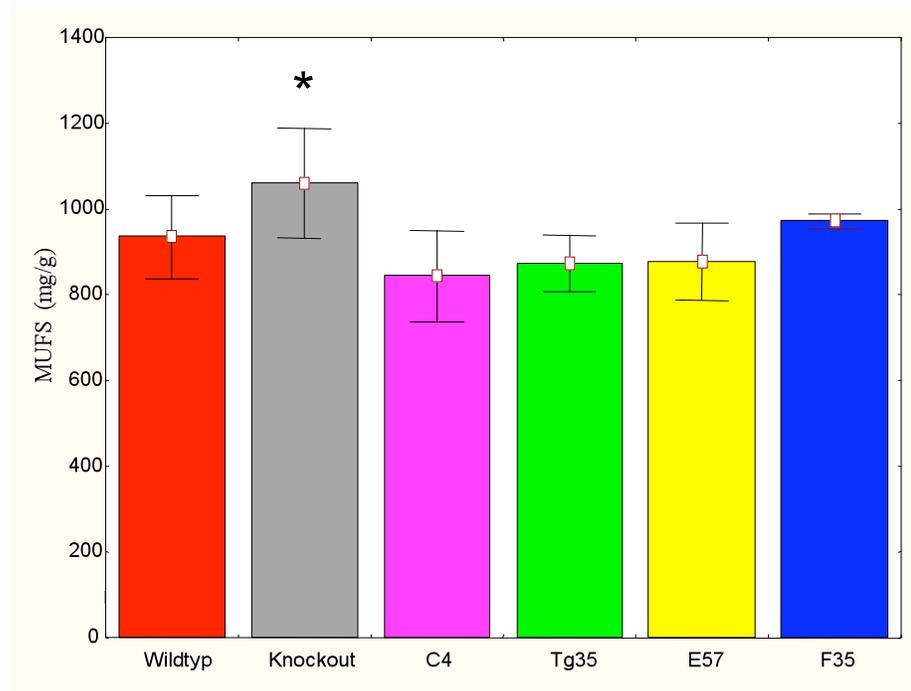


Abbildung Nr. 21: Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen. * $p=0,04$ vs. C4 und Tg35.

4.3.3. Anteil der einfach ungesättigten Fettsäuren (EUFS) am Gesamtfettsäurenbestand

Die Analyse der Ergebnisse wies signifikante Unterschiede für den Anteil der einfach ungesättigten Fettsäuren am Gesamtfettsäurenbestand auf. Damit ergibt sich eine signifikante Erhöhung der Werte für die C4 Tiere, die ein trunkiertes Prionprotein (ohne kupferbindende Domäne) überexprimieren im Vergleich zu Wildtypmäusen und Tg35 Tieren. Die Tiere der Tg 35 Gruppe überexprimieren das Prionprotein in fünffacher Form und lassen einen besonderen antioxidativen Schutz erwarten.

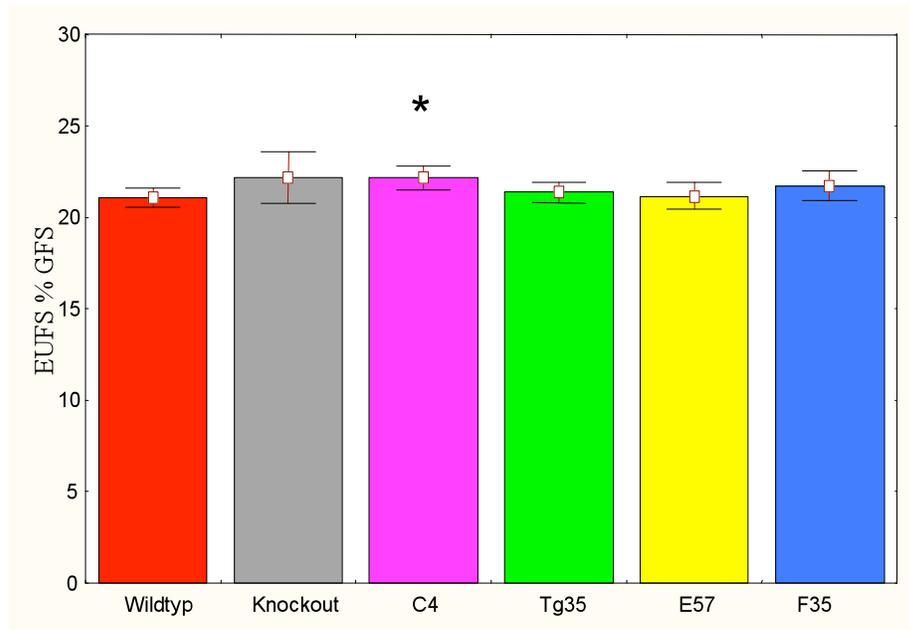


Abbildung Nr. 22: Anteil der einfach ungesättigten Fettsäuren an Gesamtfettsäuren in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen. * p = 0,01 vs. Wildtyp und Tg35.

4.3.4. Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (MUFS) am Gesamtbestand der Fettsäuren

Die höchsten Werte zeigten sich in der Gruppe der Knockouttiere. Diesen Tieren fehlt das Prionprotein und damit die vermutete antioxidative Eigenschaft. Die niedrigsten Werte zeigten sich in der Gruppe der C4 Tiere, die ein verkürztes Prionprotein exprimieren, dem die Kupferbindenderegion fehlt. Insgesamt ließen sich jedoch keine signifikanten Differenzen feststellen.

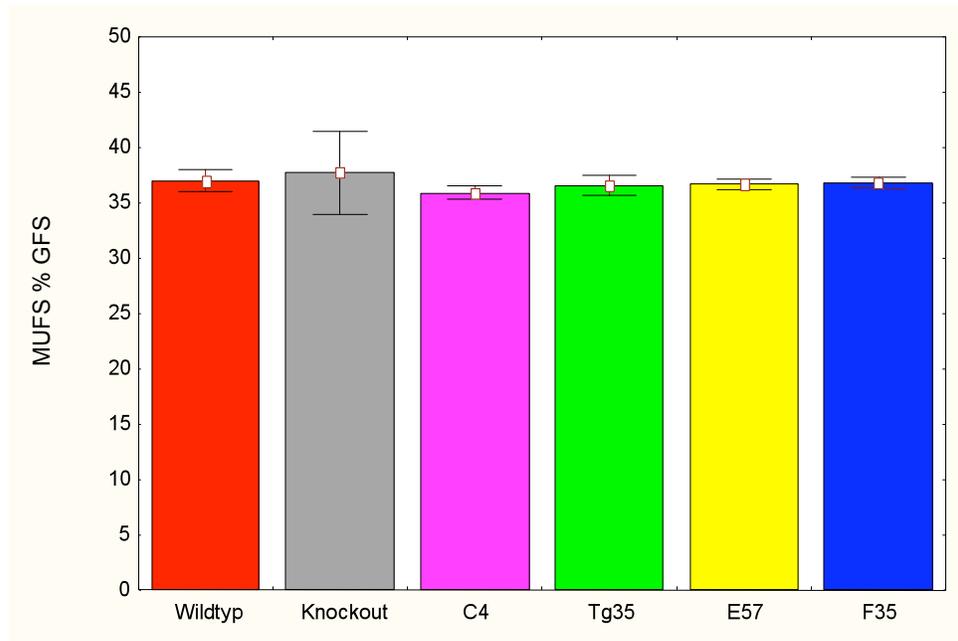


Abbildung Nr. 23: Anteil der mehrfach ungesättigten Fettsäuren an Gesamtfettsäuren in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen.

4.4. Cholesteringehalt

Bei der Bestimmung des Cholesteringehaltes zeigen alle anderen Gruppen im Vergleich zu den Wildtyptieren deutlich geringere Werte an. Die niedrigsten Werte wurden in der C4 Gruppe detektiert. Die deutlich niedrigen Werte der anderen Gruppen mit modifiziertem oder gar fehlendem Prionprotein im Vergleich zu der Wildtypgruppe erwiesen sich als statistisch nicht signifikant.

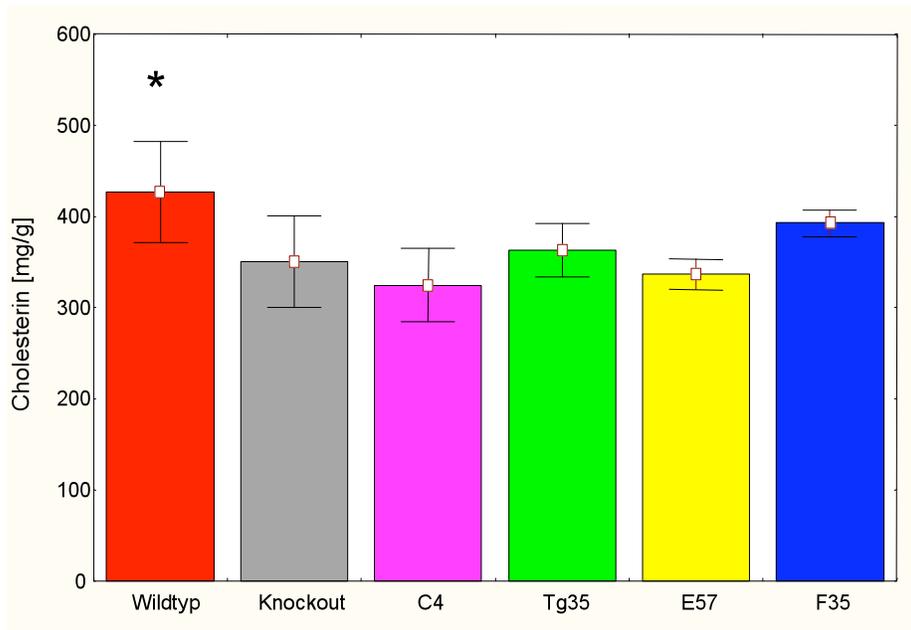


Abbildung Nr. 24: Cholesterin in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen. * $p=0,04$ vs. andere Gruppen.

4.5. Grafische Darstellung der einzelnen lipophilen Antioxidantien in Bezug auf den Gesamtgehalt der Fettsäuren

Diese Grafiken stellen den Anteil der Konzentrationen der lipophilen Antioxidantien (α -Tocopherol, Q 9, Q 10, QH₂9 und QH₂10) am Bestand der Gesamtfettsäuren dar.

4.5.1. Alpha-Tocopherol-Gehalt/Gesamtfettsäuren

Die Knockouttiere wiesen gegenüber den Tg35 und den F35 eine signifikant niedrigere Konzentration auf. Den Knockouttieren fehlt das antioxidativ wirksame Prionprotein. Die Tiere der Tg 35 und F35 überexprimieren das normale Prionprotein bzw. produzieren ein verkürztes Prionprotein. Diese Messungen wurden durchgeführt, um den Fehler zu vermeiden der entsteht wenn reichlich Fette durch die Nahrung aufgenommen werden. Denn dadurch steigt auch automatisch der Gehalt an lipophilen Antioxidantien. Man setzt daher den Anteil der fettlöslichen Antioxidantien in Relation zum Gesamtfett im Hirnhomogenat. Die deutlich niedrigeren Werte

der E57 Gruppe sind auf die signifikant erniedrigten A-Tocopherol Werte in dieser Gruppe zurückzuführen (wie o.g.).

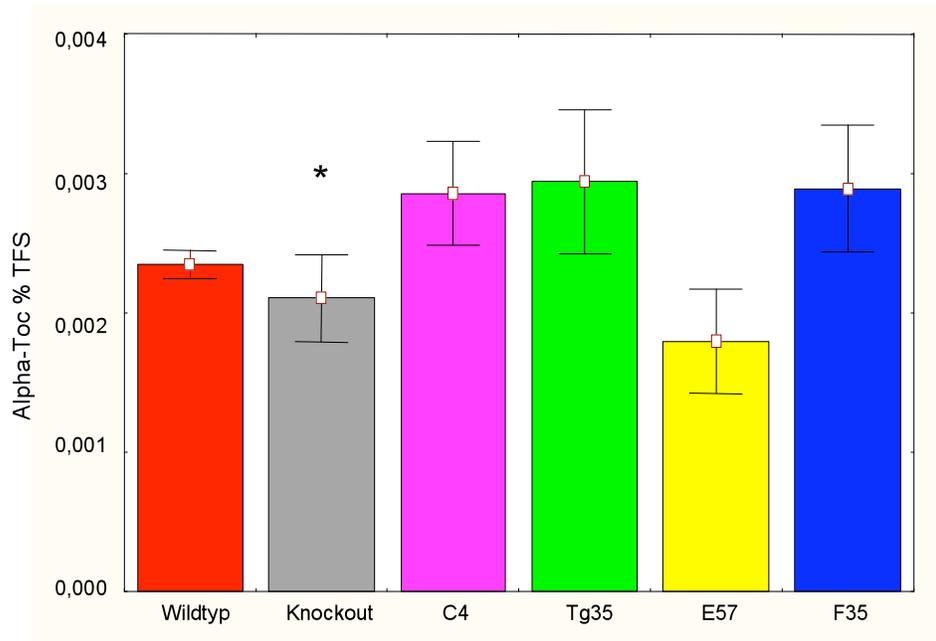


Abbildung Nr. 25: Verhältnis von A-Tocopherol zu Gesamtfettsäuren in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen. *p= 0,01 vs. Tg 35 und F 35.

4.5.2. Ubichinon 9- und Ubichinol 9-Gehalt in Bezug auf Gesamtfettsäuren

	Wildtyp	Knockout	C4	Tg35	E57	F35
Ubichinon 9/GFS [%]	2,03	2,24	2,01	2,04	1,5	2,03
Ubichinol 9/GFS [%]	0,17	0,19	0,28	0,26	0,18	0,21

Abbildung Nr. 26: Tabellarische Mittelwertdarstellung von Ubichinon 9 und Ubichinol 9 und deren prozentualer Anteil am Gesamtfettsäurenbestand. Keine signifikanten Unterschiede.

Es ließen sich weder reduzierte Mengen an Ubichinon-9 noch im Gegenzug erhöhte Mengen an Ubichinol-9 als Zeichen von erhöhtem oxidativen Stress detektieren. Auch ließen sich keine

signifikanten Unterschiede im Vergleich der einzelnen Tiergruppen feststellen. Auf grund der fehlenden Signifikanz wurde eine tabellarische Darstellung der Werte gewählt.

4.5.3. Ubichinon 10-Gehalt / Gesamtfettsäuren

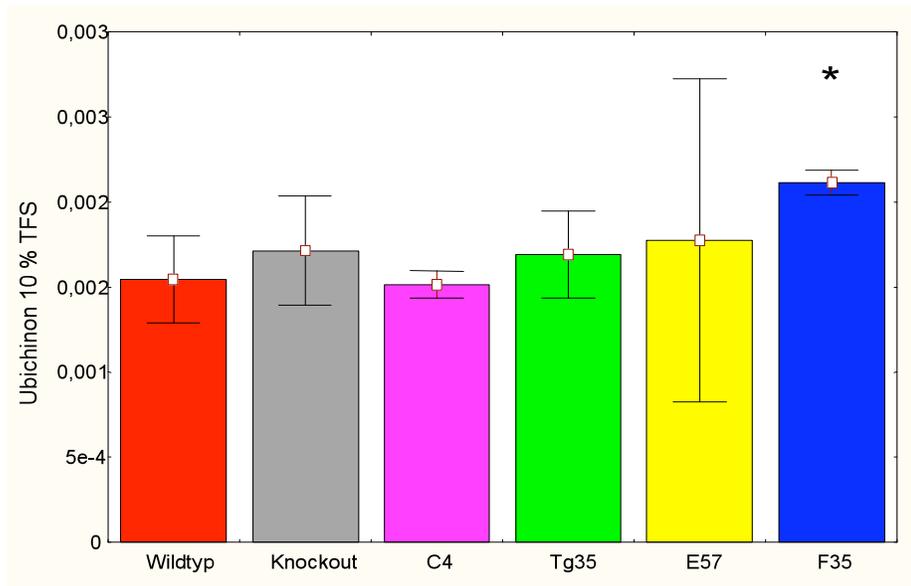


Abbildung Nr. 27: Verhältnis von Ubichinon 10 zu Gesamtfettsäuren in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen. * $p = 0,02$ vs. alle anderen Gruppen.

Bei der Untersuchung des Verhältnisses von Ubichinon 10 zu den Gesamtfettsäuren konnten signifikante Unterschiede beobachten werden. Die Tiere der Gruppe F35 wiesen gegenüber allen anderen Tieren, bis auf die E57 Tiere, ein signifikant höheres Verhältnis von Ubichinon 10 zu den Gesamtfettsäuren auf. Die niedrigsten Werte wurden in der C4 Gruppe sichtbar. Die hohen Standardabweichungen bei den E57 Tieren lässt eine eventuelle Verunreinigung einer Probe vermuten. Aufgrund der veränderten antioxidativen Funktion des Prionproteins in der F35 Gruppe hätte man eine Abnahme der Ubichinon Gruppe erwartet, dieser deutliche Anstieg ist eventuell auf eine reaktive Mehrproduktion zurückzuführen.

4.5.4. Ubichinol 10 / Gesamtfettsäuren

Beim Vergleich der einzelnen Tiergruppen untereinander konnten signifikanten Unterschiede in Bezug auf das Verhältnis von Ubichinol 10 an den Gesamtfettsäurenbestand ermittelt werden.

Dabei zeigten die Tiere aus der Tg 35 Reihe eine signifikante Erhöhung gegenüber allen anderen Tieren bis auf die C4 Tiere. Bei den C4 Tieren ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den anderen Tiergruppen feststellen. Der deutliche Anstieg läßt sich auf die gute antioxidativen Eigenschaften der Tg 35 Tiere zurückführen. Diese Tiere produzieren 4-5 mal mehr Prionprotein vom Wildtyp. Somit sollten sie eine besonders gute antioxidative Schutzfunktion aufweisen.

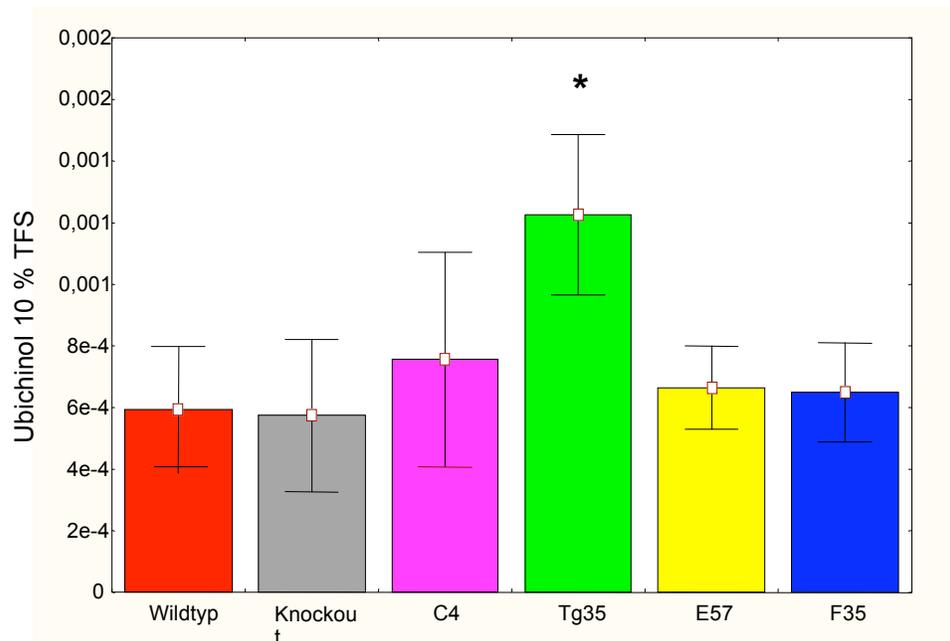


Abbildung Nr. 28: Verhältnis von Ubichinol 10 zu Gesamtfettsäuren in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen. * p= 0,01

4.6. Thiobarbitursäure-reaktive-Substanzen (TBARS)

Die nun folgenden, aufgelisteten Ergebnisse sind das Resultat von weiteren Messungen, die im Rahmen einer Dissertation im Fach Chemie von Frau Dr. rer. nat. Inga Böll an der LMU in München durchgeführt worden sind. Dabei wurde als ein weiterer Parameter des oxidativen Stresses die Lipidperoxidation anhand der TBARS bestimmt [Persky et al. 2000 und Levine et al. 1990]. Das Ausmaß der stattgehabten Lipidperoxidation wurde anhand photometrischer Absorptionswerte detektiert, indem man die entstandenen Oxidationsprodukte mit Thiobarbitursäure anfärbt. En details ist die Durchführung dem Teil Methoden und Materialien zu entnehmen.

4.6.1. Bestimmung der Lipidperoxidation

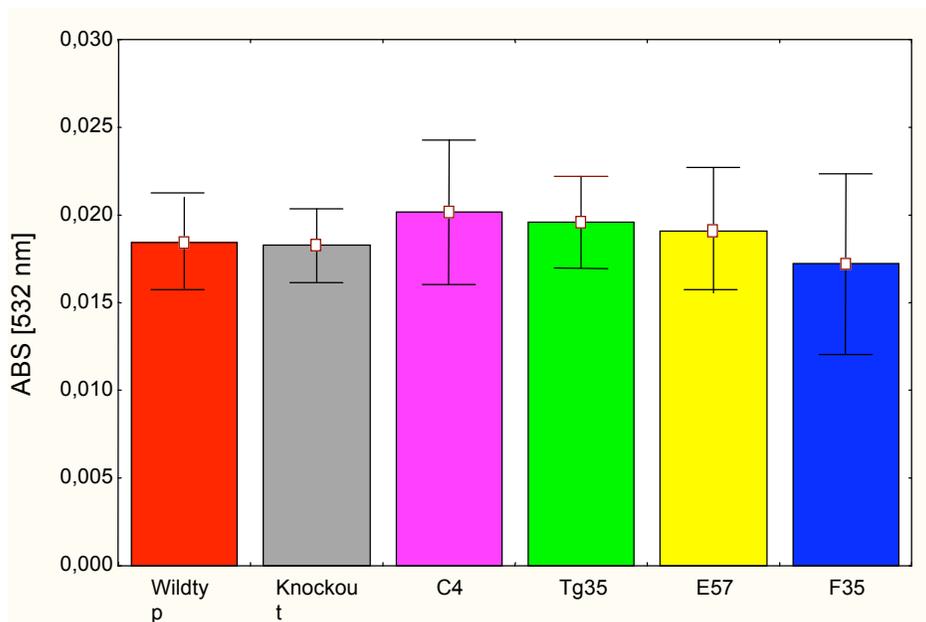


Abbildung Nr. 29: Grafische Darstellung der Absorptionswerte für die Lipidperoxidation in Hirnhomogenaten von Wildtyp-Tieren und transgenen Tieren. Je sechs Tiere der Linien Wildtyp, Knockout, C4 und Tg35 und jeweils vier Tiere der Linien E57 und F35 wurden gemessen

Die Messung der Wildtyp-Tiere, Knockout-Tiere, C4 und Tg35-Tiere erfolgte in Doppelbestimmung, die der E57- und F35-Tiere in Dreifachbestimmung.

Beim Vergleich der einzelnen Tierreihen zeigten die Tiere der C4 Gruppe, die ein verkürztes Prionprotein produzieren die höchsten Werte. Die niedrigsten Werte wurden in der F35 Gruppe

gemessen. Diese Tiere exprimieren ebenfalls ein verkürztes Prionprotein, dem die kupferbindende Region fehlt. Im Vergleich zu den C4 Tieren zeigen diese Tiere jedoch nach einigen Wochen klinisch Zeichen der Ataxie. Die diskutierten Unterschiede wiesen jedoch keine Signifikanz auf.

5. Diskussion:

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die These erörtert, dass es Hinweise für eine antioxidative Eigenschaft des Prionproteins gibt [Brown et al. 1997; Brown; Wong et al. 2000; Brown 1999; Brown und Besinger 1998]. Eine mögliche Konsequenz dieser Theorie wäre die Annahme, dass Tiere, bei denen das Prionprotein ausgeschaltet wurde - sog. Knockout-Tiere- Zeichen eines verminderten Schutzes vor Oxidantien erkennen ließen. Bei Primärzellkulturen konnte diese Verminderung des oxidativen Schutzes im Vergleich von Knockout mit Wildtyp-Tieren gezeigt werden [Wong et al. 2001a und 2001b; White et al. 1999]. Auf der anderen Seite müssten transgene Tiere, die eine Überexpression des Proteins aufweisen einen erhöhten antioxidativen Schutz aufweisen (Tg 35 Tiere) [Fischer et al. 1996]. Ein weiterer Aspekt ergibt sich aus der Beobachtung, dass die angenommene antioxidative Schlüsselrolle des Prionproteins eng mit der Fähigkeit zur Kupferbindung des Prionproteins verknüpft ist [Brown et al. 1997a, Kramer et al. 2001, Whittal et al. 2000]. Insbesondere der Bereich der sog. Octapeptid-Region des Prionproteins ist maßgeblich an der Kupferbindung beteiligt. Dem zur Folge müssten Tiere, denen diese kupferbindende Octapeptid-Region fehlt (C4 Tiere) [Fleching et al. 2000, Shmerling et al. 1998], ebenfalls deutliche Zeichen oxidativer Schäden aufweisen. Aufgrund der o.g. Beobachtungen und Schlussfolgerung bei Primärzellkulturen wurden im Rahmen dieser Arbeit bei den verschiedenen Mausreihen Parameter wie hydrophile und lipophile Antioxidantien bestimmt, deren ermittelte Konzentrationen eventuelle Aussagen über den oxidativen Status zulassen. Des Weiteren wurden Parameter des Lipidstoffwechsels bestimmt, dessen Veränderungen ebenfalls Aussagen über die oxidative Belastung zulassen. Um zu eruieren, ob der gemessene antioxidative Effekt auf die Expression des Prionproteins zurückzuführen ist und ein Artefakt durch die Einschleusung eines Transgens ausgeschlossen ist, testete man transgene Tiere, welche auf PrP-Knockout-Hintergrund eine Überexpression des Prionproteins aufweisen (Tg 35 Tiere) [Fischer et al. 1996]. Man erwartete bei dieser Gruppe einen deutlich erhöhten Schutz vor oxidativen Schäden. Des Weiteren wurden Tiere der Gruppen E57 und F35 [Shmerling et al. 1998] untersucht, die eine Deletion ihres Prionproteins in bestimmten Aminosäuresequenzen aufweisen. Bei diesen Tieren kann eine Funktionsstörung des Prionproteins durch die o.g. Deletionen vorliegen, welche dann ebenfalls die potentiellen antioxidativen Mechanismen des zellulären Prionproteins betreffen. Somit wäre auch bei diesen Tieren erhöhter oxidativer Stress zu beobachten.

5.1 Hydrophile Antioxidantien – Ascorbat:

Bei der Bestimmung der Ascorbatkonzentrationen fielen signifikant erhöhte Werte aller genetisch veränderten Mausreihen im Vergleich zum Wildtyp auf. Alle Mausreihen, bis auf die Knockoutmäuse, exprimieren das entsprechend veränderte Prionprotein in höherem Maße als die Wildtypiere. Die Tiere der Tg 35 Gruppe exprimieren das Prionprotein in unveränderter Form in fünfmal höherem Maße als der Wildtyp. Bei den C4, E57 und F35 Tieren liegt das Prionprotein um unterschiedlich lang turnkierte Aminosäuresequenzen verkürzt vor und wird unterschiedlich häufig überproduziert. Allen gemeinsam ist, dass immer die kupferbindende Octapeptidgruppe involviert ist, die eine Schlüsselrolle in der antioxidativen Funktion des Prioproteins zu spielen scheint. Der theoretischen Grundlage zur Folge würden wir erniedrigte Ascorbatkonzentrationen in der Knockoutgruppe und den Tieren der C4, E57 und F35 Gruppe als Zeichen erhöhten oxidativen Stresses erwarten. Die Tg35 Tiere, die das normale Prionprotein überexprimieren sollten daher einen deutlich besseren antioxidativen Schutz und damit höhere Ascorbatkonzentrationen aufweisen.

Die Tiere der Tg 35-Gruppe erfüllen die Erwartungshaltung einer verbesserten antioxidativen Funktion durch Überproduktion. Entgegen der theoretischen Annahme verhalten sich jedoch die Knockouttiere und die Tiere der C4, E57 und F35 Gruppe. Aufgrund der fehlenden Octapeptid-Region und der damit reduzierten antioxidativen Wirkung des deletierten Proteins hätte man bei diesen Tieren verminderte Ascorbatkonzentrationen als Zeichen des erhöhten oxidativen Stresses erwartet. Hier wurden aber ebenfalls erhöhte Konzentrationen des Ascorbats im Vergleich zum Wildtyp detektiert. Somit könnte ein Zusammenhang zwischen der Überexpremierung des trunktierten Prionproteins, die allen drei Gruppen gemein ist, und dem Anstieg der Ascorbat-Konzentration stehen. Interessanterweise scheint kein Zusammenhang zwischen den verschiedenen langen Deletionen der Aminosäuren am Prionprotein zu bestehen, da im Vergleich der transgenen Tiere keine signifikanten Konzentrationsunterschiede festgestellt werden konnten. Somit wird die These der Schlüsselrolle der kupferbindenden Octapeptidregion des Prionprotein gestärkt. Denn dieser Bereich ist bei allen trunktierten Mausreihen (C4, E57 und F35) in gleicherweise betroffen unabhängig von der Gesamtdelentionslänge. Ein weiterer Grund für einen Anstieg der Ascorbatkonzentration bei diesen Tieren könnte die Deletion der Aminosäuren am Prionprotein im Allgemeinen sein. Als direkte Folge könnte es zu einer reaktiven endogenen Ascorbatproduktion kommen. Sie wird möglicherweise hervorgerufen durch die transgenen Veränderungen und den damit verbunden möglichen Änderungen der antioxidativen Funktion des Prionproteins. Dieser Aspekt der endogenen Ascorbat-Produktion als Folge der Transgenität ist

nur im Tiermodell zu beobachten, da der menschliche Organismus nicht in der Lage ist Ascorbat zu produzieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die hier detektierten Veränderungen des antioxidativen Haushaltes in Bezug auf Ascorbat scheinbar nicht mit der angenommenen antioxidativen Funktion des Prionproteins in Zusammenhang stehen. Es sind signifikante Unterschiede zu erkennen und einige Tiermodelle verhalten sich wie es aufgrund der Präsenz des Prionproteins zu erwarten wäre (Tg35). Andere (C4, E57 und F35), mit einer trunkierten Form des Prionproteins, zeigen jedoch ein ähnliches Verhalten. Dies lässt sich nicht mit den Erwartungen vereinbaren. Zu beachten bleibt jedoch, dass sich innerhalb dieser transgenen Mausreihen kein signifikanter Unterschied zeigen ließ, womit wird die Wichtigkeit der kupferbindenden Octapeptidregion erneut bestätigt wird.

5.2 Lipophile Antioxidantien

5.2.1 Alpha-Tocopherol

Die F35 Tiere, die das Prionprotein in trunkierter Form im doppelten Maße produzieren und früh das klinische Bild einer Ataxie zeigen, wiesen die höchste Konzentration an Alpha-Tocopherol auf. Signifikant erniedrigt waren jedoch die Werte der E57 Gruppe gegenüber denen der Wildtyp-Tieren. Diese Tiere produzieren ein trunkiertes Prionprotein, dem die kupferbindende Octapeptidregion und damit ein Schlüsselement der antioxidativen Funktion fehlt. Die Tiere der E57 Gruppe exprimieren das veränderte Prionprotein 6-fach häufiger als andere Gruppen. So könnte man annehmen, dass erst diese quantitative Mehrproduktion des deletierten Prionproteins zu signifikanten Unterschieden im Vergleich zum Wildtyp führt. Denn auch den C4 und F35 Tieren fehlt die Octapeptidregion, aber sie überexprimieren das veränderte Protein nur 4- und 2-fach. Die höheren Werte der Tg35 gegenüber Knockout-Tieren könnte die Annahme einer verbesserten antioxidativen Funktion des Prionproteins bei diesen Tieren bestätigen. Jedoch ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen Tg35 und Knockout-Tieren feststellen. Wenn tatsächlich ein erhöhter antioxidativer Schutz bei diesen Tieren durch ihre Überproduktion des Prionprotein vorläge, hätten sich signifikante Unterschiede beim Vergleich der Tiere, die das Protein überexprimieren und denen den das Prionprotein gänzlich fehlt, ergeben müssen.

5.2.2 Gesamtubichinon und Gesamtubichinol

Bei der Gesamt-Ubichinon Bestimmung zeigte sich ein signifikanter Unterschied beim Vergleich von Knockout-Tieren mit C4 Tieren. Knockout-Tiere weisen eine signifikant höhere Konzentration an Ubichinon 9 und Ubichinon 10 auf als C4-Tiere. Als weiterer, signifikanter Unterschied ließ sich eine Erhöhung der Q9 Konzentration bei Knockout-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren detektieren. Die hier paradoxerweise in der Knockoutgruppe erhöhten Ubichinonwerte, also der Tiergruppe, die das antioxidativ wirksame Prionprotein nicht enthält, sind in der Form nicht erwartet worden. Sie könnten jedoch als reaktive Antwort auf erhöhten oxidativen Stress gesehen werden. Würde man Knockout-Mäuse und den damit verbundenen Verlust der antioxidativen Wirkung [Brown et al. 1997; Collinge et al. 1994; Kretzschmar et al. 1997] mit der Krankheit Scrapie, die ebenfalls zu einer pathologischen Veränderung des Prionproteins und dem Verlust der antioxidativen Wirkung führt [Prusiner 1998] gleichsetzen, so würden die hier ermittelten erhöhten Werte der Knockout-Tiere gegenüber C4 Tieren die Ergebnisse anderer Arbeiten bestätigen. Denn bei der Untersuchung von Scrapie-infizierten Mäusen wurde, im finalen Stadium der Erkrankung, ebenfalls eine Zunahme der Gesamtubichinone und Gesamtubichinole detektiert [Guan et al. 1996]. Ebenfalls konnte, im Vergleich zu gesunden Patienten, eine erhöhte Ubichinonkonzentration in humanen Plasmaproben von kranken Patienten, die erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt waren (Patienten mit Hepatitis, Leberzirrhose usw.) detektiert werden [Yamamoto et al. 1997]. Diese Daten werden durch die oben erwähnten Messungen bestätigt. Bei Oxidationsprozessen (z.B. ausgelöst durch ROS) entsteht aus dem Substrat Ubichinol das Produkt Ubichinon, daher ist in einigen Arbeiten die Hypothese vertreten worden, dass der Quotient aus Ubichinol und Ubichinon ein sensibler Marker für oxidativen Stress sei [Yamamoto et al. 1997 und Lagendijk et al. 1997]. Diese Hypothese konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da die Werte der Quotienten aus Ubichinol 9,10 und Ubichinon 9,10 keine signifikanten Unterschiede erkennen ließen.

5.3 Fettsäurehaushalt – Lipidperoxidation

Im Rahmen der Dissertation wurde die Menge der einfach- (EUFS) und mehrfach ungesättigten (MUFS) Fettsäuren bestimmt. Des Weiteren wurde auch deren jeweiliger Anteil am Gesamtbestand der Fettsäuren ermittelt. Die Untersuchung der gesättigten Fettsäuren (GFS) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen. Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede erbrachten die Messungen der einfach ungesättigten Fettsäuren (EUFS). Die Bestimmung der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (MUFS) brachte eine signifikante Erhöhung der Konzentration bei Knockout-Tieren gegenüber den C4 und Tg35 Tieren hervor. Die Berechnung des Gesamtbestandes der Fettsäuren wies keine signifikanten Unterschiede auf. Um die Verhältnismäßigkeit der ermittelten Werte beurteilen zu können, wurde der Anteil der EUFS's, MUFS's und GFS's am Gesamtfettsäuregehalt der einzelnen Gruppen bestimmt. Der signifikant hohe Anteil an einfach ungesättigten Fettsäuren bei der C4-Gruppe entspricht nicht den Erwartungen, da die Veränderungen am Prionprotein bei diesen Tieren, nämlich der Verlust der kupferbindenden Octapeptidregion, eigentlich zu einem erhöhten oxidativen Stress hätten führen müssen. Als Zeichen dafür hätte es durch die vermehrte Anhäufung von ROS zu einer verstärkten Lipidperoxidation kommen müssen. Die Substrate der Lipidperoxidation sind in der Regel einfach- und mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Somit sollte die Bestimmung dieser Parameter einen Rückschluss auf den oxidativen Haushalt zulassen. Bei der Untersuchung des Anteils der mehrfach ungesättigten Fettsäuren am Gesamtbestand ergaben sich ebenfalls Unterschiede zwischen Wildtyp und C4-Tieren, wobei hier der Anteil der MUFS's am Gesamtfettsäurenbestand bei den C4-Tieren niedriger als bei der Wildtypgruppe gewesen ist. Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, dass bei vermehrter ROS-Belastung auch die Rate der Lipidperoxidation ansteigt, signifikant war dieser Unterschied jedoch nicht. Schon in vorhergehenden Studien wurde gezeigt, dass Tiere mit verändertem Prionprotein sensitiver auf oxidativen Stress reagieren als Tiere der Wildtypgruppe [Brown et al. 1996, 1997b]. Jedoch hätte man dann auch einen Anstieg der Lipidperoxidation und damit eine Verringerung des Anteils der mehrfach ungesättigten Fettsäuren am Gesamtfettsäurenbestand bei den Knockout-Tieren feststellen müssen, denen das Prionprotein und die damit angenommene antioxidative Funktion vollkommen fehlt. Denn andere Arbeitsgruppen haben herausgefunden, dass das Fehlen des Prionproteins einen Anstieg der Lipid- und Proteinperoxidation zur Folge hat [Klamt et al. 2000].

5.4 Cholesterin

Die Messung der Cholesterinwerte bei den einzelnen transgenen Tieren erfolgte photometrisch mittels eines kommerziellen Kitts, eine genauere Beschreibung des Meßverfahrens ist dem Teil Materialien und Methoden zu entnehmen. Die Untersuchung zeigte signifikant niedrigere Cholesterinwerte in allen genetisch veränderten Tiergruppen im Vergleich zur Wildtypgruppe. Die Beobachtung entspricht den theoretischen Erwartungen. Denn hier scheint sich der teilweise Verlust der antioxidativen Funktion des Prioproteins (C4, E57 und F35) durch fehlende kupferbindende Octapeptidregion in deutlich reduzierten Cholesterinwerten als Zeichen erhöhten oxidativen Stresses niederzuschlagen. Ebenfalls entsprechen die Werte in der Knockoutgruppe dieser Beobachtung. Entgegen der Erwartung verhält sich jedoch die Gruppe der Tg35 Tiere, die das Prionprotein in fünfacher Menge überexprimiert. Hier hätte man konsequenterweise die höchsten Konzentrationen detektieren müssen.

5.5 Lipidperoxidation (TBARS):

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Lipidperoxidation sind von Frau Dr. rer. nat. Inga Böll im Rahmen einer Dissertation im Fach Chemie ermittelt worden.

Die Lipidperoxidation stellt die Folge erhöhten oxidativen Stresses dar. Dabei werden hauptsächlich mehrfachungesättigte Fettsäuren von freien Radikalen angegriffen. Das Ausmaß der Lipidperoxidation wurde von Frau Inga Böll anhand der Absorptionswerte, nach den Methoden von Persky et al. 2000 und Levine et al. 1990, bestimmt. Die Untersuchung erbrachte keine signifikanten Hinweise auf unterschiedliche Ausmaße der Lipidperoxidation beim Vergleich der einzelnen transgenen Tiere. Zu den hier detektierten Werten und Kausalitäten lässt sich zusammenfassend sagen, dass einige signifikante Unterschiede detektiert worden sind, die die angenommene antioxidative Rolle des Prionproteins unterstützen. Betrachtet man jedoch die Werte im Einzelnen, so muss man zugestehen, dass diese die Hypothese der antioxidativen Funktion des Prionproteins zwar zu untermauern scheinen, andere Werte jedoch wiederum diese Kausalität widerlegen. Als Fazit muss also gesagt werden, dass keine eindeutigen Hinweise für erhöhte oxidative Schäden bei Knockout-Tieren bzw. bei Tieren deren Prionprotein trunkiert worden sind vorliegen. Denn oftmals wiesen Tiere ohne Prionprotein (PrP0) überhaupt keine

signifikanten Unterschiede zu anderen Gruppen auf und des Weiteren konnte auch kein erhöhter antioxidativer Schutz bei Tieren ermittelt werden, die das Prionprotein überexprimieren (Tg35). Somit konnten in dieser Arbeit die Ergebnisse anderer Gruppen nicht bestätigt werden [Wong et al 2001a und 2001b, Klamt et al. 2001]. Auch die in anderen Arbeiten angenommene Interaktion zwischen Kupfer und Prionprotein [Pauly und Harris 1998] konnte hier nicht bestätigt werden. Es wurden zwar signifikante Unterschiede bei C4 Tieren gefunden, da die Unterschiede jedoch auch in anderen Gruppen auftraten, ließen sich keine eindeutige Verbindung zwischen trunkierter Octapeptidregion und oxidativer Funktion nachweisen. Daher kann man wohl annehmen, dass es hier einen anderen, bisher noch unbekanntem, Zusammenhang zwischen Prionproteinen und Kupfer und deren Rolle im oxidativen Haushalt geben muss. Bekräftigt wird diese These auch durch andere Arbeiten, in denen ebenfalls Tierreihen mit unterschiedlich starker Expression des Prionproteins und dem damit assoziierten Kupferhaushalt untersucht worden sind und auch dort sind keine signifikanten Unterschiede festgestellt worden [Waggoner et al. 2000]. Es gibt einige mögliche Ursachen für die hier in manchen Aspekten abweichenden Ergebnisse. Zum einen könnte das Alter der transgenen Tiere eine Rolle gespielt haben, denn die in anderen Arbeiten untersuchten Tiere waren häufig älter als die Tiere in dieser Arbeit (drei Monate). Es wäre denkbar, dass sich die Folgen eines eventuell latent vorhandenen oxidativen Ungleichgewichts erst später detektieren ließen. Ein weiterer möglicher Aspekt ist die Tatsache, dass die Tiere nicht in forciertem Maße oxidativem Stress ausgesetzt waren. So zeigten sich in anderen Arbeiten oxidative Schäden bei Knockout-Tieren (PrP0) nach Kontakt mit H₂O₂ (Hydrogenperoxid), einer stark oxidativ wirksamen Substanz [White et al. 1999]. All diese Gründe könnten dazu geführt haben, dass hier keine eindeutigen Hinweise, sondern lediglich Tendenzen gefunden wurden, die auf eine antioxidative Funktion des Prionproteins schließen lassen. Jedoch sind, wie oben erwähnt, auch in anderen Arbeiten von der mehrheitlichen Meinung abweichende Werte detektiert worden [Waggoner et al. 2000] die eventuell zu einer erneuten Prüfung der bisherigen Resultate führen könnten. Abschließend muß für diese Arbeit jedoch gesagt werden, dass bei kritischer Auswertung der erhobenen Daten festgestellt werden konnte, dass einzelne Werte mit dem allgemein angenommenem Hintergrund konform wären, somit eine Interpretation eine Tendenz der Ergebnisse in Richtung der angenommenen Prionproteinfunktion zu ließe. Ein eindeutiger Beweis für die angenommene antioxidative Funktion des Prionproteins konnte hier jedoch nicht erbracht werden.

6. Zusammenfassung

Bei der menschlichen Prion-Erkrankung handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die mit apoptotischen Nervenzellverlusten, Demenz und cerebellärer Ataxie einhergeht. Ursächlich wird der Verlust von potentiell antioxidativ wirksamen zellulären Prionprotein angenommen. Um Aussagen über den oxidativen Status in Hirnhomogenaten und den Zusammenhang zwischen Prionproteinen machen zu können wurden in dieser Arbeit transgene Tiere untersucht, die das Prionprotein gar nicht exprimieren, überexprimieren oder trunkierte Regionen, sogenannte Octapeptidregionen des Prionproteins aufweisen und bereits klinische Symptome wie Ataxien und Paresen zeigen. Die Untersuchungen sollten die Funktion des Prionproteins in den verschiedenen transgenen Mauslinien in Bezug auf oxidativen Stress klären. Es wurden lipophile (α -Tocopherol) und hydrophile (Ascorbat) Antioxidantien, einfach-mehrfachungesättigte- und gesättigte Fettsäuren und Cholesterin bestimmt. Außerdem wurde im Rahmen einer Kollaboration mit der LMU München im Rahmen der Dissertation von Frau Dr. rer. nat. Inga Böll das Ausmaß der Lipidperoxidation mittels TBAR's bestimmt. Anhand der durch verschiedene Messverfahren ermittelten Ergebnisse wurden Rückschlüsse auf den oxidativen Status in den Homogenaten gezogen, denn alle gemessenen Größen sind direkte oder indirekte Indikatoren für die Ausprägung des oxidativen Stesses in den jeweiligen Tierreihen.

In dieser Arbeit ließen sich Tendenzen z.B. bei der Bestimmung der Ubichinon 9 und 10 Werte erkennen, die der angenommenen antioxidativen Wirkung von Prionproteinen entsprachen. Jedoch zeigte sich hier kein einheitlicher Trend in allen transgenen Tierreihen mit einer reduzierten antioxidativen Eigenschaft. Bei einer ganzheitlichen Betrachtung der Arbeit und der Ergebnisse ist keine einheitliche Aussage auf die angenommene antioxidative Funktion des Prionproteins zu finden. Unsere Hypothese, nämlich das eine Veränderung des Prionproteins zu einem Verlust der antioxidativen Eigenschaften führt, und im Umkehrschluss eine Überexprimierung eine verbesserte antioxidative Funktion aufweisen müsste konnte nicht bestätigt werden. PrP-überexprimierende Tiere zeigten in unseren Untersuchungen keine Überlegenheit in der Abwehr von oxidativem Stress.

Abschließend lässt sich somit sagen, dass die angenommene "loss of function"-Hypothese weder durch die Ergebnisse in Hamburg noch durch die zusätzlichen Messungen in München bestätigt werden. Ein Grund unserer von anderen Publikationen abweichenden Ergebnisse kann im jungen Alter unserer Versuchstiere begründet sein.

7. Literaturverzeichnis:

Alper T., Cramp W., Clarke M. C. (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **22**, 278-284

Aronoff-Spencer E., Burns C.S., Avdievich N. I. (2000) Identification of the Cu²⁺ Binding Sites in the N-Terminal Domain of Prion Protein by EPR and CD Spectroscopy *Biochemistry* **39**, 13760-13771

Booth R. F. G., Galanopoulou, D. G. und Quinn, P. J. (1982) Protection by ubiquinone and ubiquinol against lipid peroxidation in egg yolk phosphatidylcholine liposomes. *Biochem. Int.* **5**, 151-156

Brown D. R. (1999a) Prion protein peptide neurotoxicity can be mediated by astrocytes. *J. Neurochem.* **73**, 1105-1113

Brown D. R. (1999b) Prion protein expression aids cellular uptake and veratridine-induced release of copper. *J. Neurosci. Res.* **58**, 717-725

Brown D. R. and Besinger A. (1998) Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem. J.* **334**, 423-426

Brown D. R., Besinger A., Herms J. W. and Kretzschmar H. A. (1998a) Microglial expression of the prion protein. *Neuroreport* **9**, 1425-1429

Brown D. R., Qin K., Herms J. W., Madlung A., Manson J., Strome R., Fraser P. E., Kruck T. A., von Bohlen A., Schulz-Schäffer W., Giese A., Westaway D. and Kretzschmar H. A. (1997a) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**, 684-687

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., Schmidt B., Groschup M. H. and Kretzschmar H. A., (1998b) Prion protein expression in muscle cells and toxicity of a prion protein fragment. *Eur. J. Cell Biol.* **75**, 29-37

Brown D. R., Schultz-Schäfer W. J., Schmidt B. and Kretzschmar H. A. (1997b). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp. Neurol.* **146**, 104-112

Brown D. R., Wong B.-S., Hafiz F., Clive C., Haswell S. and Jones I. M. (1999) Normal prion protein has superoxid dismutase-like activity. *Biochem. J.* **344**, 1-5

Brown P., Gibbs C. J., Amyx H. L., Kingsbury D. T., Rohwer R. G., Sulima M. P., Gajdussek D. C. (1982) Chemical disinfection of Creutzfeldt-Jakob disease virus. *New England J. Med.* **306**, 1279-1282

Bruce M. E., Will R. G., Ironside J. W., McConnell I., Drummond D., Suttie A., McCardle L., Chree A., Hope J., Birkett C., et al. (1997) *Nature (London)* **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

Burdon R. H., Alliangana, D. and Gill, V. (1995) *Free Radical Biol. Med.* **18**, 775-794

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

Culotta V. C. and Gitlin J. D. (1999) Disorders of copper transport. *The Molecular and Metabolic Basis of Inherited Disease.* (C. R. Scriver, A. L. Beaudet, W. S. Sly and D. Valle, Eds.) McGraw-Hill. In press

Doyle D., Roger M. A., (1998) A new mechanism broadening the role of prion proteins in neurodegeneration. *TIG* **14**, (5), 171-173

Eide D. J. (1998) The molecular biology of metal iron transport in "*Saccharomyces cerevisiae*". *Annu. Rev. Nutr.* **18**, 441-469

Fischer M., Rülcke 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

Frei Balz, Mike C. Kim and Bruce N. Ames (1990) Ubichinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Medical Sciences* **Vol. 87** pp. 4879-4883

- Gajdusek D. C., Gibbs C. J., Alpers M.** (1966) Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzee. *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 chimpanzees. *Science* **161**, 388-389
- Giese A., Groschup M., H., Hess B., Kretschmar H. A.** (1995) Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathology* **5**, 213-221
- Halliwell B. and Gutteridge J.M.C.** (1989) *Free radicals in biology and medicine*. Second Edition, Clarendon Press, Oxford
- Harris Z. L. and Gitlin J. D.** (1996) Genetic and molecular basis for copper toxicity. *Am. J. Clin. Nutr.* **63**, 836S-841S
- Hornshaw M. P., McDermott J. R., Candy J. M. and Lakey J. H.** (1995) Copper binding to the N-terminal repeat region of mammalian and avian prion protein; structural studies using synthetic peptides. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **214**, 993-999
- Ironside J. W.** (1997) Amyloid: *Int. J. Exp. Clin. Invest.* **4**, 66-69
- Jimenez-Huete A., Lievens P. M., Vidal R., Piccardo P., Ghetti B., Tagliavini F., Frangine B. and Prelli F.** (1998) *Am. J. Pathol.* **153**, 1561-1572
- Kimberlin R. H.** (1974) A comparison of the biochemical changes induced in mouse brain cuprizone toxicity and by scrapie infectetion. *J. Comp. Pathol.* **84**, 263-270
- Klamt Fabio, Dal-Pizzol F., Da Fronte Jr. M. L. C., 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 Radical Biology & Medicine*, **Vol. 30** No. 10, pp. 1137-1144
- Kontush Anatol, Mann U, Arlt S, Ujeyl A, Luhrs C, Muller-Thomsen T, Beisiegel U** (2001) Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer`s disease. *Free Radic. Biol. Med.* 2001 **Aug. 1; 31 (3):** 345-54
- Kretschmar H. A., Giese A., Brown D. R., Herms J., Keller B., Schmidt., Groschup M.** (1997) Cell death

in prion disease. *J. Neural. Transm. (Suppl.)* **50**, 191-210

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, Sträussler and Scheinker. *Lancet* **337**, 1160

Maguire J. J., Wilson, D. S. and Packer. L. (1989) Mitochondrial electron transport-linked tocopheroxyl radical reduction *J. Biol. Chem.* **264**, 21462-21465

Mitchell P. and Moyle, J. (1982) Promotive mechanisms of quinone function. In functions of quinones in energy conserving systems, ed. Trumpower, B. L. (Academic, New York), pp. 553-575

Moser M., Colello R. J., Pott U. and Oesch B. (1995) Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* **14**, 509-517

Pan K. M., Baldwin M., Nyguyen J., Gasset M., Serban A., Groth D., Mehlhorn I., Huang Z., Fetterick R. J., Cohen F. E. et al. (1993) Conversion of Alpha-helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10962-10966

Pattison I. H. and Jebbet J. N. (1971) Clinical and histological observations on cuprizone toxicity and scrapie in mice. *Res. Vet. Sci.* **12**, 378-380

Pauly P. C., Harris D. A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol. Chem.* **273**, (50) 33107-10

Persky A.M., Green P.S., Stublely L., Howell C.O., Zaulynanov 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

Prusiner Stanley B. (1982) Novel proteinaceous particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144

Prusiner Stanley B. (1989) Scrapie Prions. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 345-374

Prusiner Stanley B. (1993) Genetic and infectious prion diseases. *Arch. Neurol.* **50**, 1129-1153

Prusiner Stanley B. (1997) Prion diseases and the BSE crisis. *Science* **278**, 245-251

Prusiner Stanley B. (1998) Prions (Nobel Lecture). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **Vol. 95**, 13363-13383

Riek, R. et al. (1996) Structure of prion protein. *Nature* 382, 180-182.

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

Sigurdarson B., (1954) A chronic encephalitis of sheep with general remarks on infections 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

Stöckel J., Safar J., Wallace A. C., Cohen F. E., and Prusiner S. B. (1998) Prion protein selectively binds copper (II) ions. *Biochemistry* **37**, 7185-7193

Tateishi J., Hikaita 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. and M. McKinley; Hrsg.) Academic Press, Orlando , USA S. 451-465

Taylor D. M., Fraser H., McConnell I., Brown D. A., Brown K. L., Lamza K. A., Smith G. R. (1994) Decontamination studies with the agents of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Arch. Virol.* **139**, (3-4) 313-326

Wagoner Darrel J., Bartnikas Thomas B. and Gitlin Jonathan D. (1999) The Role of Copper in Neurodegenerative Disease. *Neurobiology of Disease* **6**, 221-230

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 UK. *Lancet* **347**, 921-925

Wong B. S., Pan T., Liu T., Li R. L., Gambetti P. and Sy M. S. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 136-139

Wong Boon-Seng, Pan T., Liu T., Li R., Petersen R. B., Jones I. M. Gambetti P., Brown D. R. and Sy M.-S. (2000) Prion Disease: A loss of antioxidant function ? *Bioch. and Biophys. Res. Comm.* **275**, 249-252

8. Anhang: Zahlenwerte der gemessenen Parameter:

8.1 Hauptdatei aller Messungen ohne Ausreißer:

Gruppe	ASCORBAT	A_TOC	Q_9	Q_10	CHOL
			58,726	4,356	
O1 O		6,216	75,697	5,612	308,333
O2 O	2526,190	6,068	65,835	4,908	360,000
O3 O	2691,326	5,062	60,577	4,510	
O4 O	2330,474	6,418	51,837	4,059	431,000
O5 O	1994,087	5,618		3,795	309,000
O6 O	2043,016				345,000
			42,729	3,081	
W1 W	1975,738	5,251	57,540	4,011	490,667
W2 W	2208,151	6,460		5,072	387,000
W3 W	2257,080	5,808	42,659	3,301	481,333
W4 W	1877,880	5,426	40,112	2,937	
W5 W	1883,996	5,691	54,460	3,942	374,000
W6 W	2214,267				400,333
		6,344	41,969	3,360	
C1 C	2234,278				309,000
C2 C	2399,951	7,836	57,548	4,272	
C3 C		6,425	40,594	3,296	
C4 C	2425,439	4,948	44,340		384,667
C5 C	2094,094	6,890	49,904	3,102	308,667
C6 C	2183,302				297,333
		8,129	55,475	3,854	
T1 T	2689,692	8,331	59,845	4,786	398,333
T2 T	2683,619	6,013	41,090	3,382	383,000
T3 T	2355,677	6,480	48,086	3,867	365,000
T4 T	2713,984	7,470			
T5 T	2222,072	5,509		4,285	341,000
T6 T	2325,312				327,000
		4,818		5,416	
E1 E	2628,303			6,477	347,000
E2 E	2358,251	4,061	35,632	2,447	312,333
E3 E	2542,377	4,690	33,293	2,826	337,500
E4 E	2781,742				348,500
			20,809		
F1 F		6,492	72,054	5,389	
F2 F	2438,039	8,666	81,621	5,695	408,500
F3 F	2646,715	8,422	24,191		390,000
F4 F	2462,589				379,500

Gruppe		GFS	EUFS	MUFS	GesFS	Lipidper
O1	O		537,970	1068,575	2455,065	,01950
O2	O	1151,105	661,385	1255,850		,01550
O3	O	1085,630	544,325	955,415	2585,370	,01600
O4	O	912,350	471,250		2161,325	,01850
O5	O	1056,150	651,155	935,785	2643,090	,01900
O6	O	1178,765		1085,105		,02100
W1	W	941,355	480,790		2199,260	,01750
W2	W	931,635	473,115	830,605	2235,355	,01700
W3	W	1107,300	569,855	994,660	2671,815	,01850
W4	W	1079,055	550,485	975,145	2604,685	,02000
W5	W	907,245	456,025	832,775	2196,045	,02250
W6	W	964,125	511,410	1039,765	2515,300	,01500
C1	C	975,370	549,970	868,170	2375,510	,02250
C2	C	1155,275	612,120	956,030	2723,425	,02750
C3	C	1155,855	602,585	976,220	2733,660	,01800
C4	C	862,980	462,450	742,515	2067,945	,01650
C5	C	880,105	452,815	774,220	2107,140	,01800
C6	C	894,990	446,800	742,305	2084,095	,01850
T1	T	939,715	499,565	787,160	2226,440	,01450
T2	T	1115,660	546,755	927,330	2589,745	,02150
T3	T	1117,420	564,205	969,275	2650,900	,02150
T4	T	970,965	483,440	867,220	2321,625	,01950
T5	T	979,500	491,685	856,235	2327,420	,02000
T6	T	904,750	470,115	830,630	2205,495	
E1	E		477,375	788,165	2159,630	
E2	E	1030,500	507,950	875,145	2413,595	
E3	E	1080,970	554,985	969,065	2605,020	,02155
E4	E	1122,480	593,825		2926,085	,02275
F1	F					,01748
F2	F	1104,175	571,620	981,745	2657,540	,01475
F3	F	1108,865	553,520	980,320	2642,705	,01229
F4	F	1054,235	552,035	952,310	2558,580	,02424

Gruppe		F14_0	F16_1_N9	F16_1_N7
O1	O	,292	,376	,994
O2	O	,351	,360	1,137
O3	O	,592	,423	1,369
O4	O	,430	,434	1,048
O5	O	,483		
O6	O			
W1	W	,469	,349	1,119
W2	W	,467	,443	1,178
W3	W	,526	,368	1,317
W4	W	,541	,373	1,169
W5	W	,663	,408	1,105
W6	W	,513	,431	1,102
C1	C	,420	,375	1,180
C2	C	,545	,421	1,471
C3	C	,557	,554	1,555
C4	C	,383	,356	1,076
C5	C	,481	,453	1,180
C6	C	,435	,310	1,155
T1	T	,415	,361	1,025
T2	T	,599	,360	1,204
T3	T	,465	,352	1,142
T4	T	,439	,364	1,074
T5	T	,406	,298	1,004
T6	T	,446	,355	1,051
E1	E	,566	,320	1,243
E2	E	,390	,341	1,246
E3	E	,349	,283	1,075
E4	E	,496	,384	1,275
F1	F	,469	,379	1,011
F2	F	,417		1,401
F3	F	,544	,460	1,468
F4	F	,562	,474	1,436

Gruppe	F16_0	F18_3_N6	F18_2_N6	F18_1_N9	F18_1_N7
O1		,401	2,557	35,331	9,638
O2	48,089	,330	2,918	45,244	11,580
O3	49,593	,438	2,662	37,094	10,259
O4	42,759		2,912	32,528	8,192
O5	50,114	,418		47,094	10,503
O6	58,957	,562	2,261		
W1	43,265	,328	2,733	33,399	8,199
W2	45,093	,313	2,850	32,237	8,686
W3	52,706	,316	2,891	38,872	
W4	49,995	,310	2,621	37,581	9,862
W5	43,462	,352	2,677	30,946	8,353
W6	43,168	,259	2,959	34,623	9,477
C1	44,613	,279	2,986	37,869	9,860
C2	54,904	,353	3,704	41,759	
C3	54,246	,331	3,647	42,232	10,631
C4		,265	3,199	31,845	8,419
C5	43,488		3,176	31,104	8,700
C6	43,995	,369	2,751	31,232	8,422
T1	43,470	,360	2,822	34,718	8,291
T2	50,534		2,739	37,990	9,334
T3	51,156	,308		39,202	9,745
T4	45,673	,253	2,788	33,645	8,663
T5	46,921	,295	2,535	34,113	8,938
T6	43,309	,250	2,753	32,414	8,325
E1		,330	2,510	32,961	8,270
E2	49,378	,320	1,984	35,299	9,155
E3	50,319	,326	2,047	38,598	9,770
E4	50,016	,369	2,826		10,773
F1		,344	2,328		
F2	52,459	,369		39,759	10,309
F3	53,777	,328	2,447	38,181	10,372
F4	51,844	,369	2,791	38,504	9,951

Gruppe	F18_0	F20_4_N6	F20_5_N3	F20_3_N6	F20_2_N6	F20_1_N9
O1	48,268	30,632	,505	1,133	,898	5,419
O2			,659		,940	5,384
O3	56,477	29,281	,405	1,202		3,292
O4	46,389			1,077	,712	3,329
O5	52,974	27,374	,411	1,242	,777	3,244
O6	55,012	30,096	,608		,952	3,701
W1	48,742	23,477	,436	1,119	,623	3,504
W2	46,229	24,438		1,070	,867	3,162
W3	55,486	28,940	,600	1,341	,808	4,250
W4	55,400	28,954	,453	1,318	,577	4,255
W5	45,382	24,694	,561	1,131	,731	3,187
W6	50,745	29,619	,724			3,809
C1	48,983	27,808	,528	1,428	,950	4,309
C2	58,171	33,135	,611		,891	4,482
C3	58,990	34,001	,627	1,633	,807	3,805
C4	44,044	24,746	,431	1,285	,752	3,175
C5	43,150	26,377	,467	1,222	,834	2,664
C6	43,861	25,789	,423	1,151	,627	2,755
T1	48,387	23,390	,402	1,167	,724	3,903
T2	58,333	27,722	,465	1,262	,827	3,921
T3	58,092		,453		,825	4,194
T4	49,750	25,917	,408	1,221	,802	
T5	49,293	24,611		1,221	,645	3,244
T6		24,716	,496	1,150	,674	3,326
E1	46,252	24,477	,451		,603	3,227
E2	51,968	28,277	,434	1,146	,480	3,111
E3	55,969	29,445		1,074	,565	3,861
E4			,588	1,409		3,909
F1			,400			
F2	55,422	30,564	,483	1,261	,918	3,381
F3	55,069	30,805	,491	1,201	,717	3,043
F4	51,613	29,470	,488	1,069	,753	3,035

Gruppe	F20_3_N3	F20_0	F22_6_N3	F22_4_N6	F22_5_N3
O1	1,375	1,236	57,629	9,113	1,086
O2	1,283	1,277		9,820	
O3	,899	,923	50,742	7,307	,840
O4	,821	,803		6,313	,753
O5	,855		47,822	6,993	,777
O6	,991	,872	45,934	7,028	1,067
W1	,881	,788	40,130	6,285	,731
W2	,943	,739	44,565	5,868	,691
W3	1,186	1,047	53,992	7,485	,878
W4	1,130	,998	52,787	7,432	,948
W5	,844		44,726	5,940	,681
W6	1,198	1,072	56,360	7,836	
C1	1,023	,829	41,480	8,142	1,030
C2	1,042	,956	43,131	8,811	1,174
C3	,848	,846	44,441		1,042
C4	,742	,685	34,415	6,611	,922
C5	,701		35,567	6,804	,887
C6	,751	,607	34,526	6,545	,843
T1	,898	,803	40,776	6,258	,839
T2			49,502	7,026	,775
T3	,934	,955		7,471	,937
T4	,696	,606	46,254	6,394	,877
T5	,837	,664	46,968	6,316	,826
T6	,895	,677	44,210	6,184	,738
E1	,678	,853	40,921	6,142	,718
E2	,751	,667	45,748	6,801	,686
E3	,941	,797	52,345	7,915	,740
E4	,884	,863			
F1	,704	,699			
F2	,874	,918	49,864	7,057	,812
F3	,805	,771	52,224	7,253	,831
F4	,777	,697	50,344	7,342	,815

Gruppe	F22_2_N6	F22_1_N9	F22_0
O1		2,039	
O2	1,292	2,434	1,204
O3	1,123	1,997	,980
O4	1,075	1,596	,855
O5	1,009	1,680	,732
O6	1,065	1,654	,882
W1	,971	1,510	,873
W2	1,078	1,607	
W3	1,031	1,921	,967
W4	,988	1,809	,973
W5	,942	1,605	
W6		1,699	,916
C1	1,165	1,404	,894
C2	,995	1,951	,952
C3	1,188	1,483	,848
C4	,885	1,375	,690
C5	,984	1,182	
C6			,602
T1	1,081	1,660	,898
T2	1,868	1,079	
T3	1,255	1,787	1,075
T4	1,114	1,642	,629
T5	1,041	1,574	,666
T6	1,000	1,542	,568
E1	1,015	1,716	
E2		1,645	,648
E3	1,141	1,913	,664
E4	1,264		,861
F1	1,083	1,189	,747
F2	1,014	1,896	
F3		1,830	,726
F4	1,015	1,805	,709

Gruppe	SFA%	MUFA%	PUFA%
O1	34,562	21,913	43,525
O2	37,516	21,555	40,929
O3	41,991	21,054	36,955
O4	42,213	21,804	35,984
O5	39,959	24,636	35,405
O6	36,394		
W1	42,803	21,861	35,335
W2	41,677	21,165	37,158
W3	41,444	21,328	37,228
W4	41,427	21,134	37,438
W5	41,313	20,766	37,922
W6	38,330	20,332	
C1	40,302	23,152	36,547
C2	42,420	22,476	35,104
C3	42,246	22,043	35,711
C4	41,731	22,363	35,906
C5	41,768	21,490	36,743
C6	42,944	21,439	35,618
T1	42,207	22,438	35,355
T2	43,080	21,112	35,808
T3	42,152	21,284	36,564
T4	41,823	20,823	37,354
T5	42,085	21,126	36,789
T6	41,023	21,316	37,662
E1	41,400	22,104	36,495
E2	42,696	21,045	36,259
E3	41,496	21,304	37,200
E4	38,361	20,294	
F1	41,039	22,887	36,074
F2	41,549	21,509	36,942
F3	41,959	20,945	37,095
F4	41,204	21,576	37,220

	Q_10	QH29	QH210	QH29_Q9	QH210Q10	QH2_Q
O1	4,356			,127		,025
O2	5,612	3,592	1,853	,047	,330	,067
O3	4,908	4,859	2,479	,074	,505	,104
O4	4,510			,027	,195	,039
O5	4,059	3,467	1,742	,067	,429	,093
O6	3,795	3,495	1,905	,072	,502	,104
W1	3,081			,041		
W2	4,011	2,888	1,365	,050	,340	,069
W3	5,072	3,541	1,746	,050	,344	,069
W4	3,301	2,602	1,362	,061	,413	,086
W5	2,937	3,632	1,867			
W6	3,942	3,307	1,723	,061	,437	,086
C1	3,360	2,929	1,171	,070		,090
C2				,072	,563	,102
C3	4,272	6,082	2,964	,106	,694	,146
C4	3,296	4,732	1,862	,117	,565	,150
C5						
C6	3,102		2,113		,681	
T1	3,854		2,891		,750	
T2	4,786			,128	,838	,181
T3	3,382	3,285	1,403	,080	,415	,105
T4	3,867	4,078	2,179	,085	,563	,120
T5		5,491	2,602	,050	,307	
T6	4,285	2,486	1,158			
E1	5,416	3,246	1,651	,011	,305	
E2	6,477		1,733		,268	
E3	2,447	1,843		,052	,372	,072
E4	2,826	3,733	1,498	,112	,145	
F1				,012	,363	,017
F2	5,389	3,645	1,843	,051	,342	,071
F3	5,695	3,057	1,246	,037	,219	,049
F4				,057		

	A_TOC_L	Q_9_L	Q_10_L	QH29L	QH210L	GESQH2
O1	,00175	,02392	,00177		,00023	
O2	,00203	,02467	,00183	,00117	,00060	5,44464
O3	,00235	,02546	,00190	,00188	,00096	7,33823
O4	,00234	,02803	,00209		,00041	
O5	,00243	,01961	,00154	,00131	,00066	5,20919
O6	,00173	,01490	,00117	,00108	,00059	5,40018
W1		,01943	,00140		,00023	
W2	,00235	,02574	,00179	,00129	,00061	4,25333
W3	,00242	,02658	,00190	,00133	,00065	5,28709
W4	,00223	,01638	,00127	,00100	,00052	
W5	,00247	,01827	,00134	,00165	,00085	5,49876
W6	,00226	,02165	,00157	,00131	,00069	5,03029
C1	,00267	,01767	,00141	,00123	,00049	4,10055
C2					,00029	2,29657
C3	,00287	,02105	,00156	,00222	,00108	9,04551
C4	,00311	,01963	,00159	,00229	,00090	6,59403
C5	,00235	,02104				
C6	,00331	,02394	,00149		,00101	
T1	,00365	,02492	,00173		,00130	
T2	,00322	,02311	,00185	,00296	,00155	
T3	,00227	,01550	,00128		,00124	4,68799
T4	,00279	,02071	,00167	,00176	,00094	6,25722
T5	,00321	,00236			,00112	8,09324
T6	,00250		,00194	,00113		
E1	,00223		,00251	,00150	,00076	4,89717
E2		,03860	,00268		,00072	
E3	,00156	,01368	,00094		,00071	2,75356
E4	,00160	,01138	,00097	,00128	,00051	5,23097
F1	,00256	,01241	,00216	,00179	,00078	
F2	,00244	,02711	,00203	,00137	,00069	5,48760
F3	,00328	,03089	,00215	,00116	,00047	4,30354
F4	,00329	,00945				8,06233

	GESQ	GQH2_GQ
O1	63,08270	,02496
O2		,06696
O3	70,74320	,10373
O4	65,08610	,03850
O5	55,89627	,09319
O6	52,05793	,10373
W1	45,80921	,04921
W2	61,55117	,06910
W3		,06948
W4	45,95990	,08624
W5	43,04910	,12773
W6	58,40267	,08613
C1	45,32924	,09046
C2		,10175
C3	61,81951	,14632
C4	43,89016	,15024
C5	45,16821	,01356
C6	53,00513	
T1	59,32935	
T2	64,63094	,18074
T3	44,47103	,10542
T4	51,95380	,12044
T5		,06812
T6		,02050
E1		,01530
E2		,01694
E3	38,07888	,07231
E4	36,11863	,14483
F1	21,11666	,01737
F2	77,44271	,07086

8.2 p-Niveau-Mann-Withney-U-Test

	W:O	W:C	W:T	W:E	W:F	O:C	O:T	O:E
Ascorb	,100358	,144137	,006489	,010520	,010520	,916816	,361317	,141654
Chol	,047210	,027493	,047210	,014311	,654724	,391274	,464707	1,00000
GFS	,201252	,630957	,521844	,121354	,121354	,273330	,27330	,654727
EUFS	,27330	,872781	,872781	,393775	,070711	,273330	,273330	,624209
MUFS	,174535	,144137	,273330	,296725	,881498	,044618	,017628	,101060
TFS	1,00000	,630957	,872781	,669818	,196715	,522436	,831172	1,00000
GFS%	,262340	,149551	,149551	1,000000	,831172	,054673	,078179	,286430
EUFS%	,100358	,010410	,748776	1,000000	,200834	,583886	,201252	,220680
MUFS%	,916816	,067898	,465214	,296725	,220680	,144137	,465214	,881498
A-TOC	,754025	,250601	,044618	,025354	,025354	,174535	,144137	,025354
Q-9	,028287	,916816	,462438	,052816	1,000000	,016315	,086420	,052816
Q-10	,078179	,336676	,465214	1,000000	,045509	,033014	,201252	,831172
QH ₂ 9	,220680	,179722	,624209	,881498	,438584	,723676	,772832	,288852
QH ₂ 10	,086420	,327194	,347215	,881498	,698538	,772832	,806498	,033903
GESQH2	,248222	1,000000	,288852	,288852	,479505	,772832	,723676	,077109
GES Q	,075810	,754025	,462438	,052816	1,000000	,047210	,220680	,052816
A-TOC-I	,423346	,149551	,016315	,393775	,019023	,078179	,016315	,522436
Q-9-I	,630957	,855133	,831172	,438584	1,000000	,361317	,522436	,438584
Q-10-I	,336676	,831172	,361317	1,000000	,020143	,200834	,855133	1,000000
QH2-9-I	,806498	,296725	,347215	,347215	,456062	,157309	,327194	,723676
QH2-10I	,630957	,361317	,010520	,605580	,605580	,361317	,019023	,438584

	O:F	C:T	C:E	C:F	T:E	T:F	E:F
Ascorb	,624209	,144137	,050052	,050052	,522436	,669818	,386483
Chol	,179722	,141654	,248222	,077109	,22068	,179722	,03393
GFS	,881498	,196715	,438584	,438584	,196715	,438584	,827261
EUFS	,654724	,872781	,669818	,438584	,393775	,070711	,723676
MUFS	,456062	,630957	,438584	,070711	,796255	,038875	,126640
TFS	,288852	,748776	,286430	,438584	,522436	,121345	,479505
GFS%	,393775	,872781	,286430	,200834	,286430	,135603	1,000000
EUFS%	,462438	,024982	,055018	,522436	,669818	,286430	,386483
MUFS%	,669818	,149551	,196715	,033014	,796255	,669818	,723676
A-TOC	,025354	,465214	,025354	,101060	,020143	,121345	,049543
Q-9	,806498	,462438	,052816	,831172	,064087	,393775	,248222
Q-10	,095590	,086420	,393775	,064087	,669818	,052816	,643432
QH ₂ 9	,643432	,479505	,275242	,563707	,288852	,643432	,288852
QH ₂ 10	,164924	,200194	,288852	,354546	,654724	,438584	,772832
GESQH2	,723676	,723676	,723676	,723676	,275242	,512695	,275242
GES Q	,831172	,462438	,052816	,831172	,064087	,624209	,479505
A-TOC-I	,010520	,521844	,286430	,669818	,055018	,831172	,083274
Q-9-I	,831172	,806498	,456062	,669818	,479505	,423676	,723676
Q-10-I	,038875	,141654	,393775	,033903	,669818	,025354	,563707
QH2-9-I	,723676	,881498	,275242	,275242	,296725	,654724	,512695
QH2-10I	,438584	,050052	,654724	,456062	,033903	,034803	,827261

8.3 Mittelwert-Tabelle

	WT	PrP0	C4	Tg35	E57	F35
Cholesterin	444,8	362,2	372,7	354,6	336,3	371,6
Ascorbat	2069,519	2317,0	2267,4	2498,4	2577,7	2451,9
A-TOC	5,2	5,6	6,5	7,0	5,2	7,0
Q-10	3,5	4,3	2,7	4,0	4,3	5,4
Q-9	47,5	60,2	39,6	63,0	116,6	49,7
QH₂-9	3,2	3,0	3,1	4,6	2,9	2,1
QH₂-10	1,6	1,6	1,5	2,4	1,5	2,5
GESQ	51,0	64,7	49,8	67,8	57,9	55,1
GESQH₂	4,8	4,6	4,5	6,9	4,3	4,6
QH₂-9/Q9	0,05	0,05	0,25	0,3	0,14	0,04
QH₂-10/Q10	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4
EUFS	507,0	573,2	521,1	509,3	533,5	515,2
MUFS	908,3	1013,1	843,2	873,0	960,5	879,8
GFS	988,5	1038,8	984,3	1004,7	1032,0	988,8
TFS	2403,7	2692,0	2348,6	2386,9	2526,1	2383,9
GFS%	41,7	38,8	42,2	42,1	41,0	41,4
EUFS%	21,1	22,2	22,2	21,1	21,2	21,7
MUFS%	37,0	37,7	35,9	36,6	37,8	36,8

9. Abkürzungsverzeichnis

FS	Fettsäure
GFS	Gesättigte Fettsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
EUFS	Einfachungesättigte Fettsäure
MUFS	Mehrfachungesättigte Fettsäure
Vit C	Vitamin C
TBARS	Thiobarbitursäurereaktive Substanzen
LOO*	Lipidperoxid
LOOH	Lipidhydroperoxid
MDA	Malondialdehydbisdiethylacetal
Fe	Eisen
SOD	Superoxiddismutasen
PrP ^C	Zelluläre Form des Prionprotein
PrP ^{Sc}	Infektiöse Form des Prionproteins
DNS	Deoxyribonukleinsäure
RNS	Ribonucleinsäure
UV-Strahlung	Ultraviolette Strahlung
PrP	Prionprotein
PrP0	Prionprotein Knockout
BSE	Bovine spongiforme Encephalopathie
FSE	Feline spongiforme Encephalopathie
TME	Transmissible Nerz Encephalopathie
AS	Aminosäuren
PCR	Polymerase chain reaction
DCIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
MDA	Malondialdehydbisdiethylacetal
Q 9	Ubichinon-9
Q 10	Ubichinon-10
QH ₂ 9	Ubichinol-9
QH ₂ 10	Ubichinol-10
ROS	Reactive oxygen species
Wt	Wildtyp

O	Knockout
Tg	Tg 35 Mäuse
E57	E57 Mäuse
F35	F35 Mäuse
C4	C4 Mäuse
PrP ^{0/0}	Knockout-Tiere

Lebenslauf

Name: Arian Sultan

Geburtsdatum/-ort: 11.12.1976 in Bonn

Anschrift: Heckscherstrasse 33; 20253 Hamburg

Familienstand: ledig

Eltern: Dr. Nazir Sultan, geb. am 25.08.1944 Kardiologe - Angiologe
Homa Sultan, geb. am 20.10.1955 Physiotherapeutin

Geschwister: Leila Sultan, geb. am 06.04.1979 Assistenzärztin Universität Zürich

Schulische Ausbildung:
1983 – 1984 Albert-Schweizer Grundschule in Rotenburg/Fulda
1984 – 1985 Adolf-Reichwein Grundschule in Freiburg i.Br.
1985 – 1987 Albert-Schweizer Grundschule in Rotenburg/ Fulda
1987 – 1996 Jakob – Grimm - Schule Rotenburg/Fulda
1996 Abitur

Universitäre Ausbildung:
WS 1996/97 Beginn des Humanmedizinstudiums an der Universität Hamburg
WS 2000/01 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
WS 2002/03 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
SS 2003 Beginn des Praktischen Jahres
Mai 2004 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Auslandstudium: Juli-Okt./1997 Sprach-und Kulturstudium UCLA - University of California Los Angeles/CA USA
Juli-Sep./2001 u. April/2002 Sprachstudium der spanischen Sprache am Goethe Institut in Santiago de Chile/Chile
Mai-Juli/2002 Studium der französischen Sprache am Institute Langue et Communication in Rennes/Frankreich

Sprachen: Englisch, Spanisch, Französisch und Persisch

Praktika: Juli/2000 Famulatur Anästhesiologie Michaelis-Krankenhaus Hamburg
Aug.- Okt./2000 Famulatur Kardiologie Barstow – Loma Linda CA/USA
Juli- Sept./2001 Famulatur Clinica Alemana Santiago de Chile/Chile

Praktisches Jahr: Innere Medizin: Kardiologische Abteilung des UKE Hamburg
Chirurgie: Chirurgische Abteilung im USACH-Hospital San José/Universidad Santiago de Chile/Chile
Wahlfach: Anästhesiologische Abteilung des AK St. Georg Hamburg

Student. Aushilfe: 1997 – 1999 3. chirurgische Assistenz Endoklinik Hamburg

Dissertation: Molekularbiologische Untersuchung Oxidativer – Stress Parameter an transgenen Prion-Protein Mausmodellen.
Institut für Molekulare Zellbiologie Zentrum für Experimentelle Medizin, UKE
Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Beruflicher Werdegang: seit 2004 Assistenzärztin am
Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf; Universitäres Herzzentrum Hamburg; Abteilung für Kardiologie–Angiologie; Prof. Dr. med. Meinertz

Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel für die Vergabe des Themas, die Bereitsellung des Laborplatzes und der Mittel, sowie für die hilfreichen Korrekturen und Diskussionen.

Ein großer Dank gilt Dr. Sönke Arlt, der mich bei der Durchführung der Arbeit mit stetiger Hilfe, kritischen Fragen und Korrekturen großartig angeleitet und unterstützt hat. Danken möchten ich auch allen Mitarbeitern des Instituts insbesondere Christine Runge.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Hans A. Kretzschmar für die grosszügige Bereitstellung der Tiere und Frau Dr. rer. nat. Inga Böll für die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern und meiner Schwester, die mich mit ihrer Liebe und ihrem Vertrauen immer stärken und unterstützen.

