

Einfluss der Helix 1 und des β -Faltblattes auf die Aggregation des Prionproteins und seine Amyloidstruktur

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten

der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Jens Watzlawik

aus

Stadthagen

Göttingen, 2006

D 7

Referent: Prof. Dr. Hans-Joachim Fritz

Koreferent: Prof. Dr. Rüdiger Hardeland

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2007

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------------|---|-----------|
| | Abkürzungen | VI |
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1. | Die Prionerkrankungen | 1 |
| 1.2. | Das zelluläre Prionprotein (PrP ^C) | 2 |
| 1.2.1. | Struktur des Prionproteins | 3 |
| 1.2.2. | Funktionen des Prionproteins | 4 |
| 1.3. | Die pathologische Form des Prionproteins (PrP ^{Sc}) | 5 |
| 1.3.1. | Eigenschaften des pathologischen Prionproteins (PrP ^{Sc}) | 5 |
| 1.3.2. | Die Prionhypothese | 6 |
| 1.3.3. | Prionerregerstämme und Speziesbarrieren | 7 |
| 1.3.4. | Mechanismus der Umfaltung von PrP ^C in PrP ^{Sc} | 7 |
| 1.3.5. | Einfluss des pH-Wertes auf die Aggregation des Prionproteins | 9 |
| 1.3.6. | PrP ^{Sc} -Strukturmodelle | 10 |
| 1.4. | Zielsetzung | 12 |
| 2. | Material und Methoden | 14 |
| 2.1. | Material | 14 |
| 2.1.1. | Chemikalien | 14 |
| 2.1.2. | Enzyme und Antibiotika | 15 |
| 2.1.3. | „Kits“ zur Behandlung von DNA | 15 |
| 2.1.4. | DNA- und Protein-„Standards“ | 15 |
| 2.1.5. | Verbrauchsmaterialien zum Arbeiten mit Bakterien | 16 |
| 2.1.6. | Verbrauchsmaterialien für Western Blots | 16 |
| 2.1.7. | Lösungen und Puffer für Arbeiten mit DNA | 16 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 2.1.8. | Lösungen und Puffer für Proteinarbeiten | 18 |
| 2.1.9. | Nährmedien für die Mikrobiologie | 20 |
| 2.1.10. | <i>Escherichia coli</i> -Stämme | 21 |
| 2.1.11. | Oligodesoxyribonukleotide | 22 |
| 2.1.12. | Mutagenese- Oligodesoxyribonukleotide | 23 |
| 2.1.13. | Plasmide | 24 |
| 2.1.14. | Antikörper für die Immunologische Detektion | 27 |
| 2.2. | Mikrobiologische und genetische Arbeitsmethoden | 28 |
| 2.2.1. | Lagerung von Bakterienstämmen | 28 |
| 2.2.2. | Stammhaltung von <i>E. coli</i> -Kulturen | 28 |
| 2.2.3. | Anzuchtbedingungen und Wachstumsmessung | 28 |
| 2.2.4. | Präparation von kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen (Nishimura et al., 1990) | 28 |
| 2.2.5. | Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA | 29 |
| 2.2.6. | Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA | 29 |
| 2.2.6.1. | Fällung von DNA mit Ethanol | 29 |
| 2.2.6.2. | Extraktion von DNA mit Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol | 30 |
| 2.2.6.3. | Konzentrationsbestimmung der DNA | 30 |
| 2.2.6.4. | Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen | 30 |
| 2.2.6.5. | Isolierung von Plasmid-DNA | 31 |
| 2.2.7. | Agarosegelelektrophorese | 32 |
| 2.2.8. | Präparation von DNA für die Subklonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren | 33 |
| 2.2.9. | Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren | 33 |
| 2.2.10. | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 34 |
| 2.2.11. | Einführung von Mutationen durch <i>site directed mutagenesis</i> (<i>Quick change</i>) | 35 |
| 2.2.12. | Einführung von Mutationen durch Polymerase-Kettenreaktion (SOE-PCR) | 35 |
| 2.2.13. | Herstellung der <i>Prnp</i> -Konstrukte im pET27b(+)-Vektor | 36 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.3. | Methoden für Proteinarbeiten | 37 |
| 2.3.1. | Proteinkonzentrationsbestimmung | 37 |
| 2.3.2. | Expression und Aufreinigung von humanem Prionprotein aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern (<i>Inclusion bodies</i>) im Vollmedium | 37 |
| 2.3.2.1. | <i>Inclusion body</i> -Aufreinigung | 38 |
| 2.3.2.2. | Chromatographische Aufreinigung | 39 |
| 2.3.3. | Expression und Aufreinigung von humanem Prionprotein aus zytoplasmatischen Einschlusskörpern (<i>Inclusion bodies</i>) in M9 Minimalmedium für die NMR-Spektroskopie | 40 |
| 2.3.4. | Allgemeines Rückfaltungsprotokoll für das Prionprotein | 41 |
| 2.3.5. | Entsalzung und Aufkonzentration | 42 |
| 2.3.6. | SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 43 |
| 2.3.7. | Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine (Western Blot) | 45 |
| 2.3.8. | Kapillarelektrophorese (CE) | 46 |
| 2.3.9. | Elektronenmikroskopie-Negativkontrastierung | 46 |
| 2.3.10. | Messung der Aggregationsgeschwindigkeit des Prionproteins | 47 |
| 2.3.10.1. | Thioflavin T (ThT)-Assay | 47 |
| 2.3.10.2. | Absorptionsspektroskopie | 48 |
| 2.3.11. | Proteinase K-Verdau | 49 |
| 2.3.12. | Edman-Sequenzierung | 49 |
| 2.3.13. | Massenspektrometrie (MALDI-MS) | 50 |
| 2.4. | Spektroskopische Verfahren | 51 |
| 2.4.1. | FTIR-Spektroskopie | 51 |
| 2.4.2. | CD-Spektroskopie | 52 |
| 2.4.3. | NMR-Spektroskopie von <i>humPrP23-159</i> und <i>humPrP23-173</i> | 53 |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 3. | Ergebnisse | 55 |
| 3.1. | Herstellung und Charakterisierung verschiedener Prionproteinfragmente | 55 |
| 3.1.1. | Herstellung der verschiedenen Prionproteinfragmente | 56 |
| 3.1.2. | Überprüfung der Reinheit der Prionproteinfragmente | 56 |
| 3.1.3. | Strukturanalyse der Prionproteinfragmente | 59 |
| 3.2. | Einfluss der Helix 1 auf die Aggregation des humanen Prionproteins | 67 |
| 3.2.1. | Nachweis des monomeren Zustands von <i>humPrP23-144</i> und <i>humPrP23-159</i> | 67 |
| 3.2.2. | Vergleich der spontanen Aggregation von <i>humPrP23-159</i> mit <i>humPrP23-144</i> | 68 |
| 3.2.3. | Vergleich der Aggregation von <i>humPrP23-159</i> mit <i>humPrP23-144</i> unter Zugabe von fibrillärem Prionprotein (<i>Seeding</i>) | 71 |
| 3.2.4. | Morphologie von aggregiertem <i>humPrP23-159</i> und <i>humPrP23-144</i> | 74 |
| 3.2.5. | Proteinase K-Resistenz der Helix 1 in fibrillärem <i>humPrP23-159</i> | 75 |
| 3.2.6. | FTIR-spektroskopische Untersuchung der fibrillären Aggregate von <i>humPrP23-159</i> und <i>humPrP23-144</i> | 78 |
| 3.2.6.1. | Zuordnung der Absorptionsbanden zu spezifischen Strukturelementen in <i>humPrP23-159</i> und <i>humPrP23-144</i> | 78 |
| 3.2.6.2. | Quantitative Analyse der FTIR-Spektren von fibrillärem <i>humPrP23-159</i> und fibrillärem <i>humPrP23-144</i> | 79 |
| 3.3. | Einfluss des pH-Wertes auf die Aggregation von <i>humPrP23-159</i> und <i>humPrP23-144</i> | 84 |
| 3.4. | Einfluss der N-terminalen Region des humanen Prionproteins auf seine Aggregation | 90 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 3.5. | Einfluss des β-Strands S2 auf die Aggregation des humanen Prionproteins | 91 |
| 3.5.1. | Vergleich der Aggregation von <i>humPrP23-173</i> mit <i>humPrP23-159</i> | 91 |
| 3.5.2. | Morphologie von aggregiertem <i>humPrP23-173</i> | 92 |
| 3.5.3. | Proteinase K-Resistenz des β -Strands S2 und der Helix 1 in fibrillärem <i>humPrP23-173</i> | 93 |
| 4. | Diskussion | 98 |
| 4.1. | <i>In vitro</i> Modell zur Simulation konformativer Änderungen des humanen Prionproteins in seine pathologische Isoform | 98 |
| 4.2. | Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung des pathologischen Prionproteins | 99 |
| 4.3. | Einfluss der N-terminalen Domäne, der Helix 1 und des β -Strands S2 auf den Mechanismus der Aggregation des humanen Prionproteins | 101 |
| 4.4. | Struktur des pathologischen Prionproteins | 106 |
| 5. | Ausblick | 112 |
| 6. | Zusammenfassung | 113 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 114 |

VI ABKÜRZUNGEN

AA Acrylamid

Abb. Abbildung

AS Aminosäure

APS Ammoniumpersulfat

bp Basenpaare

°C Grad Celsius

ca. circa

CD-Spektroskopie Circular-Dichroismus-Spektroskopie

cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure

cm Zentimeter

d. h. das heißt

DMF Dimethylformamid

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonukleinsäure

dNTP 2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate

DTT Dithiothreitol

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

et al. et alteri, und andere

FTIR-Spektroskopie Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie

GPI Phosphatidylinositolglykolipid

h Stunden

hum human

kb Kilobasenpaare

kDa Kilodalton

l Liter

M molar

m Mikro (10^{-6})

mA Milliampère

MES Morpholinoethansulfonsäure

min Minuten

ml Milliliter
moPrP murines Prionprotein (Maus)
MOPS Morpholinopropansulfonsäure
n Nano (10^{-9})
NMR. *nuclear magnetic resonance* (kernmagnetische Resonanz)
OD₆₀₀ optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ORF offener Leserahmen (*Open Reading Frame*)
p Pico (10^{-12})
PAGE Polyacrylamidgelelektrophorese
PK Proteinase K
PMSF Phenylmethylylsulfonylfluorid
RNase Ribonuklease
Prnp für das Prionprotein codierendes Gen
PrP Prionprotein
rpm Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)
RT Raumtemperatur
SDS Natriumdodecylsulfat
SHa Syrischer Hamster
SHaPrP Prionprotein des syrischen Hamsters
TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris Trishydroxymethylaminomethan
U Unit(s), Enzymeinheit
u. a. unter anderem, unter anderen
UV Ultraviolett
v/v Volumen pro Volumen
wt Wildtyp
w/v Gewicht pro Volumen
X-Gal 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid

1. Einleitung

1.1. Die Prionerkrankungen

Prionerkrankungen repräsentieren eine Gruppe sporadischer, vererbbarer oder erworbener neurodegenerativer Erkrankungen. Sie sind übertragbar und verlaufen immer tödlich. Zusammengefasst werden sie auch unter dem Begriff transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSEs, *transmissible spongiform encephalopathies*) (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921; Gerstmann *et al.*, 1936; Gajdusek & Zigas, 1959; Manetto *et al.*, 1992; Medori *et al.*, 1992; Goldfarb *et al.*, 1992).

Zu den humanen Prionerkrankungen zählen die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), Kuru, das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) und die tödliche familiäre Schlaflosigkeit (FFI, *fatal familial insomnia*). Bei den Tieren sind unter anderem die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind, die Traberkrankheit (Scrapie) bei Schaf und Ziege und die chronisch zehrende Erkrankung (CWD, *chronic wasting disease*) der Hirsche und Hirschartigen bekannt.

Die molekulare Grundlage der bekannten Prionerkrankungen ist die Umfaltung des zellulären Prionproteins PrP^C in eine pathogene PrP^{Sc}-Form (Kapitel 1.3.). Neuropathologische Kennzeichen aller TSEs sind Ablagerungen des pathologischen Prionproteins im Gehirn, schwammartige Läsionen mit Vakuolenbildung, massiver Nervenzellverlust und die Aktivierung von astrozytären Gliazellen (Astrogliose). Die Proteinablagerungen können dabei entweder fein granulär oder fibrillärer Natur sein, wobei die fibrillären Strukturen in Form so genannter Plaques organisiert und für die Klassifikation der Erkrankungsform bedeutsam sind (Kretzschmar *et al.*, 2001).

Die häufigste humane Prionerkrankung ist die sporadische Form der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD), deren Ursache bislang unbekannt ist. Sie tritt in 90 % aller Fälle auf. Bei etwa zehn Prozent der humanen Prionenerkrankungen konnten Punkt- bzw. Insertionsmutationen im für das Prionprotein codierenden *Prnp*-Gen für das Auftreten der Krankheit verantwortlich gemacht werden (Abb.1) (Glatzel *et al.*, 2005).

Neben den Punkt- bzw. Insertionsmutationen ist der natürlich vorkommende Methionin/Valin-Polymorphismus am Codon 129 im humanen *Prnp*-Gen (Abb. 1) eine entscheidende Determinante, an allen Formen der TSE zu erkranken. Einige der pathogenen Mutationen im

Prnp-Gen kommen nur mit einem bestimmten Polymorphismus am Codon 129 auf dem gleichen Allel vor (Gambetti *et al.*, 2003; Ironside *et al.*, 2005).

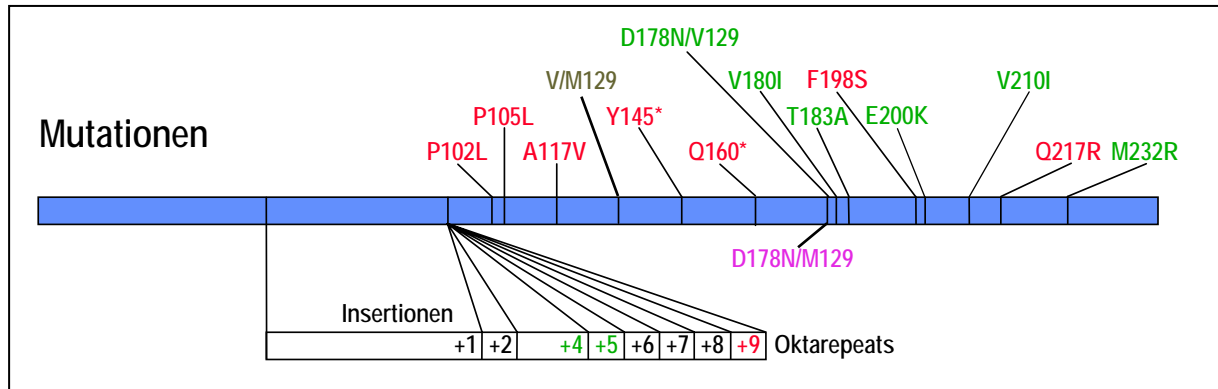


Abb. 1: Polymorphismus 129 und pathogene Mutationen im *Prnp*-Gen. Dargestellt wurde der für das Prionprotein codierende Bereich auf dem Exon 2 im humanen *Prnp*-Gen auf dem Chromosom 20. Die mit den verschiedenen Prionerkrankungen assoziierten Mutationen und der Polymorphismus 129 wurden in verschiedenen Farben dargestellt: grün (familiäre Formen der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJD)), rot (GSS), pink (FFI) und braun (V/M-Polymorphismus am Codon 129). Die Insertionsmutationen codieren für zusätzliche Oktarepeats und können mit der GSS (+9 Oktarepeats), der fCJD (+4 bzw. +5 Oktarepeats) oder einer nicht klar definierten Prionerkrankung assoziiert sein (schwarz). Die pathogenen Stopmutanten wurden mit Y145* bzw. Q160* bezeichnet.

Eine besondere Stellung innerhalb der Prionerkrankungen nimmt die Variante der Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (vCJD) ein, die durch den Verzehr von mit dem BSE-Erreger kontaminierten Schlachtprodukten herrührt und die gleichen Erregerstammkriterien wie die BSE aufweist (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997; Lazmesas *et al.*, 1996; Scott *et al.*, 1999). Sie bildet zusammen mit der Kuru und den iatrogenen Formen der CJD (iCJD) die dritte Gruppe der relativ seltenen erworbenen humanen Prionerkrankungen, die durch ein direktes Einbringen des infektiösen Agens in den Körper übertragen werden.

1.2. Das zelluläre Prionprotein (PrP^C)

Die zelluläre Form des humanen Prionproteins (PrP^C) ist ein Sialoglykoprotein von 209 Aminosäuren Länge (*humPrP*23-231). Das Prionprotein ist extrazellulär vor allem auf der

Zelloberfläche von Neuronen (Kretschmar *et al.*, 1986) über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker in Detergenz-resistenten, Cholesterol und Sphingolipid reichen Mikrodomänen, den *lipid rafts*, in der Plasmamembran verankert (Abb. 2) (Vey *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 2003). PrP^C wird konstitutiv internalisiert und zu 90 % zurück zur Zelloberfläche transportiert (Harris *et al.*, 2003; Prado *et al.*, 2004). Die Halbwertszeit von PrP^C auf der Zellmembran wurde mit 3-6 h beschrieben (Caughey *et al.*, 1989).

1.2.1. Struktur des Prionproteins

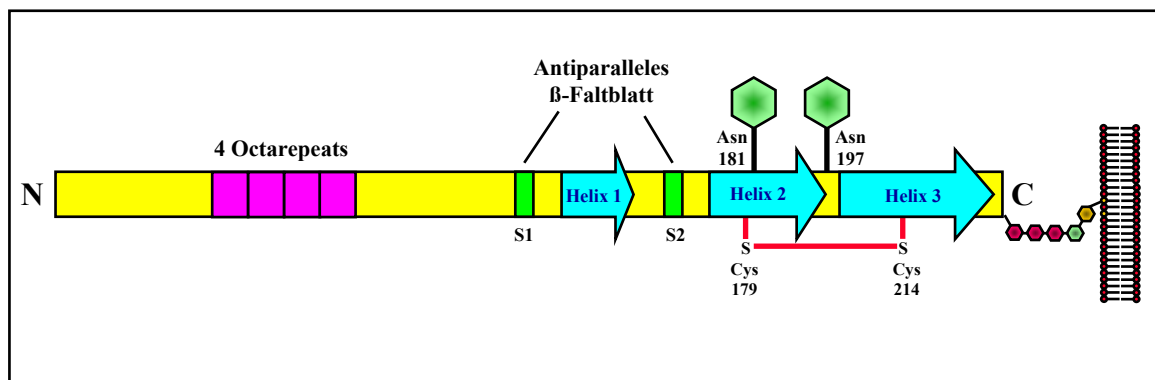


Abb. 2: Schematische Darstellung des humanen Prionproteins. Das Prionprotein ist extrazellulär über den GPI-Anker (kleine Sechsecke) in der Plasmamembran verankert. Die Helices sind in türkis, die beiden N-Glykosylierungen in grün, das antiparallele β -Faltblatt mit den β -Strands S1 und S2 in grün, die Disulfidbrücke in rot und die Oktarepeatregion in pink dargestellt.

Die Struktur des Prionproteins gliedert sich in eine globuläre, α -helikale C-terminale Domäne und eine flexible, unstrukturierte N-terminale Domäne. In der strukturierten C-terminalen Domäne (Aminosäure 121-231) befinden sich drei α -Helices (Helix 1: 144-156, Helix 2: 174-194, Helix 3: 200-228) und ein kurzes aus acht Aminosäuren bestehendes zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt (*Strand 1* (S1): 128-131, *Strand 2* (S2): 161-164) (Zahn *et al.*, 2000; Calzolari & Zahn, 2003) (Abb. 2).

Die hydrophoben Helices 2 und 3 sind durch einen kurzen *Loop* miteinander verbunden und bilden ein kompaktes Helix-Bündel, das durch eine Disulfidbrücke zwischen Cystein 179 und Cystein 214 stabilisiert ist. Helix 1 kann aufgrund seiner sehr polaren Aminosäuresequenz kaum stabilisierende hydrophobe Tertiärkontakte ausbilden und ist damit vom Rest des

Moleküls isoliert (Morissey & Shakhnovich, 1999). Die Stabilisierung der Helix 1 soll rein intrahelikal durch zwei (Asp-Arg) Salzbrücken erfolgen (Speare *et al.*, 2003).

Die beiden N-Glykosylierungen befinden sich in der C-terminalen Domäne an Asn 181 innerhalb der Helix 2 und an Asn 197 in dem kurzen *Loop* zwischen Helix 2 und Helix 3. Im Western Blot detektiert man drei Banden für das zelluläre Prionprotein, die die unterschiedlichen Glykosylierungsformen des Proteins repräsentieren (doppelt, einfach und unglykosyliertes Prionprotein).

Der N-terminale Bereich des Prionproteins PrP²³⁻¹²⁰ stellt eine Cu²⁺-bindende Domäne mit einem Cu²⁺-Bindungsmotiv dar, den so genannten Oktarepeats (Hornshaw *et al.*, 1995; Schätzl *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1997; Viles *et al.*, 1999; Wopfner *et al.*, 1999, Kramer *et al.*, 2001). Die Oktarepeats (Aminosäure 60-91) bestehen aus einer hoch konservierten sich viermal wiederholenden Sequenz aus acht Aminosäuren (PHGGGWGQ), in der das Histidin essentiell für die Cu²⁺-Bindung ist (Riek *et al.*, 1996, 1997; Zahn *et al.*, 2000).

1.2.2. Funktionen des Prionproteins

Die genaue Funktion des zellulären Prionproteins ist ungeklärt. Obwohl *Prnp*^{0/0}-Mäuse ohne Prionprotein lebensfähig sind (Bühler *et al.*, 1992), zeigt sich bei ischämischen Hirnverletzungen eine verminderte Regenerationsfähigkeit des Gewebes ohne zelluläres Prionprotein, was durch die Inaktivierung einer antiapoptotischen Signalkaskade erklärt werden kann (Weise *et al.*, 2006). Bei Wildtyp-Mäusen konnte nach der Hirnverletzung ein Anstieg der PrP^C-Level beobachtet werden, die sich proportional zum Ausmass der neuronalen Schädigung verhielten (Weise *et al.*, 2004).

Prnp^{0/0}-Mäuse zeigten ausserdem eine höhere Empfänglichkeit gegenüber oxidativem Stress (Wong *et al.*, 2001).

Viele Evidenzen deuten darauf hin, dass das Prionprotein in den Kupfertransport oder Kupfermetabolismus der Zelle involviert ist, wobei Cu²⁺-Ionen die Endozytose des Prionproteins induzieren (Pauly *et al.*, 1998; Watt *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2001; Kramer *et al.*, 2001; Chiarini *et al.*, 2002).

Andere Arbeiten zeigten, dass das Prionprotein an der Signaltransduktion und der synaptischen Transmission beteiligt sein könnte (Mouillet-Richard *et al.*, 2000; Mallucci *et al.*, 2002; Collinge *et al.*, 1994).

1.3. Die pathologische Isoform des Prionproteins (PrP^{Sc})

1.3.1. Eigenschaften des pathologischen Prionproteins (PrP^{Sc})

Im Unterschied zum zellulären Prionprotein PrP^C kommt das pathologische Prionprotein PrP^{Sc} nur in oligomerer oder fibrillärer Form vor (Swietnicki *et al.*, 2000). PrP^{Sc} ist unlöslich in nicht-denaturierenden Detergentien und prinzipiell infektiös. Der Nachweis von pathologischem Prionprotein erfolgt durch einen limitierten Proteinase K-Verdau unter Bedingungen, bei denen nur das zelluläre Prionprotein PrP^C komplett verdaut wird. Das aus dem partiellen Proteinase K-Verdau resultierende PrP^{Sc} wird PrP27-30 genannt, weil sein Laufverhalten in der SDS-PAGE etwa dem eines 27-30 kDa grossen Proteins entspricht. PrP27-30 ist weiterhin infektiös und besteht noch aus den Aminosäuren ~ 90-231.

Auf struktureller Ebene weist PrP^{Sc} einen hohen β -Faltblatt-Anteil von etwa 32-37 % und einen α -helikalen Anteil von etwa 12-17 % auf, wohingegen die Struktur des PrP^C überwiegend von α -Helices dominiert wird (Tabelle 1). In den meisten Fällen (Tabelle 1) wurden strukturelle Untersuchungen am PrP27-30 und nicht am PrP^{Sc} durchgeführt, da die PrP^{Sc}-Präparationen stark mit PrP^C angereichert sind.

Tabelle 1: Unterscheidungsmerkmale zwischen nativem PrP^C und pathogenem PrP^{Sc}

| PrP ^C | PrP ^{Sc} |
|--|--|
| monomer | aggregiert (fibrillär oder oligomer) |
| löslich in Detergentien | unlöslich in nicht-denaturierenden Detergentien |
| nicht infektiös | infektiös |
| 30 % α -Helix, 4 % β -Faltblatt (Zahn <i>et al.</i> , 2000) | 12 % α -Helix, 32 % β -Faltblatt (Caughey <i>et al.</i> , 1991) * 17 % α -Helix, 37 % β -Faltblatt (Gasset <i>et al.</i> , 1993)* 14 % α -Helix, 37 % β -Faltblatt (Pan <i>et al.</i> , 1993) * |
| Proteinase K sensitiv | partielle Proteinase K-Resistenz |

* die strukturellen Untersuchungen wurden am PrP27-30 durchgeführt. Die angegebenen Daten wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit nativem PrP^C umgerechnet auf das PrP^{Sc} mit 209 Aminosäuren Länge.

1.3.2. Prionhypothese

Entsprechend der „Protein-only“-Hypothese (Prusiner, 1982) soll ein Protein, das Prionprotein, bei der Übertragung der Prionerkrankungen das infektiöse Agens darstellen (prion = „proteinaceous infectious particle“). Dabei soll ein fehlgefaltetes, oligomeres Konformationsisomer (PrP^{Sc}) dem natürlich vorkommenden, monomeren zellulären Protein (PrP^C) seine Konformation durch direkten Kontakt aufzwingen. Die Information für die Umfaltung des Proteins (PrP^C) wird nur durch die dreidimensionale Struktur des Erregerproteins (PrP^{Sc}) vermittelt.

Ein derartiger Erregertyp ist zuvor noch nicht beschrieben worden. Wegen der geringen Grösse und der langen Inkubationszeit des Erregers wurde zunächst ein langsames Virus vermutet (Alper *et al.*, 1966, 1967; Griffith *et al.*, 1967). Im Gegensatz zu allen bekannten in Frage kommenden Erregern wie Viren, Viroiden oder Bakterien konnte der Erreger nicht durch Nukleinsäure zerstörende Behandlungen wie UV- und ionisierende Strahlung, große Hitze oder durch Gegenwart von Formaldehyd zerstört werden. Ferner konnte die Anwesenheit einer Nukleinsäure von mehr als 100 Basenpaaren Länge im Erreger ausgeschlossen werden (Meyer *et al.*, 1991; Kellings *et al.*, 1992, 1993). Der Erreger konnte aber durch einen vollständigen proteolytischen Verdau mit Proteinase K oder Trypsin oder durch Exposition von Agenzien wie Phenol, SDS, Kaliumthiocyanat und Harnstoff inaktiviert werden, die Proteine modifizierten oder denaturierten (Diener *et al.*, 1982).

Einen wichtigen Beweis für die Prion-Hypothese stellt die Tatsache dar, dass durch homozygote Inaktivierung des *Prnp*-Genes (*Prnp*^{0/0}) Mäuse resistent gegen jede Infektion mit TSE-Erregern werden (Bühler *et al.*, 1993). Diese Resistenz kann durch Implantation von *Prnp*-überexprimierendem Gewebe in die Gehirne der *Prnp*^{0/0}-Mäusen wieder aufgehoben werden (Brandner *et al.*, 1996a, 1996b). Eine deutliche Verminderung der PrP^C-Level konnte in PrP^{Sc} infizierten transgenen Mäusen durch homologe Rekombination mit *Cre/loxP*-Elementen erreicht werden. Die Erkrankung konnte dadurch in den Tieren nicht nur zum Stillstand gebracht werden, sondern bereits aufgetretene spongiforme Läsionen rückgängig gemacht und einem Verlust an Neuronen vorgebeugt werden (Mallucci *et al.*, 2003). Alle Daten sprechen für die Prionhypothese, wobei der finale Beweis der Hypothese durch eine *de novo* Generierung von infektiösem PrP^{Sc} aus rekombinantem Prionprotein weiterhin aussteht.

1.3.3. Prion-Erregerstämme und Speziesbarrieren

Analog zu anderen Erregern lassen sich bei der TSE sogenannte Prion-Erregerstämme (*strains*) voneinander unterscheiden (Bruce *et al.*, 1991, 1994, 2003; Bessen *et al.*, 1992, 1994, 1995). In der SDS-PAGE weisen die Erregerstämme nach proteolytischem Verdau durch Proteinase K ein unterschiedliches Migrationsverhalten mit unterschiedlich starker Glykosylierung auf. Beim Menschen konnten zwei verschiedene PrP^{Sc}-Typen identifiziert werden, die sich jeweils durch eine unterschiedliche N-terminale PrP^{Sc}-Degradation durch die Proteinase K unterscheiden. Der PrP^{Sc}-Typ1 wird zwischen den Aminosäuren 82/83 und der PrP^{Sc}-Typ 2 zwischen den Aminosäuren 97/98 durch die Proteinase K gespalten (Parchi *et al.*, 2000).

Die Transmission von Prionenerkrankungen innerhalb der Säuger wird durch eine Speziesbarriere limitiert oder verhindert (Bruce *et al.*, 1994; Dickinson, 1976). Lange Zeit hatte man vermutet, dass ausschliesslich die Primärsequenz des Prionproteins für die Speziesbarriere verantwortlich ist. Seit einiger Zeit geht man aber davon aus, dass neben der Primärsequenz die verschiedenen Prion-Erregerstämme entscheidend für die dreidimensionale Struktur des glykosylierten Prionproteins mitverantwortlich sind und die Effizienz der Protein-Protein-Interaktionen wesentlich beeinflussen (Collinge, 2005).

1.3.4. Mechanismus der Umfaltung von PrP^C in PrP^{Sc}

Trotz intensiver Forschungen auf dem Gebiet der Prionerkrankungen seit über 35 Jahren ist es weder gelungen den Mechanismus der Umfaltung des Prionproteins aufzuklären noch die Struktur des PrP^{Sc} zu analysieren. Es ist nicht bekannt, warum es zur spontanen Konversion eines zellulären Proteins (PrP^C) in eine pathogene Isoform (PrP^{Sc}) kommt.

Obwohl die sekundärstrukturellen Elemente und deren Anteil an der Gesamtstruktur im PrP^{Sc} seit über 13 Jahren bekannt sind (Tabelle 1), konnte bislang nicht gezeigt werden, welche Segmente bzw. welche strukturellen Elemente im PrP^C an der Umfaltung beteiligt sind und welchen Einfluss sie auf die PrP^{Sc}-Bildung haben. Es ist lediglich bekannt, dass sich der α -helikale Anteil von 30 % (63 AS) im PrP^C (Zahn *et al.*, 2000; Calzolari & Zahn, 2003) auf 12-17 % (25-36 AS) bei der Bildung des PrP^{Sc} reduziert, während der β -Faltblattanteil von 4 % (8 AS) im PrP^C (Zahn *et al.*, 2000; Calzolari & Zahn, 2003) auf 32-37 % (67-77 Aminosäuren)

ansteigt (Tabelle 1). Weiterhin war der N-terminale Bereich des Prionproteins für die Übertragbarkeit der Infektiösität nicht zwingend erforderlich (Rogers *et al.*, 1993; Flechsig *et al.*, 2000).

Die Existenz von Mutationen im proteincodierenden Bereich des *Prnp*-Gens bei allen vererbaren Formen von Prionerkrankungen führte zu der Vermutung, dass die veränderten Prionproteine eine geringere thermodynamische Stabilität als das *Wildtyp*-Prionprotein (*wtPrP*) aufweisen und somit leichter zur Umfaltung neigen könnten. Bei der Bestimmung der thermodynamischen Stabilität der mit den vererbaren Formen der Prionerkrankungen assoziierten Prionproteine, wiesen aber nur einige Prionproteine eine deutliche Destabilisierung im Vergleich zum *wtPrP* auf (Liemann & Glockshuber, 1999; Swietnicki *et al.*, 1998). Diese Daten implizieren, dass die Destabilisierung des PrP^{C} kein genereller Mechanismus ist, mit dem die Bildung des PrP^{Sc} erklärt werden könnte (Liemann & Glockshuber, 1999). Beim Schaf zeigte sich, dass eine Reihe natürlich vorkommender Polymorphismen in der proteincodierenden Region des *Prnp*-Gens eine entscheidende Determinante für das Risiko darstellen, an Scrapie zu erkranken. In Studien mit rekombinantem Schaf-Prionprotein wiesen aber die Proteine die höchste thermodynamische Stabilität auf, die das höchste Risiko beinhalteten, in die PrP^{Sc} -Form umzufalten (Rezaei *et al.*, 2000). Untermuert wurden diese Daten durch einen Vergleich der thermodynamischen Stabilität von Prionproteinaggregaten relativ zum monomeren Prionprotein. Zusätzlich wurden die Aktivierungsenergien für die Bildung von monomeren und aggregiertem Prionprotein bestimmt (Abb. 3) (Baskakov *et al.*, 2001). Es zeigte sich, dass vollständig entfaltetes Prionprotein in zwei thermodynamisch erlaubte Zustände falten kann (Abb. 3). Entgegen der Erwartung, dass die native, zelluläre Form eines Proteins stets die thermodynamisch stabilste Konformation darstellt (Anfinsen, 1973), war aggregiertes, β -Faltblatt-reiches Prionprotein (β -PrP) thermodynamisch stabiler als α -Helix-reiches Prionprotein (α -PrP), das eine zum zellulären Prionprotein PrP^{C} analoge Sekundärstruktur aufwies. Die Bildung des β -PrP war aber im Gegensatz zur Bildung des α -PrP durch eine hohe kinetische Barriere gehemmt. Insofern steht die Faltung des Prionproteins unter kinetischer Kontrolle (Abb. 3) (Baskakov *et al.*, 2001).

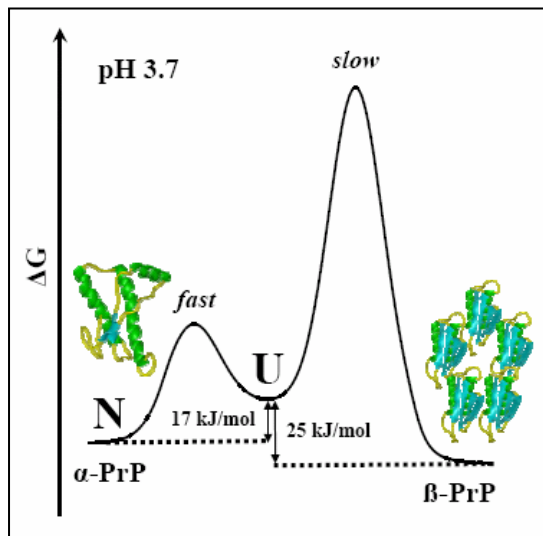


Abb. 3: Die Faltung des Prionproteins ist unter kinetischer Kontrolle (Baskakov et al., 2001) Ausgehend vom vollständig entfalteten Zustand (U) kann rekombinantes *moPrP90-231* bei einem pH-Wert von 3.7 in zwei thermodynamisch erlaubte Zustände falten. Oligomeres β -Faltblatt-reiches Prionprotein (β -PrP) ist um 8 kJ/mol thermodynamisch stabiler als α -Helix-reiches Prionprotein (α -PrP). Die Bildung des β -PrP wird aber durch eine hohe Energiebarriere (Aktivierungsenergie) verhindert.

1.3.5. Einfluss des pH-Wertes auf die Aggregation des Prionproteins

Neben dem Konversionsmechanismus und der Struktur des infektiösen Erregers sind auch die zellulären Bedingungen für die PrP^{Sc} -Bildung nicht hinreichend bekannt.

Einiges deutet auf eine Beteiligung des endozytären Weges bei der Umwandlung des nativen PrP^{C} in das pathogene PrP^{Sc} hin (Borchelt *et al.*, 1992; Taraboulos *et al.*, 1992). So wurde die PrP^{Sc} -Bildung durch Erniedrigung der Temperatur verhindert, was die Endozytose und Internalisierung des PrP^{C} blockiert (Borchelt *et al.*, 1992). Zusätzlich wurde vorgeschlagen, dass die PrP^{Sc} -Bildung ohne Oberflächen-Recycling in intrazellulären Kompartimenten ablaufen könnte (Beranger *et al.*, 2002). Da eine Akkumulation des infektiösen PrP^{Sc} unter den sauren Bedingungen der späten Endosomen und Lysosomen erfolgte (McKinley *et al.*, 1991; Arnold *et al.*, 1995; Taraboulos *et al.*, 1992), wurde ein saurer pH-Wert für die Umfaltung des Prionproteins in seine pathogene Isoform für notwendig erachtet.

Zur Simulation der PrP^{Sc} -Bildung mit rekombinantem Prionprotein wurde infolge dessen bevorzugt bei pH-Werten zwischen 4.0-5.0 gearbeitet. Dabei zeigte sich, dass unter sauren, denaturierenden Bedingungen die Umwandlung einer α -helikalen in eine β -Faltblatt-haltige Isoform parallel zur Oligomerisierung des Prionproteins erfolgt (Swietnicki *et al.*, 1997).

Im Gegensatz dazu wurde die Bildung von fibrillären Aggregaten unter neutralen denaturierenden Bedingungen beschrieben (Bocharova *et al.*, 2005a, 2005b; Breydo *et al.*, 2005).

Unter physiologischen Bedingungen konnte beim Prionprotein dagegen kein Faltungsunterschied zwischen pH-Werten von 2.6-7.2 nachgewiesen werden (Swietnicki *et al.*, 1997), was den für die PrP^{Sc}-Bildung notwendigen pH-Bereich weiterhin offen lässt.

1.3.6. PrP^{Sc}-Strukturmodelle

Die dreidimensionale Struktur des PrP^{Sc}-Erregers ist nicht bekannt. Aufgrund der Unlöslichkeit bzw. eines nicht perfekten kristallinen Charakters von fibrillären PrP^{Sc}-Aggregaten konnte ihre Strukturaufklärung durch klassische NMR-Spektroskopie bzw. Röntgenstrukturanalyse nicht durchgeführt werden.

Um eine Vorstellung von der möglichen Tertiärstruktur eines hypothetischen monomeren Erregers (Swietnicki *et al.*, 2000) zu gewinnen, wurden Strukturmodelle des PrP^{Sc}-Erregers auf der Basis von Sekundärstrukturanalysen (Tabelle 1) und elektronenkristallographischen Daten (Wille *et al.*, 1996, 2002) entworfen.

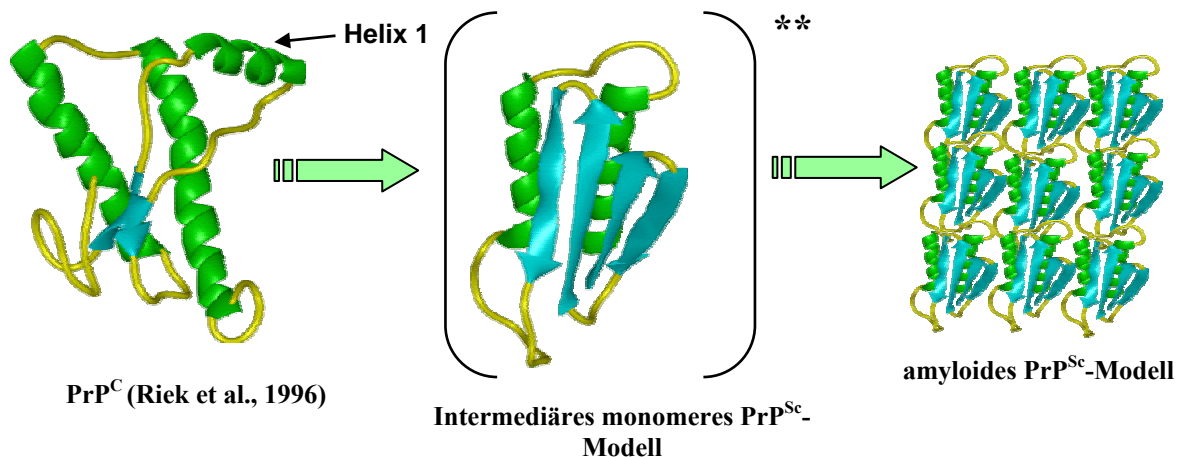


Abb. 4: Erstes PrP^{Sc}-Strukturmodell (Huang *et al.*, 1996). PrP^C-Modell (links) gemäß der ersten NMR-Struktur von rekombinantem moPrP121-231 (Maus) (Riek *et al.*, 1996). Das native Prionprotein wird in diesem Modell intermediär in „monomeres PrP^{Sc}“ (mitte) mit antiparallelem β -Faltblatt (türkis) konvertiert und bildet amyloides (fibrilläres) PrP^{Sc} (rechts). **monomeres PrP^{Sc} konnte nicht isoliert werden (Swietnicki *et al.*, 2000).

Im ersten strukturellen Umfaltungsmodell von PrP^C in PrP^{Sc} (Abb.4) wird die Region um die Helix 1 im Prionprotein in ein viersträngiges antiparalleles β -Faltblatt im PrP^{Sc} konvertiert, während alle anderen Regionen einschließlich der Helix 2 und Helix 3 unverändert vorliegen (Huang *et al.*, 1996; Cohen, 1999). Nach dem Auftreten der ersten NMR-Struktur des Prionproteins erschien es evident, dass die isolierte Helix 1 in ein β -Faltblatt umfaltet (Riek *et al.*, 1996), während Helix 2 und Helix 3 ein kompaktes Helixbündel bilden, dass zusätzlich durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird.

Auf der Grundlage eines Vergleiches elektronenkristallographischer Daten von fibrillärem, infektiösem PrP²⁷⁻³⁰ mit einer trunkierten Form des aggregierten PrP⁹⁰⁻²³¹ ohne die Region 141-176 wurde ein Nachfolgemodell des PrP^{Sc}-Erregers entwickelt (Abb.5) (Govaerts *et al.*, 2004).

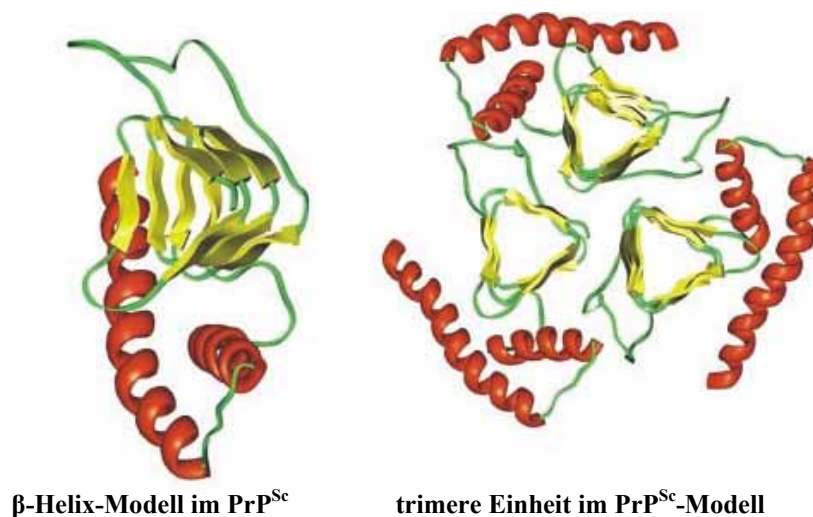


Abb. 5: Aktuelles PrP^{Sc}Strukturmodell (Govaerts *et al.*, 2004). links: Die Region PrP⁹⁰⁻¹⁷⁵ liegt in einem hypothetischen monomeren PrP^{Sc} als β -Helix (gelb) vor, während Helix 2 und Helix 3 (beide rot) intakt bleiben. rechts: trimere Einheit aus drei Prionproteinen im PrP^{Sc}-Modell mit interagierenden β -Helices

Danach faltet der Bereich 90-175 des Prionproteins in eine linksgewundene parallele β -Helix um. Helix 1, das β -Faltblatt und die globuläre Region 90-145 werden nach diesem Modell in parallele β -Strands konvertiert (Abb. 5, gelb), während Helix 2 und Helix 3 (Abb. 5, rot) auch in diesem Modell intakt bleiben (Wille *et al.*, 2002; Govaerts *et al.*, 2004).

1.4. Zielsetzung

Um die spontane Entstehung von infektiösen Prionaggregaten *in vivo* zu verstehen, sollte die Umfaltung des Prionproteins *in vitro* unter physiologischen Bedingungen untersucht werden. In der Vergangenheit wurde jedoch fast ausschliesslich unter künstlich denaturierenden Bedingungen gearbeitet (Harnstoff, GdnHCl), da das Volllängen-Prionprotein unter nativen Bedingungen keine fibrillären Aggregate bildete. Im Gegensatz zum Volllängen-Prionprotein aggregierte ein mit der GSS-assoziiertes C-terminal trunkiertes pathogenes Prionprotein *humPrP23-144* spontan unter physiologischen Bedingungen (Kundu *et al.*, 2003). Anhand von *humPrP23-144* konnte die molekulare Ursache von Speziesbarrieren erstmals *in vitro* aufgezeigt werden, was das enorme Potential physiologischer Bedingungen bei der Untersuchung der Aggregation des humanen Prionproteins zeigt (Jones *et al.*, 2005, Vanik *et al.*, 2004).

Um den Mechanismus der Umfaltung von PrP^C in PrP^{Sc} zu verstehen, ist es notwendig, die Bereiche innerhalb des Proteinase K resistenten Kerns (90-231) im Prionprotein zu identifizieren, die tatsächlich in β -Faltblattstruktur umgewandelt werden. Es ist bekannt, dass die Region 90-145 an der Umfaltung des Prionproteins beteiligt ist (Peretz *et al.*, 1997; Kundu *et al.*, 2003). Da die Helices 2 und 3 (Region 174-231) ein kompaktes disulfidverbrücktes Helix-Bündel bilden, scheint eine Umfaltung dieser Region unwahrscheinlich zu sein. Im Gegensatz dazu gibt es keine direkten Evidenzen, die eine Konversion der Region 146-173 belegen.

In allen bisherigen PrP^{Sc}-Strukturmodellen geht man davon aus, dass die Helix 1 bei der Umfaltung des Prionproteins in ein β -Faltblatt umgefaltet wird (Govaerts *et al.*, 2004; Wille *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 1996). Aufgrund der NMR-Struktur des Prionproteins (Riek *et al.*, 1996) erschien es zunächst plausibel, dass die isolierte Helix 1 in ein β -Faltblatt umgefaltet wird. Allerdings zeigten andere Arbeiten, dass die Helix 1 eine ungewöhnlich starke Neigung zur Helix-Bildung und somit keine Tendenz zur Ausbildung von β -Faltblattstruktur besitzt (Ziegler *et al.*, 2003; Jamin *et al.*, 2002, Sharman *et al.*, 1998). Daher soll aufbauend auf den Arbeiten von Kundu *et al.* (2003) der Einfluss der Helix 1 in einem weiteren GSS-assoziierten Prionprotein *humPrP23-159* unter physiologischen Bedingungen *in vitro* untersucht werden. Ob die Helix 1 tatsächlich in β -Faltblattstruktur umgewandelt wird, kann biochemisch nur durch einen direkten Vergleich mit *humPrP23-144* ohne Helix 1 untersucht werden. Denn

in einem so grossen Prionproteinfragment ist auch der mögliche Einfluss der an der Umfaltung beteiligten Region 90-145 auf die Helix 1 gegeben.

Neben der Region 90-145 und der Helix 1 befindet sich der β -Strand S2 innerhalb der potentiellen Konversionsregion 90-175 im Prionprotein. Ein Fehlen des β -Strands S2 im Prionprotein führte dazu, dass es nicht mehr in eine infektiöse Form überführt werden kann (Vorberg *et al.*, 2001). In Analogie zu den Helix 1-Experimenten soll deshalb auch der Einfluss des β -Strands S2 auf die Aggregation des Prionproteins durch einen direkten Vergleich der Prionproteinfragmente *humPrP23-173* mit *humPrP23-159* untersucht werden.

Der einzige physiologische Parameter, der sich während der Endozytose, die für die Bildung des PrP^{Sc} notwendig zu sein scheint (Borchelt *et al.*, 1992), ändert, ist der pH-Wert. Bislang wurde die pH-Abhängigkeit der Aggregation ausschliesslich unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Hierbei konnte unter sauren Bedingungen die Bildung von β -Faltblatt-reichen oligomeren und fibrillären Strukturen des Prionproteins beobachtet werden (Swietnicki *et al.*, 2000; Morillas *et al.*, 2001). In NMR-Untersuchungen des PrP^C unter nicht-denaturierenden Bedingungen konnte eine Säure-induzierte Destabilisierung der Helix 1-Region gezeigt werden (Zahn *et al.*, 2003). Daraus wurde gefolgert, dass die Helix 1 ein potentieller Ausgangspunkt für die Aggregation des Prionproteins sein kann (Zahn *et al.*, 2003). Eine vergleichende pH-Abhängigkeit der Aggregation der Prionproteinfragmente *humPrP23-159* mit Helix 1 und *humPrP23-144* unter physiologischen, nicht-denaturierenden Bedingungen könnte den Einfluss der Helix 1-Region auf die Aggregation bei verschiedenen pH-Werten aufzeigen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Acrylamid (30 %; Verhältnis AA/BAA= 37,5:1) Carl Roth GmbH, Karlsruhe,

Agar Difco, Detroit

Agarose Bioline, Berlin

APS Sigma, Seelze

Bacto-Hefeextrakt Difco, Detroit

Bacto-Trypton Difco, Detroit

Chloroform, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Desoxyribonukleotide, Bioline, Berlin

DMSO Sigma, Seelze

Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl), Applichem, Darmstadt

Harnstoff, Applichem, Darmstadt

IPTG, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Natriumdeoxycholat, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Nonidet P-40 Sigma, Seelze

Phenol, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Alle weiteren Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Applichem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Seelze) und Bio-Rad (München) bezogen.

2.1.2. Enzyme und Antibiotika

Ampicillin Sigma, Seelze

Immolase DNA Polymerase, Bioline, Berlin

Kanamycin, Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Pfu-DNA-Polymerase Stratagene, Amsterdam

Proteinase K (>30u/mg) Sigma, Seelze

Restriktionsendonukleasen: Promega, Heidelberg; MBI Fermentas, St. Leon-Roth

T4-DNA-Ligase, MBI Fermentas, St. Leon-Roth

2.1.3. „Kits“ zur Behandlung von DNA

Qiagen Plasmid Midi Kit, Hilden

Qiagen Plasmid Mini Kit, Hilden

QIAquick Gel Extraction Kit (70 bp-10 kb), Hilden

QIAquick PCR Purification Kit (100 bp-10 kb), Hilden

2.1.4. DNA- und Protein-„Standards“

DNA-Längenstandard

Hyperladder I (Bioline, Berlin) enthält 14 Banden zwischen 200 bp und 10 kb. Fragmentlängen (bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200. Der *Hyperladder I* ist ein “ready to use” DNA-Längenstandard inklusive DNA-Auftragspuffer. Beim Auftrag von 5 µl *Hyperladder I* werden folgende Mengen der DNA-Fragmente aufgetragen: 10000 bp (100 ng), 8000 bp (80 ng), 6000 bp (60 ng), 5000 bp (50 ng), 4000 bp (40 ng), 3000 bp (30 ng), 2500 bp (25 ng), 2000 bp (20 ng), 500 bp (15 ng), 1000 bp (100 ng), 800 bp (80 ng), 600 bp (60 ng), 400 bp (40 ng), 200 bp (20 ng).

SDS-PAGE Protein-Molekularstandard

„Broad Range“ (Bio-Rad, München)

Der Protein-Standard lieferte folgende Molekulargrößen:

Myosin, Mr 202000; β -Galaktosidase, Mr 116000; Rinderserum Albumin, Mr 84000;
Ovalbumin, Mr 50100; Carbonische Anhydrase, Mr 35700; Sojabohnen Trypsininhibitor,
Mr 29300; Lysozym, Mr 21200; Aprotinin, Mr 7500

2.1.5. Verbrauchsmaterialien zum Arbeiten mit Bakterien

(Steril-)Filter Schleicher & Schüll, Dassel

Kulturgefäße, Plastikwaren Sarstedt, Braunschweig; Nunc, Wiesbaden;

Greiner, Solingen

Pipetten 2.5 ml; 5 ml; 10 ml; 25 ml Sarstedt, Braunschweig

Reaktionsgefäße 0.5 ml; 1.5 ml; 2.0 ml Sarstedt, Braunschweig;

Biozym, Hessisch Oldendorf

Zentrifugiergefäße 15 und 50 ml Sarstedt, Braunschweig

2.1.6. Verbrauchsmaterial für Western blots

Protran^R Nitrocellulose Transfer Membran, Schleicher & Schüll, Dassel

Blotpapier, Criterion Size, Bio-Rad, Hercules

Chemilumineszenzreagenzien:

Super Signal West Femto Luminol/Enhancer Solution, Pierce, Bonn

Super Signal West Stable Peroxide Solution, Pierce, Bonn

HyperfilmTM ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire

2.1.7. Lösungen und Puffer für Arbeiten mit DNA

6 x DNA-Auftragspuffer

0.05 % (w/v) Bromphenolblau, 0.05 % (w/v) Xylencyanol, 30 % (v/v) Glycerin, 100 mM
EDTA, pH 8.0

P1-Puffer (Qiagen)

200 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, RNase A (100 µg/ml)

P2-Puffer (Qiagen)

200 mM NaOH, 1 % (w/v) SDS

P3-Puffer (Qiagen)

3.0 M Kaliumacetat, pH 4.8

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

1 Vol. Phenol mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)

QBT-Puffer (Qiagen)

750 mM NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15 % (v/v) Ethanol, 0.15 % Triton X-100

QC-Puffer (Qiagen)

1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, pH 7.0, 15 % (v/v) Ethanol

QF-Puffer (Qiagen)

1.25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 8.5, 15 % (v/v) Ethanol

10 x TBE-Puffer

0.89 M Tris, 0.89 M Borsäure, 0.025 M EDTA

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.5 mM EDTA

Tris-Puffer

Trishydroxymethylaminomethan in bidestilliertem Wasser auflösen und den pH mit Säure einstellen. Für Tris/HCl wurde Salzsäure für Tris/Acetat Essigsäure verwendet.

2.1.8. Lösungen und Puffer für Proteinarbeiten

10 % APS

0.1 g Ammoniumpersulfat mit destilliertem H₂O auf 1 ml auffüllen.

Blocking-Puffer

1 x PBS, 5 % (w/v) Milchpulver (Applichem) in PBS-T, 0.1 % (v/v) Tween 20

Blotting-Puffer

0.025 M Tris, 0.192 M Glycin, 0.1 % (w/v) SDS, 20 % Methanol

Laufpuffer für SDS-PAGE

0.025 M Tris, pH 8.3, 0.192 M Glycin, 0.1 % (w/v) SDS

Anoden-Laufpuffer für SDS-PAGE (Wiltfang)

0.2 M Tris/H₂SO₄, pH 8.0

Kathoden-Laufpuffer für SDS-PAGE (Wiltfang)

0.2 M Bicine/NaOH, pH 8.3, 0.25 % SDS

1 x Phosphatgepufferte Saline (PBS)

9.55 g Instamed PBS Dulbecco (Seromed, Biochrom KG, Berlin)/l destilliertes H₂O

PBS-Tween

PBS, 0.05 % (v/v) Tween 20

2 x Proteinprobenpuffer

0.125 M Tris/HCl, pH 6.8, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 0.2 M DTT, 0.02 % (w/v) Bromphenolblau

5 x Proteinprobenpuffer

0.25 M NaH₂PO₄, 0.16 M, 10 % SDS, 50 % Glycerol, 75 % Sucrose, 5 mM EDTA, pH 7.0, 0.02 % Bromphenolblau

10 % SDS

1 g SDS in 9 g H₂O lösen.

4 x Sammelgelpuffer

0.5 M Tris/HCl, pH 6.8

4 x Trenngelpuffer

1.5 M Tris/HCl, pH 8.8

4 x Sammelgelpuffer (Wiltfang)

0.8 M BisTris/H₂SO₄, pH 6.5

4 x Trenngelpuffer (Wiltfang)

1.6 M Tris/H₂SO₄, pH 8.0

Lysis-Puffer

0.1 M Tris/HCl pH 8.0, 1.0 M NaCl, 1 mM EDTA, 1.0 % Triton-X-100,
1 mM Benzamidine/HCl

Protease-Inhibitor Mix (PI-Mix)

0.1 mM PMSF, 10 μM TPCK, 10 μM TLCK

PI-Mix wird frisch aus den Lösungen hergestellt und in trockenem Methanol gelöst.

IB-Waschpuffer-TX-100

50 mM Tris/HCl pH 8.5, 23 % Sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidine/HCl, 1.0 %
Triton-X-100

IB-Waschpuffer-TX-100+ Hochsalz

50 mM Tris/HCl pH 8.5, 23 % Sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidine/HCl, 1.0 %
Triton-X-100, 2 M NaCl

IB-Waschpuffer + Detergenz SB14

50 mM Tris/HCl, pH 8.5, 23 % Sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM Benzamidine/HCl, 0.5 % Sulfobetaine 14

Rückfaltungspuffer (Zahn et al., 1997):

Puffer A:

6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM Natriumphosphat, 10 mM Tris, 15 mM β -Mercaptoethanol, pH 8.0

Puffer B:

100 mM Natrium Phosphat, 10 mM Tris, pH 8.0

Puffer C:

100 mM Natrium Phosphat, 10 mM Tris, pH 5.8

Puffer E:

0.5 M Imidazol, 100 mM Natrium Phosphat, 10 mM Tris, pH 5.8

2.1.9. Nährmedien für die Mikrobiologie

LB-Medium

10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, H₂O ad 1 Liter

“Glockshuber-Medium”

20 g Tryptone, 10 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 25.2 g Glycerol, H₂O ad 900 ml. Nach dem Autoklavieren Zugabe von 50 ml steriler autoklavierter 1 M K₂HPO₄-Lösung, 50 ml autoklavierter 20 % Glucose und 10 ml autoklavierter 1 M MgCl₂-Lösung.

TB-Medium

1.2 % (w/v) Trypton, 2.4 % (w/v) Hefeextrakt, 0.4 % (v/v) Glycerin, nach dem Autoklavieren Zugabe von steriler Kaliumphosphatlösung (Endkonzentration: 17 mM KH₂PO₄, 72 mM K₂HPO₄).

10 x M9 Salzmedium (1 L) für die NMR-Spektroskopie

68 g Na₂HPO₄

30 g KH₂PO₄

5 g NaCl

Mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen und Autoklavieren.

1 x M9 Minimalmedium (1 L) für die NMR-Spektroskopie

100 ml 10 x M9 Salzmedium

1 ml 1 M MgSO₄-Lösung (autoklaviert)

1 g NH₄Cl (¹⁵N-gelabelt, 99 %, Campro Scientific GmbH, Berlin)

3 g D-Glucose (¹³C₆-gelabelt, 99 %, Campro Scientific GmbH, Berlin)

10 ml 100 x MEM Vitamin Solution (Gibco-Invitrogen Cell Culture, Karlsruhe)

1. Mit bidestilliertem Wasser auf 1 Liter auffüllen
2. pH-Wert kontrollieren (soll zwischen pH 7.0-7.4 liegen)
3. 0.22 µm steril filtrieren
4. 100 µl einer 1 M CaCl₂-Lösung (autoklaviert) zugeben

LB-Platten

LB-Medium mit zusätzlich 15 g Agar. Als Antibiotika wurden Ampicillin (final 100 µg/ml) oder Kanamycin (final 30 µg/ml) eingesetzt.

2.1.10. *Escherichia coli*-Stämme

DH5a (Hanahan et al., 1983) (Invitrogen, Karlsruhe)

F⁻ ϕ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻*

XL1-Blue (Bullock et al., 1987) (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F['] *proAB lacI^qZΔM15 Tn10* (Tet^r)].

Origami 2(DE3) (Novagen, Nottingham, UK)

Δara-leu7697 ΔlacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F'[lac⁺ lacI^q pro]
(DE3) *gor522::Tn10 trxB* (Str^R, Tet^R)

BI21 (DE3) (Studier and Moffatt, 1986) (Novagen, Nottingham, UK)

E. coli B F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal λ*(DE3)

2.1.11. Oligodesoxyribonukleotide

humJWforw

CCTCTCCTCACGAAGCTTGCAGAGCAGTCAT

humJWrev

AAGATGGTGTCTAGAGGAAGACCTTCCTCATCCCA

23MSon

5'CGACGGTAAAGCTTACATATGAGCAAGAAGCGCCCGAAG

231SSon

GCCGCTGTGCGACTTACGACGATCCACGCTGGTAATAGGCCT

112rev

GGAGCTCGTTCGACTTATCACATGTGCTTCA

144rev

ACGATAGTAGTCGACCTATTAGTCACTGCCGAAATG

159rev

GGGCCTGTAGTCGACTTAGTTGGGGTAACGGTG

173rev

GCAGTCGTGGTCGACCTAGTTCTGGTTGCTGTAC

199rev

ATCATCTTGTCGACTCATTAGGTGAAGTTCTCCCCCT

2.1.12. Mutagenese-Oligodesoxyribonukleotide

humPrP S143C

5' GGCCCATCATAACATTTTCGGCTGCGACTATGAGGACCGTT 3'

5' AACGGTCCTCATAGTCGCAGCCGAAATGTATGATGGGCC 3'

humPrP P102L

5' CACAGTCAGTGAACAAGCTGAGTAAGCCAAAAACCAAC 3'

5' GTTGGTTTTTGGCTTACTCAGCTTGTCCACTGACTGTG

humPrP P105L

5' CAGTGGAACAAGCCGAGTAAGCTGAAAACCAACATGAAGCAC 3'

5' GTGCTTCATGTTGGTTTTTCAGCTTACTCGGCTTGTCCACTG 3'

humPrP G114V

5' ATGAAGCACATGGCTGTTGCTGCAGCAGCTGGG 3'

5' CCCAGCTGCTGCAGCAACAGCCATGTGCTTCAT 3'

humPrP A117V

5' ATGGCTGGTGCTGCAGTGGCTGGGGCAGTGGTG 3'

5' CACCACTGCCCCAGCCACTGCAGCACCAGCCATG 3'

humPrP M129V

5' GGCCTTGCGGGCTACGTGCTGGGAAGTGCCATG 3'

5' CATGGCACTTCCCAGCACGTAGCCGCCAAGGCC 3'

humPrP V129M

5' GGCCTTGCGGGCTACATGCTGGGAAGTGCCATG 3'

5' CATGGCACTTCCCAGCATGTAGCCGCCAAGGCC 3'

humPrP D178N

5' CAGAACAACCTTTGTGCACAACCTGCGTCAATATCACAATC 3'

5' GATTGTGATATTGACGCAGTTGTGCACAAAGTTGTTCTG 3'

humPrP E200K

5' GGGGAGAACTTCACCAAGACCGACGTTAAGATG 3'

5' CATCTTAACGTTCGGTCTTGGTGAAGTTCTCCCC 3'

humPrP V210I

5' GATGATGGAGCGCGTGATCGAGCAGATGTGTATCACC 3'

5' GGTGATACACATCTGCTCGATCACGCGCTCCATCATC 3'

humPrP Q217R

5' GAGCAGATGTGTATCACCAGGTACGAGAGGGAATCTCAG 3'

5' CTGAGATTCCCTCTCGTACCTGGTGATACACATCTGCTC 3'

humPrP R220R (Beseitigung des seltenen Arginin-Codons AGA in E. coli)

5' GTATCACCCAGTACGAGCGTGAATCTCAGGCCTATT 3'

5' AATAGGCCTGAGATTCACGCTCGTACTGGGTGATAC 3'

humPrP R228R (Beseitigung des seltenen Arginin-Codons AGA in E. coli)

5' GGACCATGCTCGATCCACGCTGGTAATAGGCCTGAG 3' (rev-Primer)

2.1.13. Plasmide

pBluescript® II SK (+) (STRATAGENE, La Jolla, USA), Klonierungsvektor (Ap^r)

pCIneo (PROMEGA, Heidelberg), Eukariontischer Expressionsvektor (Ap^r, Neo)

pET27b(+) (NOVAGEN, Madison, USA), Prokaryotischer Expressionsvektor (Kan^r)

pPeptide (MoBiTec, Göttingen), Prokaryotischer Expressionsvektor (Ap^r)

Tabelle 2: cDNAs in bakteriellen Expressionsvektoren

| Name | Expressionsplasmid codiert für: | Herkunft/Relevanz |
|---------------------------------|---|-------------------|
| pET27b(+)/humPrnp, V129M | humanes PrP23-231 mit Valin 129 zu Methionin (Polymorphismus) | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, P102L | humanes PrP23-231 mit Prolin 102 zu Leucin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, P105L | humanes PrP23-231 mit Prolin 105 zu Leucin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, G114V | humanes PrP23-231 mit Glycin 114 zu Valin (Polymorphismus) | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, A117V | humanes PrP23-231 mit Alanin 117 zu Valin | diese Arbeit |

Kapitel 2: Material und Methoden

| Name | Expressionsplasmid codiert für: | Herkunft/Relevanz |
|--|--|-------------------|
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, Y145X | humanes PrP23-144 mit Tyrosin 145 zu Stop | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, Q160X | humanes PrP23-159 mit Prnp- Glutamin 160 zu Stop | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, D178N | humanes PrP23-231 mit Asparaginsäure 178 zu Asparagin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, E200K | humanes PrP23-231 mit Glutaminsäure 200 zu Lysin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, V210I | humanes PrP23-231 mit Valin 210 zu Isoleucin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, Q217R | humanes PrP23-231 mit Glutamat 217 zu Arginin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, Δ 84-91 | humanes PrP23-231 mit Deletion von einem Oktarepeat (1 x PHGGGWGQ) | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, Δ 76-91 | humanes PrP23-231 mit Deletion von zwei Oktarepeats (2 x PHGGGWGQ) | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, P102L, T188M | humanes PrP23-231 mit Prolin 102 zu Leucin und Threonin 188 zu Methionin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, Q160X, G114V | humanes PrP23-159 mit Glutamin 160 zu Stop und Glycin 114 zu Valin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, M129V | humanes PrP23-231 mit Methionin 129 zu Valin (Polymorphismus) | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, M129V, P102L | humanes PrP23-231 mit Prolin 102 zu Leucin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, M129V, P105L | humanes PrP23-231 mit Prolin 105 zu Leucin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, M129V, G114V | humanes PrP23-231 mit Glycin 114 zu Valin (Polymorphismus) | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, M129V, A117V | humanes PrP23-231 mit Alanin 117 zu Valin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, M129V, Y145X | humanes PrP23-144 mit Tyrosin 145 zu Stop | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, M129V, Q160X | humanes PrP23-159 mit Glutamin 160 zu Stop | diese Arbeit |

Kapitel 2: Material und Methoden

| Name | Expressionsplasmid codiert für: | Herkunft/Relevanz |
|-----------------------------------|--|-------------------|
| pET27b(+)/humPrnp, M129V, D178N | humanes PrP23-231 mit Asparaginsäure 178 zu Asparagin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, M129V, E200K | humanes PrP23-231 mit Glutaminsäure 200 zu Lysin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, M129V, V210I | humanes PrP23-231 mit Valin 210 zu Isoleucin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, M129V, Q217R | humanes PrP23-231 mit Glutamat 217 zu Arginin | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, Δ 84-91 | humanes PrP23-231 mit Deletion von einem Oktarepeat (1 x PHGGGWGQ) | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp, V129M, Δ 76-91 | humanes PrP mit Deletion von zwei Oktarepeats (2 x PHGGGWGQ) | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humSynuclein α | Wildtyp Synuclein α | diese Arbeit |
| pPeptide/humAbeta1-40 | Wildtyp Aβ 1-40 Fragment | diese Arbeit |
| pPeptide/humAbeta1-42 | Wildtyp Aβ 1-42 Fragment | diese Arbeit |
| pCIneo/humPrnp-EGFP | PrP-GFP Chimäre mit humanem Prionprotein 1-254 | diese Arbeit |
| pCIneo/moPrnp1-254 | murines PrP1-254 (Maus) | diese Arbeit |
| pCIneo/moPrnp-EGFP | PrP-GFP Chimäre mit murinem Prionprotein 1-254 | diese Arbeit |
| pET27b(+)/humPrnp23-112 | humanes PrP23-112 mit Alanin 113 zu Stop | diese Arbeit |

2.1.14. Antikörper für die Immunologische Detektion

Folgende Antikörper wurden für immunologische Detektionen in der angegebenen Verdünnung im Western blot eingesetzt:

Tabelle 3: Antikörper

| Bezeichnung | Spezifikation | Verdünnung | Herkunft/Referenz |
|--------------------------------|-------------------|------------|--------------------------------|
| Anti-PrP-Antikörper | | | |
| 6H4 | Maus, monoklonal | 1 :10000 | Prionics AG, Basel, Schweiz |
| 1E4 | Maus, monoklonal | 1 :10000 | Cell Sciences |
| 3F4 | Maus, monoklonal | 1 :20000 | Kascsak <i>et al.</i> , 1987 |
| 3B5 | Maus, monoklonal | 1 :20000 | Krasemann <i>et al.</i> , 1996 |
| 12F10 | Maus, monoklonal | 1 :50000 | Krasemann <i>et al.</i> , 1996 |
| Sekundär-Antikörper | | | |
| anti-Maus IgG HRP-gekoppelt | Ziege, polyklonal | 1:125000 | Dako, Hamburg |

2.2. Mikrobiologische und genetische Arbeitsmethoden

Die folgenden Methoden und Vorschriften wurden, soweit nicht anders angegeben, dem Laborhandbuch „Molecular Cloning“ von Sambrook *et al.* (1989) entnommen.

2.2.1. Lagerung von Bakterienstämmen

Häufig verwendete Bakterienstämme wurden auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C über einen Zeitraum von bis zu drei Wochen gelagert.

2.2.2. Stammhaltung von *E. coli*-Kulturen

Zur Herstellung von *E. coli*-Stammkulturen wurden jeweils 0.9 ml einer Übernachtskultur mit 0.1 ml Glycerin versetzt und bei -80 °C gelagert.

2.2.3. Anzuchtbedingungen und Wachstumsmessung

E. coli wurde aerob in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben bei 37 °C in einem Schüttelinkubator bei 180-250 rpm angezogen. Bei der Verwendung von LB-Medium wurde über Nacht inkubiert. Das Wachstum der Zellen wurde durch Trübungsmessung (Ultrospec II, Pharmacia) bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen LB-Medium verfolgt.

2.2.4. Präparation von kompetenten *E. coli*-Zellen (Nishimura *et al.*, 1990)

50 ml Medium A wurden mit 0.5 ml einer *E. coli*-Übernachtskultur angeimpft und unter Schütteln bei 37 °C bis zum Erreichen der mittleren logarithmischen Phase ($OD_{600} = 0.4-0.6$) inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen für ca. 10 min auf Eis gestellt, anschließend bei 5000 rpm und 4 °C für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden danach mit 0.5 ml vorgekühltem Medium A resuspendiert und nach Zugabe von 2.5 ml Lösung B gut gemischt. Die kompetenten Zellen wurden in Aliquots von 0.1 ml aufgeteilt und bis zur

Transformation bei -80 °C gelagert.

2.2.5. Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit der jeweiligen DNA (ca. 100 pg) gemischt und für 15 bis 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden sie einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 s ausgesetzt, für 2 min auf Eis gestellt und dann mit 0.9 ml LB-Medium (42 °C) versetzt. Zur Expression der Antibiotikaresistenz wurden die Zellen für eine Stunde bei 37 °C inkubiert („Kur“) und daraufhin in geeigneten Volumina (i. d. R. 200-300 µl) auf Selektivplatten ausgesät und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.6. Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA

2.2.6.1. Fällung von DNA mit Ethanol

Die Ethanolfällung diente der Konzentrierung von DNA und der teilweisen Entfernung von Proteinen, Salzen und freien Nukleotiden. Dabei wurde die Konzentration monovalenter Kationen erhöht, welches, durch Erhöhung der Dielektrizitätskonstante, die Abstoßung der negativen Ladungen des Phosphodiester-Rückgrats vermindert, wodurch bei Lösungsmittelentzug durch Zugabe von Ethanol die DNA-Fällung ermöglicht wird. Das Volumen der DNA-Lösung wurde bestimmt und mit 1/10 Vol. 3 M Na-Acetat- oder 7 M NH₄-Acetat-Lösung gemischt. Der Ansatz wurde mit 2-3 Vol. Ethanol versetzt und gründlich gemischt. Die Präzipitation erfolgte für 30 min bei -80 °C oder 60 min bis über Nacht bei -20 °C. Die DNA wurde durch Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, 4 °C) pelletiert, anschließend einmal mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (5 min, 14000 rpm, RT). Das DNA-Präzipitat wurde im Exsikkator oder bei RT getrocknet und in dem gewünschten Volumen TE-Puffer oder H₂O aufgenommen.

2.2.6.2. Extraktion von DNA mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Zur Entfernung von Proteinen, Ethidiumbromid oder Resten anderer hydrophober Kontaminationen diente die Extraktion von DNA mit Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol. Die DNA-Lösung wurde mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, gründlich gemischt und zur Beschleunigung der Phasentrennung 5 min zentrifugiert (14000 rpm, RT). Die DNA in der wässrigen Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei Bedarf einer Fällung mit Ethanol unterzogen.

2.2.6.3. Konzentrationsbestimmung der DNA

10 µl der DNA-Lösungen wurden auf 0.5 ml mit H₂O aufgefüllt und die Konzentrationen durch Messung der OD₂₆₀ in einer Quarzküvette (Schichtdicke: 1 cm) gegen 0.5 ml H₂O bestimmt. Ein OD₂₆₀-Wert von 1 entsprach einer Konzentration von 50 µg dsDNA/ml. Der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ wurde als Maß für die Reinheit der DNA herangezogen. Für sehr reine DNA-Lösungen beträgt das Verhältnis 1.8 bis 1.95. Niedrigere Werte sind ein Indiz für die Anwesenheit von Proteinen und Verunreinigungen mit Phenol. Geringe DNA-Mengen wurden nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel über ihre Fluoreszenzintensität unter UV-Licht durch Vergleich mit einem DNA-Standard bekannter Konzentration bestimmt.

2.2.6.4. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für Restriktionsspaltungen wurde das Gesamtvolumen des Ansatzes so gewählt, dass die Enzym-Stammlösung wenigstens 1:10 verdünnt wurde, um unspezifische Reaktionen aufgrund zu hoher Glycerinkonzentrationen zu vermeiden. Pro µg DNA wurden etwa 1-2 Einheiten (Units) des Enzyms und 0.1 Vol. des entsprechenden 10 fach Restriktionspuffers zugegeben. Die Inkubation erfolgte i. d. R. bei 37 °C für eine bis mehrere Stunden. Die Spaltung wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.2.6.5. Isolierung von Plasmid-DNA

A. Minipräparation von Plasmid-DNA

20 ml LB-Selektionsmedium (LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin) wurden mit dem Plasmid-tragenden *E. coli*-Stamm beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation (1 min, 14000 rpm, RT) von 1.5 ml dieser Bakterienkultur wurde das Zellpellet nach Verwerfen des Überstandes in 150 µl P1-Puffer resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT erfolgte die Lyse durch Zugabe von 150 µl P2-Puffer. Das Lysat wurde mehrmals geschüttelt, mit 150 µl eiskaltem P3-Puffer neutralisiert und mindestens 5 Minuten auf Eis belassen. Nach zwei Zentrifugationen unter identischen Bedingungen (5 min, 14000 rpm, 4 °C) wurde die DNA im Überstand auf eine mit 1 ml QBT-Puffer aequilibrierte Qiagen-20 Säule gegeben und vier mal mit je 1 ml QC Waschpuffer gewaschen. Die Elution der DNA erfolgte mit 0.8 ml QF-Puffer, wobei die DNA mit 0.7 Vol. Isopropanol präzipitiert und für 30 Minuten bei 14000 x g, 4 °C zentrifugiert wurde. Nachfolgendes Waschen mit 70 % Ethanol diente der Entfernung von Salzen. Die DNA wurde nach Abtrennung des Ethanols im Exsiccator getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder Wasser gelöst, die Konzentration durch Messung bei OD_{260nm} bestimmt und bei -20 °C gelagert.

B. Midipräparation von Plasmid-DNA

30-40 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit 0.5 ml Bakterienkulturbeimpft und über Nacht bei 37°C im Inkubator geschüttelt. Die Kultur wurde im JA-17-Röhrchen für 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 4 ml P1-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit 4 ml P2-Puffer versetzt, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz durch Zugabe von 4 ml eiskaltem P3-Puffer neutralisiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde 30 min bei 16000 rpm zentrifugiert (4 °C), der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entnommen und auf eine mit 4 ml QBT-Puffer äquilibrierte Qiagen-100-Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen, die Plasmid-DNA anschließend mit 5 ml QF-Puffer eluiert und in einem JA-17-Röhrchen aufgefangen. Die DNA wurde mit 0.7 Vol. Isopropanol gefällt (15 min auf Eis) und bei 16000 rpm bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde

mit 70 %igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer oder H₂O aufgenommen. Abschließend wurde die DNA-Konzentration durch eine OD₂₆₀-Messung bestimmt und Aliquots zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

C. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) angewendet. Es wurden die beigefügten Puffer verwendet und die Extraktion anhand des mitgelieferten Protokolls wie folgt durchgeführt. Die DNA-Bande wurde über dem UV-Leuchttisch mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Etwa 3 Vol. Puffer QG wurden auf das Gelstück gegeben und der Ansatz für 10 min bei 50 °C inkubiert und dabei alle 2 min kurz gemischt (Vortexgerät) um eine gleichmäßige Verteilung der Suspension zu gewährleisten. Nach Auftrag auf eine Qiagen-10-Säule und Zentrifugation für 30 Sekunden, 14000 x g wurde der Durchlauf verworfen und das Pellet zweimal mit Puffer PE gewaschen (jeweils 500 µl Puffer, resuspendieren mittels Mischen am Vortexgerät und zentrifugieren für 30 s, 14000 rpm, RT). Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und zur Elution der DNA in 20 µl H₂O resuspendiert. Nach Inkubation für 5 min bei der jeweils empfohlenen Temperatur (DNA-Fragmente ≤ 4 kb bei RT, DNA-Fragment 4-10 kb bei 50 °C) wurde die Suspension zentrifugiert (30 s, 14000 rpm, RT), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die Elution mit 10 µl H₂O wiederholt und die DNA-Lösungen vereinigt. Qualität und Konzentration der eluierten DNA wurden im Agarosegel überprüft.

2.2.7. Agarosegelelektrophorese

Für die präparative und analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0.7 bis 1.5 %ige (w/v) Agarosegele verwendet. Nach dem Kochen der Agarose in 1 x TBE-Puffer wurde 1/2000 Vol. einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/ml) zugesetzt, die Agarose in eine Flachbettschale gegossen und mit einem Kamm versehen, welcher für die Ausbildung der Probenauftragstaschen sorgte. Nach dem Erstarren der Agarose wurde das Gel in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Flachbettelektrophoresekammer überführt und der Kamm entfernt. Vor

dem Auftragen der DNA-Proben wurden diese mit 0.1-0.2 Vol. 6 x DNA-Auftragspuffer versetzt. Als Längenstandard diente der *Hyperladder I* (Bioline, Berlin). Für die Elektrophorese wurden Spannungen von bis zu 120 Volt (Feldstärken 5-15 V/cm) angelegt. Anschließend wurde die DNA durch UV-Licht als fluoreszierende Banden sichtbar gemacht und fotografiert.

2.2.8. Präparation von DNA für die Subklonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonukleasen verdaut und mittels des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) aus Agarosegelen extrahiert.

2.2.9. Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Die Verknüpfungsreaktion erfolgte unter Einsatz der T4-DNA-Ligase, welche die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxylende und dem 5'-Phosphatende von DNA-Molekülen katalysiert.

Reaktionsmix:

Vektor-DNA nach Restriktionsverdau (50-200 ng)

DNA-Fragment (5-10 facher molarer Überschuß)

1 x T4-DNA-Ligase-Puffer

T4-DNA-Ligase (1-2 U)

i. d. R. H₂O ad 10 µl

Die Reaktionen wurden entweder bei 22 °C für 2 Stunden oder bei 16 °C über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden *E. coli*-Zellen mit der DNA der Ligationsansätze transformiert, eine Minipräparation von den auf Selektivplatten gewachsenen Kolonien durchgeführt und die Konstrukte durch Restriktionsanalysen und DNA-Sequenzanalyse überprüft.

2.2.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR (Mullis & Faloona, 1987, Saiki *et al.*, 1988) wurden i. d. R. mit einem Volumen von 50 µl in 0.5 ml-PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym, Hess. Oldendorf) in einem Thermoblock (Biometra, Göttingen; Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Um einen Fehleinbau von Nukleotiden bei der Enzymreaktion weitestgehend zu vermeiden wurde *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet, die eine deutlich bessere Fehlerkorrekturrate aufweist als z.B. *Taq*-DNA-Polymerase. Zum Screenen wurde eine modifizierte *Taq*-Polymerase Immolase-DNA-Polymerase verwendet (Bioline, Berlin).

Tabelle 4: PCR-Ansätze für verschiedene DNA-Polymerasen

| | <i>Pfu</i> -Turbo Hotstart DNA-Polymerase (Stratagene, Amsterdam) | Immolase-DNA-Polymerase (Bioline, Berlin) |
|----------------------|---|---|
| DNA | 50-500 ng | 50-500 ng |
| „Primer“ | je 50 pmol | je 50 pmol |
| dNTP-Mix | je 10 mM | je 10 mM |
| Polymerase | 1-2.5 U | 1-2,5 U |
| 10 x Reaktionspuffer | 5 µl | 5 µl |
| MgCl ₂ | - | 1.5 mM |
| H ₂ O | auf 50 µl auffüllen | auf 50 µl auffüllen |

Zum Schutz vor Verdunstung wurden die Ansätze mit sterilem Mineralöl (Sigma, Seelze) überschichtet. Die Denaturierung erfolgte im ersten Zyklus bei 94 °C für 2 min beim Arbeiten mit *Pfu*-Turbo Hotstart DNA- Polymerase und für 7 min beim Arbeiten mit Immolase-DNA-Polymerase, danach bei jedem Zyklus bei 94 °C für 30 Sekunden. Die Anlagerungstemperatur wurde ausgehend von der errechneten Schmelztemperatur der „Primer“ empirisch optimiert und die Kettenverlängerung erfolgte jeweils bei 72 °C für 2.5 min/kb (*Pfu*-Turbo Hotstart DNA- Polymerase) bzw. 45 Sekunden/kb (Immolase-DNA-Polymerase). Nach Abschluss von 30 Temperaturzyklen wurden die PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und für ihre Weiterverwendung präpariert.

2.2.11. Einführung von Mutationen durch *site directed mutagenesis* (*Quick change*)

Das *Quick Change Site Directed Mutagenesis*-Protokoll nutzt komplementäre Primer, welche beide die Mutation enthalten. Sie binden an die *wt*-DNA und mittels PCR (2.3.3) wird das vollständige Plasmid amplifiziert. Die parentale DNA wird unter Zuhilfenahme von *Dpn* I verdaut, welches nur methylierte und hemimethylierte DNA erkennt. Die mutierte DNA wird in *E. coli* XL1 blue transformiert. Die Bakterien ligieren die Strangenden und mutierte Plasmide können präpariert werden. Die Oligonukleotide wurden nach Herstellerangaben konstruiert. Die Punktmutanten wurde noch in den Vektor pET27b(+) über die Restriktionsschnittstellen *Nde* I und *Sal* I umkloniert. Die *Inserts* aller Punktmutanten wurden durch Sequenzierung überprüft. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die hergestellten Punktmutanten.

2.2.12. Einführung von Mutationen durch Polymerase-Kettenreaktion (SOE-PCR)

Eine zweite angewendete Methode zur Einführung von Punktmutanten ist die SOE-PCR (*splicing by overlap extension*). Diese Methode wurde immer dann angewendet, wenn eine Mutagenese über *Quick change* nicht möglich war. Bei dieser Technik werden zum einen sogenannte äußere PCR Primer eingesetzt, die entgegengesetzt die Zielregion in einer Duplex-DNA flankieren und zusätzlich sogenannte überlappende innere Primer, die die einzuführende Mutation tragen. Zunächst wird in zwei getrennten Reaktionen die 3' und die 5' Hälfte der Zielsequenz mit je einem inneren und einem äußeren Primer wie oben beschrieben amplifiziert. Zur Berechnung der Annealing-Temperatur mußten jeweilige Fehlpaarungen beachtet werden. Nach Entfernung der Primer durch Aufreinigung der PCR-Produkte über Agarosegelelektrophorese (Absatz 5.1.6.2) wurden jeweils etwa 50 ng der 3'- und 5'-PCR-Produkte gemischt und einer PCR-Reaktion mit den äußeren Primern unterworfen (SOE-PCR). Bei der auf die Denaturierung folgenden Renaturierung während der Annealing-Phase kommt es über deren komplementäre Regionen zur Hybridisierung der beiden unterschiedlichen PCR-Produkte miteinander. Die 3' Enden werden dann während der Elongation verlängert, so daß die mutagenisierte Zielsequenz als Produkt entsteht. Diese mutagenisierte Zielsequenz wird dann ausgehend von den beiden äußeren Primern in den

folgenden PCR-Zyklen amplifiziert.

2.2.13. Herstellung der *Prnp*-Konstrukte im pET27b(+)-Vektor

Der für das humane Prionprotein *humPrP23-231*, V129M codierende *open reading frame* (ORF) des *Prnp*-Gens wurde aus menschlichem Hirngewebe durch PCR mit den Primern *humJWforw* und *humJWrev* (2.1.11) amplifiziert und nach Verdau des entstandenen PCR-Fragmentes durch die Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *Sall* in den Kloniervektor pBluescript II SK(+) ligiert. Aus dem entstandenen Konstrukt pBluescript II SK(+)/*humPrnp23-231*, V129M wurden die für die Prionproteine *humPrP23-112*, *humPrP23-144*, *humPrP23-159*, *humPrP23-173* und *humPrP23-199* codierenden ORFs durch PCR mit den Primerpaaren 23MSon (jeweils) und 112rev, 144rev, 159rev, 173rev und 199rev amplifiziert und nach Restriktionsverdau der PCR-Fragmente mit den Endonukleasen *HindIII* und *Sall* ebenfalls in den Vektor pBluescript II SK(+) ligiert. Durch Verwendung des 23MSon-Primers wurde im amplifizierten PCR-Fragment eine neue *NdeI*-Schnittstelle generiert und die für die Aminosäuren Methionin (ATG) und Serin (AGC) codierende Sequenz ATGAGC gemäss der „N-end-rule“ in Bakterien in die Konstrukte im pBluescript II SK(+)-Vektor eingefügt (Tobias *et al.*, 1991). Die resultierende Startsequenz im Prionprotein lautet MSKKRPK, wobei das erste Lysin dieser Sequenz der ersten Aminosäure in der reifen Sequenz des zellulären Prionproteins *humPrP23-231* entspricht.

Die für die verschiedenen trunkierten Prionproteine codierenden ORFs wurden durch Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *Sall* aus den Konstrukten im pBluescript II SK(+)-Vektor ausgeschnitten und über die gleichen Schnittstellen in den prokaryotischen Expressionsvektor pET27b(+) ligiert.

Das in *E. coli* seltene Arginin-Codon AGA musste am Codon 228 des für das Volllängen-Prionprotein *humPrP23-231*, V129M codierenden Konstruktes pBluescript II SK(+)/*humPrnp23-231*, V129M durch das in *E. coli* häufiger vorkommende Arginin-Codon CGT durch eine PCR mit den Primern 23MSon und 231SSon ausgetauscht werden. Das resultierende PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *Sall* verdaut und in den pBluescript II SK(+)-Vektor ligiert. Die Bezeichnung des Konstruktes lautet pBluescript II SK(+)/*humPrnp23-231*, V129M, R228R. Dieses Konstrukt wurde mit

den Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *Sall* verdaut und für die nachfolgende Proteinsynthese in den Expressionsvektor pET27b(+) ligiert.

2.3. Methoden für Proteinarbeiten

2.3.1. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden bei einer OD₂₈₀ in 6 M GdnHCl über die Bestimmung der spezifischen Extinktionskoeffizienten bestimmt (Gill, von Hippel, (1989). Die spezifischen Extinktionskoeffizienten wurden für alle Prionproteine berechnet und für die Konzentrationsbestimmung benutzt.

Tabelle 5: Spezifische molare Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichte der untersuchten Prionproteine

| Konstrukt | spezifischer molarer Extinktionskoeffizient (mg/ml)*cm ⁻¹ | berechnetes Molekulargewicht (g/mol) |
|----------------------------------|--|--------------------------------------|
| 1. <i>humPrP23-112</i> | 4.553 | 9310.1 |
| 2. <i>humPrP23-144</i> | 3.564 | 12254.5 |
| 3. <i>humPrP23-159</i> | 3.402 | 14342.7 |
| 4. <i>humPrP23-173</i> | 3.270 | 16099.5 |
| 5. <i>humPrP23-199</i> | 2.761 | 19062.9 |
| 6. <i>humPrP23-231, V129M</i> | 2.469 | 22921.2 |
| 7. <i>SHaPrP23-232</i> (Hamster) | 2.635 | 23147.4 |

2.3.2. Expression und Aufreinigung von humanem Prionprotein (zytoplasmatische Einschlusskörper (*Inclusion Bodies*)) aus Vollmedium

Ausgehend von einer frischen LB-Agar Platte (30 µg/ml Kanamycin) wurde eine einzelne Kolonie von BL21 (DE3) mit pET27b/*humPrP* gepickt und damit eine Über-Nacht-Kultur aus

10 ml LB-Medium und 10 µl einer Kanamycin-Stocklösung (30 mg/ml) angeimpft. Am nächsten Morgen wurde 1 ml der Über-Nacht-Kultur mit einem Liter „Glockshuber“-Medium und 30 µg/ml (finale Konzentration) Kanamycin verdünnt und etwa 6 h lang bei 37 °C, 250 rpm im Bakterenschüttler inkubiert. Bei einer $OD_{600} = 1.5$ wurde die Expression der für die verschiedenen Prionproteine codierenden Konstrukte mit IPTG (1 mM Endkonzentration) induziert und über Nacht bei 37 °C, 250 rpm im Schüttler inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde für 10 min bei 4 °C temperiert und für 12 min bei 4400 x g (Kendro, Multifuge 3R) zentrifugiert. Das entstandene Bakterienpellet wurde in 30 ml Lysispuffer plus 300 µl Protease Inhibitor (PI)-Mix, 3 mg DNase I, 3 mg RNase A, 10 mM $CaCl_2$ und 10 mM $MgCl_2$ (pro Liter Kulturmedium) resuspendiert. Durch dreimalige Einfrier/Auftau-Zyklen mit flüssigem Stickstoff wurden die Bakterien aufgebrochen und auf Eis vorsichtig sonifiziert (Branson Sonifier B 12, „Micro Tip Limit“ = 7).

2.3.2.1. Inclusion Body-Aufreinigung

Die zytoplasmatisch entstandenen Inclusion Bodies (IBs) wurden bei 30000 x g (Beckman, JA 17), 4 °C für 30 min zentrifugiert, wobei von allen löslichen Bestandteilen (Überstand) abgetrennt wurde. Die Inclusion Bodies wurden mit Triton-X-100 und NaCl-haltigem IB-Waschpuffer in einem Handhomogenisator gewaschen, bis der Überstand nicht mehr gelblich erschien (2-3 x) und anschliessend bei 30000 x g (Beckman, JA 17), 4 °C für 30 min zentrifugiert. Abschliessend wurde noch einmal mit SB14-haltigem IB-Waschpuffer gewaschen. Die gereinigten Inclusion Bodies wurden in 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 100 mM Natriumphosphat, 10 mM Tris, 15 mM β-Mercaptoethanol, pH 8.0 im Handhomogenisator resuspendiert und zur Abtrennung von DNA und Zelltrümmern zwei mal bei 30000 x g (Beckman, JA 17), 4 °C für 30 min zentrifugiert, wobei der Überstand abgenommen wurde und einem erneuten Zentrifugationsschritt unterworfen wurde. Das Prionprotein befand sich vollständig denaturiert im Überstand.

2.3.2.2. Chromatographische Aufreinigung

A. Metallaffinitätschromatographie:

Die Ni-NTA Agarose (Qiagen) wurde für 30 min im Solubilisierungspuffer (Puffer A: 6 M GdnHCl, 100 mM Natrium Phosphat, 10 mM Tris, 15 mM β -Mercaptoethanol, pH 8.0) inkubiert. Die im gleichen Puffer gelösten PrP Inclusion Bodies wurden bei pH 8.0 zur Ni-NTA Agarose gegeben und bei 4 °C im Kühlraum für 30 min inkubiert. In einem ersten Schritt wurde N-terminal fragmentiertes PrP ohne die für die Bindung an die Ni-NTA Agarose verantwortliche Oktarepeatregion des Prionproteins, membranständige Proteine sowie Nukleinsäuren und Zellbestandteile durch Waschen mit Puffer A und 10 mM Imidazol entfernt. Die Elution des Prionproteins erfolgte durch 3 M GdnHCl mit 0.5 M Imidazol, pH 7.5. Die Präzipitation des Prionproteins erfolgte durch Methanol-Fällung (Zugabe von 4 Volumen Methanol) für 2 h bei -20 °C. Nach sorgfältiger Abtrennung des Methanols wurde das Prionprotein in 8 M Harnstoff, 20 mM Natriumphosphat, 10 mM β -Mercaptoethanol, pH 8.0 resolubilisiert und von im Harnstoff unlöslichen Bestandteilen bei 4 °C, 7800 x g 10 min lang abzentrifugiert (Multifuge 3R, Kendro).

B. Anionenaustauschchromatographie

Bakterielle Proteine mit negativer Gesamtladung oder hoher lokaler negativer Ladung und Reste von Nukleinsäuren wurden über eine Anionenaustauschersäule (EMD-TMAE (Trimethylaminoethyl-) Fractogel, Merck, Darmstadt) abgetrennt. Aufgrund des basischen Charakters des Prionproteins fand keine Wechselwirkung mit der Matrix des Anionenaustauschers statt.

C. Kationenaustauschchromatographie

Das im Durchlauf des Anionenaustauschers befindliche Prionprotein wurde zur Abtrennung des Harnstoffs und N-terminal trunkierter PrP-Fragmente ohne die stark basische N-terminale Region direkt weiter durch Kationenaustauschchromatographie (EMD-COO-Fractogel, Merck, Darmstadt) aufgereinigt. In einem ersten Waschschrift wurde mit 20 mM Phosphatpuffer, 10

mM β -Mercaptoethanol, pH 6.0 gewaschen. Nachfolgend wurde mit steigender Guanidiniumhydrochlorid-Konzentration (0.5-6.0 M), 10 mM β -Mercaptoethanol, 20 mM Phosphatpuffer pH 6.0 gewaschen bzw. eluiert. Prionproteinhaltige Fraktionen wurden gesammelt und vereinigt. Der das Prionprotein enthaltende Puffer wurde auf pH 8.0 gebracht und mit festem GdnHCl eine 6 M Konzentration eingestellt.

2.3.3. Expression und Aufreinigung von humanem Prionprotein (zytoplasmatische *Inclusion Bodies*) in M9 Minimalmedium für die NMR-Spektroskopie

Analog zur Expression im Vollmedium wurde ausgehend von einer frischen Retransformation des Expressionsvektors in BL21 (DE3) auf LB-Platten mit 30 μ g/ml Kanamycin eine einzelne Kolonie gepickt und damit eine Über-Nacht Kultur in 10 ml LB-Medium + 10 μ l Kanamycin (Stock: 30 mg/ml) angeimpft. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien für 10 min bei 4 °C temperiert und bei 4 °C, 5000 x g (JA 17, Beckman) für 5 min zentrifugiert. Es wurde sorgfältig vom Überstand abgetrennt und das 10 ml Pellet ohne LB-Medium (1:100-Verdünnung) sofort in 1 Liter M9-Minimalmedium durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Das M9-Minimalmedium enthielt als Stickstoffquelle immer 15 N-Ammoniumchlorid (99 %) und als Kohlenstoffquelle „normale“ 12 C-D-Glucose oder gelabelte 13 C6-D-Glucose (99 %). Induktion der Bakterien erfolgte nach ~8-9 h Wachstum im Bakterienschüttler (250 rpm, 37 °C) bei einer $OD_{600} = 0.65-0.7$. Die finale IPTG-Konzentration betrug 1 mM. Die Ernte und Lyse der Zellen erfolgte analog zur Expression im Vollmedium am nächsten Morgen. Auf eine Inclusion Body Reinigung wurde verzichtet. Die Aufreinigung und Rückfaltung der gelabelten Proteine war identisch zum nicht-gelabelten Prionprotein. Pro Liter Minimalmedium konnten nach Aufreinigung und Rückfaltung etwa 30 mg 15 N/ 13 C-gelabeltes Prionprotein gewonnen werden.

2.3.4. Allgemeines Rückfaltungsprotokoll für das Prionprotein

Die oxidative Rückfaltung des *full-length* Prionproteins PrP23-231 bzw. die Rückfaltungen der Fragmente ohne Disulfidbrücke erfolgte mittels Metallaffinitätschromatographie. Das unter 2.3.2.C aufgereinigte Prionprotein in 6 M GdnHCl, 20 mM Phosphat, pH 8.0, 10 mM β -Mercaptoethanol wurde analog zu 2.3.2. A an Ni-NTA Agarose gebunden. Zunächst wurde mit 50 ml Puffer A gewaschen. Im Batch-Verfahren wurde Puffer A durch steigende Konzentrationen von Puffer B ersetzt. Damit enthielt jeder Waschpuffer neben sinkenden Konzentrationen von GdnHCl (5 M, 4 M, 3 M, 2 M, und 1 M) immer 100 mM Natriumphosphat und 10 mM Tris, pH 8.0. Final wurde durch Waschen mit 50 ml reinem Puffer B und 50 ml Puffer C vom Denaturierungsmittel entfernt. Die Elution des rückgefalteten Prionproteins erfolgte durch 50 ml Puffer E. Ungefaltetes, reduziertes oder aggregiertes Prionprotein konnte unter diesen Bedingungen nicht eluiert werden.

Oxidative Rückfaltung

Die oxidativen Rückfaltungsbedingungen für das Volllängen-Prionprotein PrP23-231 wichen nur leicht von obigem allgemeinem Rückfaltungsprotokoll ab. Die Rückfaltungspuffer enthielten kein Reduktionsmittel mehr. Nach der Bindung des Prionproteins an Ni-NTA-Agarose wurde mit 100 ml Puffer A gewaschen und für 3 h auf einem „Rollinkubator“ bei RT inkubiert. Anschließend wurde mit dem allgemeinen Rückfaltungsprotokoll fortgefahren. Die Ausbeuten der Rückfaltung betragen bei PrP-Fragmenten ohne Disulfidbrücke 70 %, beim *full-length* Prionprotein PrP23-231 15-25 % bezogen auf den letzten Aufreinigungsschritt (Kationaustauscher).

Alternatives Rückfaltungsprotokoll

Die Prionproteine *humPrP23-112*, *humPrP23-144* und *humPrP23-159* konnten auch nach dem letzten Aufreinigungsschritt, der Kationaustauschchromatographie, über eine Reversed Phase Chromatographie (C4-Material, Vydac) entsalzt werden. Die C-terminal verkürzten Fragmente eluierten zwischen 20-30 % Acetonitril und 0.1 % Trifluoressigsäure und konnten

nach Lyophyllisation problemlos in ddH₂O solubilisiert werden. Auch nach Ultrazentrifugation bei 4 °C, 15 h, 218000 x g waren keine sichtbaren Aggregate vorhanden, was durch Kapillare Zonenelektrophorese (CZE) und Absorptionsmessungen bei 350 nm bestätigt werden konnte. Im Kontrast zu obigen Fragmenten (113stop-, 145stop-, 160stop-Mutanten) lösten sich *humPrP23-173* und längere Fragmente nach Reversed Phase Chromatographie mit nachfolgender Lyophyllisation nicht oder nur sehr unvollständig in destilliertem Wasser auf.

2.3.5. Entsalzung und Aufkonzentration

Entsalzung

Nach der Rückfaltung lag das Prionprotein in einem 100 mM Phosphatpuffer, 10 mM Tris und 0.5 M Imidazol bei einem pH-Wert von 5.8 vor. Die Abtrennung des aggregations-induzierenden Phosphatpuffers war zwingend notwendig und erfolgte durch Dialyse gegen 10 mM Natriumacetat Puffer, pH 4.5, 0.1 % Benzamidinhydrochlorid und 0.1 % Natriumazid (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, Pierce, Bonn). Dabei wurde zweimal gegen je 5 Liter Acetatpuffer für je 2 h bei RT und final gegen 5 Liter Acetatpuffer über Nacht bei RT dialysiert.

Aufkonzentration

Die Proteinkonzentration betrug nach der Dialyse zwischen 0.5-1 mg/ml. Sofern eine höhere Konzentration für nachfolgende Versuche notwendig war, fand eine Aufkonzentrierung über Centricons statt (Centicon Plus-70, Ultracel-PL, Millipore). Diese Centricons haben ein Fassungsvermögen von 70 ml und weisen ein finales Volumen nach der Aufkonzentration von 350 µl auf.

2.3.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch diskontinuierliche, denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Das Gel bestand zu etwa $\frac{1}{4}$ seiner Länge aus dem Sammelgel und zu $\frac{3}{4}$ aus dem Trenngel. Verwendet wurden Minigele (100 x 80 x 1.5 mm; Bio-Rad, München).

A. Gelzusammensetzung der SDS-PAGE:

Tabelle 6: Trenngel (2 x 1.5 mm) für MiniProtean III:

| Acrylamidkonzentration | 5 % | 7.5 % | 10 % | 12.5 % | 15 % |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 30 % Acrylamid | 2.5 ml | 3.75 ml | 5.0 ml | 6.125 ml | 7.5 ml |
| 1.5 M Tris/HCl pH 8.9 | 3.75 ml | 3.75 ml | 3.75 ml | 3.75 ml | 3.75 ml |
| 10 % SDS | 150 μ l | 150 μ l | 150 μ l | 150 μ l | 150 μ l |
| TEMED | 15 μ l | 15 μ l | 15 μ l | 15 μ l | 15 μ l |
| H ₂ O | 8.51 ml | 7.26 ml | 5.01 ml | 4.98 ml | 3.51 ml |
| 10% APS | 75 μ l | 75 μ l | 75 μ l | 75 μ l | 75 μ l |

Tabelle 7: Sammelgel (2 x 1.5 mm) für MiniProtean III:

| Acrylamidkonzentration | 1 x 5 %iges Gel | 2 x 5 %iges Gel |
|------------------------|-----------------|-----------------|
| 30 % Acrylamid | 0.75 ml | 1.5 ml |
| 0.5 M Tris/HCl pH 6.8 | 0.94 ml | 1.88 ml |
| 10 % SDS | 37.5 μ l | 75 μ l |
| TEMED | 15 μ l | 15 μ l |
| H ₂ O | 2.12 ml | 4.24 ml |
| 10 % APS | 37.5 μ l | 37.5 μ l |

B. Wiltfang-SDS-Page (Wiltfang et al., 1991)

Tabelle 8: Trenngel (2 x 1.5 mm) für MiniProtean III:

| | | | | | |
|--|--|---------|---------|---------|---------|
| Acrylamidkonzentration | 5 % | 7.5 % | 10 % | 12.5 % | 15 % |
| 8 M Harnstoff | 7.2 g | 7.2 g | 7.2 g | 7.2 g | 7.2 g |
| 30 % Acrylamid (5 % w/v Bis) | 2.55 ml | 3.75 ml | 4.95 ml | 6.3 ml | 7.5 ml |
| 1.6 M Tris/H ₂ SO ₄ , pH 8.0 | 3.75 ml | 3.75 ml | 3.75 ml | 3.75 ml | 3.75 ml |
| 10 % SDS | 150 µl | 150 µl | 150 µl | 150 µl | 150 µl |
| TEMED | 15 µl | 15 µl | 15 µl | 15 µl | 15 µl |
| H ₂ O | auf 15 ml mit H ₂ O auffüllen | | | | |
| 10 % APS | 75 µl | 75 µl | 75 µl | 75 µl | 75 µl |

Tabelle 9: Sammelgel (2 x 1.5 mm) für MiniProtean III:

| Acrylamidkonzentration | 1 x 5 %iges Gel | 2 x 5 %iges Gel |
|--|-----------------|-----------------|
| 30 % Acrylamid (5 % Bis) | 0.75 ml | 1.5 ml |
| 0.8 M BisTris/H ₂ SO ₄ pH 6.4 | 1.88 ml | 3.75 ml |
| 10 % SDS | 37.5 µl | 75 µl |
| TEMED | 15 µl | 15 µl |
| H ₂ O | 1175 µl | 2350 µl |
| 10 % APS | 37.5 µl | 37.5 µl |

Nach dem Gießen des Trenngels wurde die Gellösung mit Isopropanol überschichtet, um einen geraden Abschluss zu erzeugen. Nach dem Polymerisieren des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, die Sammelgellösung zugegeben und der Kamm positioniert. Die Proteinproben wurden mit Proteinprobenpuffer versetzt, 10 Minuten in kochendem Wasser denaturiert und zusammen mit dem vorgefärbten SDS-PAGE Protein-Molekularstandard

„Broad Range“ (Bio-Rad) auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte im Laufpuffer für SDS-PAGE bei einer Stromstärke von 30 mA pro Minigel.

2.3.7. Immunologischer Nachweis elektrophoretisch aufgetrennter Proteine („Western blot“)

Für immunochemische Nachweise wurden Proteine nach ihrer Auftrennung in Polyacrylamidgelen über Elektroelution mit Hilfe des „semi-dry“-Verfahrens (Towbin *et al.*, 1979; Kyhse-Andersen, 1984; Towbin & Gordon, 1984; Bjerrum & Nielsen, 1986) auf immobilisierende Membranen übertragen. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Protran, Schleicher & Schüll, Dassel) mit 0.1 µm Porendurchmesser transferiert. Dazu wurden auf einen Stapel aus drei mit Blotting-Puffer getränkten Filterpapieren (*Whatman*-Papier, Bio-Rad) die Membran und das SDS-Polyacrylamidgel gelegt und mit weiteren drei Lagen Filterpapier (*Whatman*-Papier) bedeckt. Der gesamte Stapel wurde so zwischen die Elektrodenplatten einer Blot-Apparatur positioniert, dass die Nitrocellulose-Membran in Richtung Anode lag. Der Transfer wurde für 1-2 Stunden bei einer Stromstärke von 0.8 mA/cm² Gelfläche durchgeführt. Nach dem Western Blot wurde die Nitrocellulosemembran-Membran mit den immobilisierten Proteinen einmal in PBS gewaschen und anschließend für 60 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Blocking-Puffer zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen gelagert. Anschließend wurde der Primär-Antikörper (s. 2.1.14) in Blocking-Puffer verdünnt und die Membran für 1 Stunde bei RT inkubiert. Die Membran wurde 2 x 5 min in Blocking-Puffer gewaschen und für 60 min bei RT mit der Sekundär-Antikörperlösung (s. 2.1.14) inkubiert und erneut 3 x 5 min in Blocking-Puffer gewaschen.

Die Chemilumineszenzreaktion erfolgte durch Inkubation des Western Blots mit 2 ml einer 1:1-Mischung aus Super Signal West Femto Luminol/Enhancer Solution mit Super Signal West Stable Peroxide Solution für 5 min bei RT unter Lichtausschluss. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte auf einem HyperfilmTM ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire).

2.3.8. Kapillarelektrophorese (CE)

Die Kapillarelektrophorese wurde an einem Beckman P/ACE MDQ Kapillarelektrophoresegerät durchgeführt, gesteuert durch die Karat 7.0 Software von Beckman Instruments. Zur Detektion der Proben wurde bei 214 nm mit einem UV-Detektor gearbeitet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte in einer 75 μm I.D. \times 57 cm (50 cm Effektive Länge) *bare fused-silica* Kapillare (Beckman Instruments) bei 12.5 kV und 25 °C. Neue Kapillaren wurden durch jeweils 10 minütiges Spülen mit 0.1 M HCl, 0.1 M NaOH, H₂O und Laufpuffer äquilibriert. Vor jedem Probendurchlauf wurde die Kapillare für 5 Minuten mit einer 1 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (K90)-Lösung zur Unterdrückung von Wandeffekten gespült. Weiterhin wurde zur Unterdrückung von Adsorptionseffekten an die Kapillarinnenwand bei einem pH-Wert von 2.77 gearbeitet. Der im Laufpuffer enthaltene Polyvinylalkohol (0.5 % (w/v)) sollte ebenfalls die Adsorption von basischen Proteinen an die Kapillarwand verhindern. Alle Lösungen inklusive der Proteinlösungen und des Laufpuffers (50 mM Aspartat, 0.5 % Polyvinylalkohol (PVA) bei pH 2.77) wurden direkt vor Gebrauch 0.2 μm filtriert. Die hydrodynamische Injektion erfolgte bei 0.5 psi für 10 Sekunden. Die Proteinproben wurden vor dem Gebrauch für die CE nur in Wasser gelöst, 0.2 μm filtriert und in einer Konzentration von 0.15 mg/ml eingesetzt.

2.3.9. Elektronenmikroskopie – Negativkontrastierung

Die Negativkontrastierung mit Schwermetallsalzen erlaubt die Darstellung von Proteinen und Proteinaggregaten mit einer Auflösung von 1.0-1.5 nm. Das entspricht Proteindomänen mit ca. 5-15 Aminosäuren. Dazu wurden mit amorpher Kohlefolie bedampfte Kupfernetzchen (*Grids*) verwendet. Diese hydrophoben Objektträger wurden vor dem Aufbringen der wässrigen Probe durch das Beglimmen unter Hochvakuum bei hoher Spannung benetzbar gemacht. Dabei werden Ladungen auf die Kohlefolie gebracht, so dass sie vorübergehend einen hydrophilen Charakter erhält. Dies ermöglicht die Adsorption von partiell geladenen Makromolekülen auf dem Träger. Anschließend wurden 5 μl Aliquots (600-800 ng Protein) der zu untersuchenden Probe auf die Kupfer-*Grids* aufgebracht und maximal 1 Minute inkubiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde mittels eines Filterpapiers abgezogen, wobei das

Präparat nicht eintrocknen durfte und mit einer 2 %igen, wässrigen Uranylacetat-Lösung (pH 3.5-4.5) oder einer 0.75 % Uranylformiat-Lösung (pH 4.0-4.5) negativ kontrastiert wurde.

Elektronenmikroskopische Bilder wurden bei einer Anodenspannung von 60 kV und einer Vergrößerung von 5000x-100000x mit einem Zeiss 10B-Transmissions-Elektronenmikroskop aufgenommen. Die Aufnahmen wurden durch digitale Bildverarbeitung dokumentiert.

Für die Elektronenmikroskopie wurden nur aggregierte Proteinproben benutzt. Die Proben wurden für mindestens 3 Wochen bei Raumtemperatur in 20 mM Natriumphosphat, 20 mM Natriumacetat bei pH 6.5 in Glasgefäßen mit Schraubverschluss (2 ml *Shorty vials*, Neolab, Heidelberg) inkubiert. Die Proben wurden niemals eingefroren. Mehrfaches Einfrieren/Auftauen der Proben veränderte die Morphologie der Proteinaggregate vollständig. Die Uranylacetatlösung musste stets frisch angesetzt und 0.2 µm filtriert werden. Überschüssiges Uranylacetat wurde durch vorsichtiges Schwenken der *Grids* in Wasser entfernt.

2.3.10. Messung der Aggregationsgeschwindigkeit des Prionproteins

2.3.10.1. Thioflavin T-Assay

Die aufgereigten und (oxidativ) rückgefalteten Proteine wurden direkt vor Gebrauch aufgetaut und 0.2 µm filtriert (Millipore). Bei den Reaktionsgefäßen handelte es sich um 2 ml *Shorty vials* aus Borosilikatglas mit Schraubdeckelverschluss (Neolab, Heidelberg). Das Reaktionsvolumen betrug 1 ml und die Reaktionstemperatur 25 °C. Startpunkt der Aggregation war die Zugabe eines 10 fach Acetat-/Phosphatpuffer (200 mM Acetat, 200 mM Phosphat, pH 6.5). Die Reaktionslösungen wurden während der Aggregation weder gerührt oder geschüttelt. Die Proteinkonzentrationen betragen 340 µM, 200 µM und 80 µM bei *humPrP23-144* und *humPrP23-159* und 200 µM, 80 µM, 40 µM und 10 µM bei *humPrP23-173*. Bei externer Zugabe von Aggregationskeimen zu den monomeren Prionproteinen (*Seeding-Experimente*) wurden 200 µM Proteinkonzentrationen eingesetzt, zu denen 1 % (v/v) der Aggregationskeime (*Seeds*) zugegeben wurde. Die Aggregationskeime wurden direkt vor Gebrauch für 10 min mit Ultraschall behandelt. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte durch eine mathematische Kurvenanpassung für sigmoidale Kurvenverläufe an die experimentell bestimmten Daten durch das Programm „SigmaPlot“.

Die Thioflavin T Fluoreszenz (ThT, Sigma-Aldrich) der Proben wurde mit einem Titerplattenlesegerät Safire™ (Tecan, Crailsheim) bestimmt. Zur Bestimmung der optimalen Thioflavin T Fluoreszenzen wurden Thioflavin T Fluoreszenzanregungsspektren von 350-470 nm und Fluoreszenzemissionsspektren von 450-600 nm aufgenommen. Die Messtemperatur betrug immer 30 °C. Die Thioflavin T Fluoreszenzmessungen wurden in 384 well UV-Star Titerplatten (Greiner Bio-one) mit einem Reaktionsvolumen von 100 µl durch Mehrfachbestimmungen mit Mittelwertbildung durchgeführt. Vor jeder Messung wurde die Reaktionslösung mit monomerem oder aggregiertem Prionprotein, Puffer und Thioflavin T für 5 min bei 30 °C im temperierten Titerplattenlesegerät inkubiert. Der *Gain* betrug bei allen Thioflavin T Fluoreszenzbestimmungen 100 %. Die Anregungsbandbreite betrug 5 nm, die Emissionsbandbreite 7.5 nm. Der Integrationszeitraum bei den Fluoreszenzmessungen betrug 100 ms. Zur Messung der Thioflavin T Fluoreszenz wurden Aliquots aus den Aggregationsassays mit 50 mM BisTris, pH 6.7 auf eine Proteinkonzentration von 6 µM verdünnt und mit Thioflavin T (10 µM final) versetzt

2.3.10.2. Absorptionsspektroskopie

Der Einfluss des pH-Wertes auf die Aggregation von *humPrP23-144* und *humPrP23-159* wurde kontinuierlich durch Bestimmung der Absorption verfolgt.

Die Absorptionsmessungen der Proteinlösungen wurden bei 400 nm mit 200 µM Proteinkonzentration von *humPrP23-159* und *humPrP23-144* in unterschiedlichen Puffersystemen bei verschiedenen pH-Werten und 30 °C in einem Titerplattenlesegerät Safire™ (Tecan, Crailsheim) durchgeführt. Jede Messung wurde durch 10 Scans bestimmt und gemittelt. Die Messung wurde in einer Hellma 96 well-Quarztiterplatte durchgeführt. Die Quarztiterplatte wurde mit einer UV-transparenten Abdeckfolie („*viewseal*“, Greiner Bio-one) versiegelt. Das Probenvolumen betrug jeweils 250 µl pro well. Die Bestimmung der Aggregationsgeschwindigkeit der Proteinlösungen erfolgte durch Absorptionsmessungen im Abstand von 15 Minuten. Nach 16 Tagen wurden die Messungen beendet und die Morphologie der aggregierten Proteine elektronenmikroskopisch bestimmt. Die pH-Abhängigkeit der Aggregation der Prionproteine *humPrP23-144* und *humPrP23-159* wurde dreimal wiederholt. Als Puffersysteme wurden verwendet: pH 4.0: 50 mM Natriumacetat; pH

5.0: 50 mM Natriumacetat; pH 6.2: 50 mM MES; pH 7.2: 50 mM MOPS; pH 8.1: 50 mM Tris. Die pH-Abhängigkeit der Aggregation von *humPrP23-112* wurde mit 250 μ M und 400 μ M Proteinkonzentrationen unter den gleichen Pufferbedingungen und pH-Werten wie bei *humPrP23-159* und *humPrP23-144* durchgeführt. Zusätzlich wurden noch 200 mM Natriumchlorid verwendet.

2.3.11. Proteinase K-Verdau

Die Proteinfibrillen wurden mit Proteinase K (PK) (Sigma-Aldrich, >30units pro mg) bei 37 °C für 1 h und 1400 rpm (Eppendorf Thermomixer) in 2 ml Eppendorfgefäßen in 100 mM Tris/HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 0.1 % Brij, 0.5 % Nonidet P40 und 0.5 % Deoxycholate verdaut, wobei das molare Verhältnis von PrP-Fibrillen zur Proteinase K 104:1 (50 μ g/ml PK) und 52:1 (100 μ g/ml PK) betrug. Der Verdau wurde durch Zugabe von 1 mM (finale Konzentration) PMSF und Kochen bei 100 °C für 10 min in SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Proben wurden sofort über eine 15 % H₂SO₄/Bicine SDS-Page (Wiltfang *et al.*, 1991) mit nachfolgender Coomassie-Färbung bzw. Western Blot analysiert. Bei den Western Blots mit Proteinase K verdaulichem aggregiertem Prionprotein wurden die Antikörper 6H4 (Prionics, Basel) (1:10000), 1E4 (Cell Sciences) (1:10000), 12F10 (1:50000) und 3B5 (1:5000) verwendet. Als zweiter Antikörper diente jeweils HRP-gekoppelter Goat-anti-Mouse Antikörper (GaM-HRP) in einer Verdünnung von 1:125000 (Dako).

2.3.12. Edman-Sequenzierung

Vorbereiten der Proteine für die Sequenzierung

Nach Beendigung des Western-Transfers wurde die Position des Gels auf der Membran markiert. Um die Proteinbanden aus der PVDF-Membran ausschneiden zu können, mussten diese durch Anfärben mit Coomassie-Blau sichtbar gemacht werden. Die teilweise Entfärbung der Membran erfolgte durch 7 % Essigsäure in einem Methanol/Wasser-Gemisch (43 % Methanol). Nach dem Ausschneiden der Banden mit einem sauberen Skalpell mussten diese

drei mal 10 min in 1 l destilliertem H₂O gründlich gewässert und bis zur Sequenzierung feucht in einem Reaktionsgefäß bei -20°C gelagert werden.

Die Edman-Sequenzierung der Proteinase K verdauten Proteinfragmente von *humPrP23-159* und *humPrP23-144* erfolgte an einem Procise cLC Proteinsequenziergerät (Applied Biosystems, Weiterstadt) gemäß Standard-Protokollen des Herstellers und wurde von *Dr. Bernhard Schmidt* und *Klaus Neifer*, Abteilung für Biochemie II, Universität Göttingen durchgeführt.

2.3.13. Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Die Matrix-unterstützte Laserdesorptions-Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS) ist ein massenspektrometrisches Verfahren, mit dem die Massen von Substanzen auch bei geringer Konzentration ($10^{-5} - 10^{-6}$ mol/l) bestimmbar sind. Die Probe wird mit einer Matrix vermischt und anschließend getrocknet. Im Vakuum des Massenspektrometers wird das Matrix-Probengemisch einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung ausgesetzt. Die Anregung der Matrixmoleküle führt zu einer Aufweitung des Matrixgerüsts. Bei diesem Vorgang werden sowohl Probenmoleküle, als auch Matrixmoleküle aus der Gitterstruktur der Matrix freigesetzt und ionisiert. Mit Hilfe eines elektrostatischen Feldes von einigen keV/mm werden die geladenen Probenmoleküle in Richtung eines Analysators beschleunigt. Die Probenmoleküle haben jetzt annähernd die gleiche kinetische Energie. Nach der Beschleunigung der Ionen durchlaufen diese eine feldfreie Driftstrecke, die typischerweise 0,5 bis 2 Meter lang ist. Die Massenbestimmung erfolgt über die Messung der Flugzeit, die die Ionen für das Durchfliegen der freien Driftstrecke benötigen. Bei gleicher kinetischer Energie haben Ionen unterschiedlicher Massen gemäß der Beziehung $E = \frac{1}{2} mv^2$ unterschiedliche Flugzeiten. Die Flugzeit wird von einem Detektor registriert. Aus der Flugzeit wird dann die Masse der Substanz ermittelt. Die Kalibrierung erfolgt über Referenzmassen.

Die Bestimmung der Massen von *humPrP23-112*, *humPrP23-144*, *humPrP23-159* und *humPrP23-173* wurde bei einer Proteinkonzentration von 100 µM in 5 mM Natriumacetatpuffer, pH 4.5 von *Dr. Hartmut Kratzin* am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen durchgeführt.

2.4. Spektroskopische Verfahren

2.4.1. FTIR-Spektroskopie

FTIR (Fourier-Transformations-Infrarot)-Spektren von aggregiertem und löslichem *humPrP23-144* und *humPrP23-159* wurden an einem Nicolet 6700 FTIR Spektrometer mit freundlicher Genehmigung der *Thermo Electro Corporation*, Frankfurt durchgeführt. Es wurden jeweils 64 Messungen gemittelt, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern. Die Spektren sind in ihrer zweiten Ableitung dargestellt.

Da Protein-FTIR-Spektren wegen der störenden anregbaren Schwingungen des Wassers (insbesondere der symmetrischen Deformationsschwingung δ bei 1595 cm^{-1}) im interessierenden Wellenlängenbereich (Wellenzahlen zwischen 1700 und 1600 cm^{-1}) nur in D_2O meßbar sind, mußten die Proben vorher in D_2O überführt werden.

Die Suspension wurde in eine IR-Küvette mit CaF_2 -Fenstern gefüllt, die mit Dichtungsringen auf eine Schichtdicke von $50\text{ }\mu\text{m}$ zusammengepreßt wird. Gemessen wurde bei Raumtemperatur. Vor der Messung wurde die Probenkammer ausreichend (mindestens 20 Minuten) mit getrockneter Luft gespült, um den störenden Einfluß von Wasserdampf auf die Spektren zu minimieren.

Wichtiger Bestandteil der Probenvorbereitung war die Entfernung der Trifluoressigsäure aus den lyophyllisierten Proben, da die Carboxyl-Gruppe der Trifluoressigsäure in der Amid I-Region des FTIR-Spektrums zwischen Wellenzahlen von 1600 cm^{-1} bis 1700 cm^{-1} absorbiert. Dazu wurden die monomeren Proteine 3 x mit 50 mM HCl in destilliertem Wasser behandelt und sofort wieder lyophyllisiert. Anschließend wurden alle ^1H -Protonen durch dreimaliges solvatisieren des Proteins in D_2O und nachfolgender Lyophyllisation entfernt und durch ^2H (D)-Protonen ersetzt. In gleicher Weise wurde mit dem Phosphatpuffer und den Aggregationskeimen für die Seeding-Experimente verfahren. Der Phosphat-Puffer wurde vor dem D_2O -Labeling mit NaOD auf pD 6.5 eingestellt. Die Aggregation der D_2O gelabelten Proteine erfolgte unter Standard-Aggregationsbedingungen in Borosilikat-Schraubdeckelgefäßen bei Raumtemperatur in $50\text{ mM Natriumphosphat-Puffer pH } 6.5$ unter Verwendung von $200\text{ }\mu\text{M}$ Proteinkonzentrationen. 1% (v/v) Seeds wurden bei geseedeten Aggregationen verwendet, wobei die Aggregationskeime ebenfalls unter Standard-

Aggregationsbedingungen in D₂O entstanden sind. Die monomeren Proteine wurden bei einer Konzentration von 800 μ M vermessen.

2.4.2. Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie

Circular dichroismus ist die Eigenschaft optisch aktiver Moleküle, links und rechtspolarisiertes Licht gleicher Wellenlänge unterschiedlich stark zu absorbieren. Die optische Aktivität von Proteinen tritt in Form von asymmetrischen Kohlenstoffatomen und/oder aromatischen Aminosäuren auf. Proteine, die sich aus einer großen Anzahl von optisch aktiven Aminosäuren zusammensetzen und Sekundärstruktur besitzen, die auch zur dichroitischen Absorption beiträgt, weisen Circular dichroismus auf.

In der CD-Spektroskopie unterscheidet man je nach Wellenlängenbereich zwei Regionen. Die Nah-UV-Region umfaßt den Bereich zwischen 250 nm und 350 nm. In diesem Bereich sind asymmetrisch angeordnete aromatische Aminosäuren für das Signal verantwortlich. Die Umgebung dieser Aminosäuren ist von der Tertiärstruktur des Proteins abhängig. Ein Signal in diesem Bereich dient als „Fingerabdruck“ des Proteins. Denaturierte Proteine weisen in diesem Bereich kein Signal auf, da ihre aromatischen Aminosäuren nicht mehr in asymmetrischer Umgebung vorliegen. Änderungen bei 285 und 275 nm reflektieren Beiträge sowohl von Tryptophanen als auch von Tyrosinen, während im Bereich von 295 nm nur Tryptophane für das Signal verantwortlich sind. Änderungen im Bereich von 259 nm und 264 nm resultieren aus Änderungen der Phenylalanin-Umgebung. In der Fern-UV-Region (170-250 nm; Amidregion) erzeugt die Konformation der Polypeptidkette ein charakteristisches CD-Signal. α -Helices ergeben zwei benachbarte Minima bei 208 nm und 222 nm. β -Faltblattstrukturen zeigen ein weniger deutlich ausgeprägtes Signal mit einem einzigen Minimum bei 215 nm. Das Fern-UV-CD-Signal liefert daher Informationen über die Sekundärstruktur der untersuchten Proteine. Die Elliptizität Θ (in Grad) wird als quantitatives Maß für die Ausprägung an Struktur verwendet. Die Berechnung der molaren Elliptizität, d.h. der Elliptizität bezogen auf das durchschnittliche Molekulargewicht von Aminosäuren, erfolgt nach folgender Formel (Schmid F.X., 1989):

$$\Theta_{\text{MRW}} = \Theta * 100 * \text{MRW}/c*d = \Theta*100*M_r/c*d*N_A$$

Θ_{MRW} Elliptizität der Aminosäuren (Grad * cm² * dmol⁻¹)

Θ gemessene Elliptizität

MRW mittleres Molekulargewicht der Aminosäuren

c Konzentration der Proteinlösung (mg/ml)

d Schichtdicke der Küvette

M_r Molekulargewicht (g/mol)

N_A Anzahl der Aminosäuren

Die CD-spektroskopischen Messungen wurden an einem J-810 CD-Spektrometer (Jasco) bei 20 °C durchgeführt. Die Schichtdicke der Küvette betrug 0.1 cm. Alle Spektren wurden in 10 mM Natriumacetat, pH 4.0 mit jeweils 50 µM Proteinkonzentrationen aufgenommen. Der Probenraum wurde kontinuierlich mit trockenem Stickstoff gespült. Die Spektren repräsentieren Mittelwerte aus 10 Scans zwischen 180-300 nm. Die Datenerfassung erfolgte im Abstand von 0.1 nm mit einer Geschwindigkeit von 100 nm pro Minute. Alle Spektren wurden durch Subtraktion der Puffer-Spektren korrigiert.

Die Dekonvolution der Spektren erfolgte mit dem Programm CDNN, das mit Hilfe eines neuronalen Netzwerks und eines Basisspektrensatzes die Sekundärstrukturgehalte berechnet (Böhm *et al.*, 1992).

2.4.3. NMR-Spektroskopie von *humPrP23-159* und *humPrP23-173*

Alle NMR-Spektroskopischen Messungen und Auswertungen wurden am MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen von *Lukasz Skora* und *Dr. Markus Zweckstetter* in der Abteilung von *Prof. Dr. Griesinger* durchgeführt.

Die NMR-Spektroskopie von ¹³C und ¹⁵N gelabeltem *humPrP23-159* erfolgte bei 293 K an einem Bruker Avance 900 MHz Spektrometer mit einem Kryo-Sondenkopf. Die NMR-Proben enthielten 1 mM ¹⁵N/¹³C-gelabeltes *humPrP23-159* und *humPrP23-173* in 93 % H₂O, 7 % D₂O, 10 mM Natriumacetat, pH 4.5 und pH 6.5. Die NMR-Daten wurden mit *nmr-Pipe* (Delaglio *et al.*, 1995) und *Sparky* aquiriert und analysiert. Dreidimensionale HACANNH-,

HNCO- und HNN-Experimente (Bax *et al.*, 1993) führten zu einer sequenzspezifischen Anordnung des Peptidrückgrates im Prionprotein. Sekundäre chemische Verschiebungen wurden als Differenzen zwischen den $C\alpha/C'$ -chemischen Verschiebungen und empirischen *random coil*-Daten bei pH 3.0 berechnet (Schwarzinger *et al.*, 2001). *Random coil*-Daten von Prolinen und Aspartaten wurden bei *Wishart et al.* (Wishart *et al.*, 1994) entnommen.

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung und Charakterisierung verschiedener Prionproteinfragmente

Nach den PrP^{Sc}-Strukturmodellen (Govaerts et al., 2004; DeMarco & Daggett, 2004) wird die Region 90-175 des humanen Prionproteins als alleiniger Konversionsbereich für die Bildung des infektiösen Prionproteins angesehen, wohingegen die Helices 2 und 3 innerhalb der Region 174-231 im PrP^{Sc} unverändert vorliegen sollen. Um den Einfluss des β -Strand S1, der Helix 1 und des β -Strand S2 innerhalb des Konversionsbereiches 90-175 auf die Aggregation des Prionproteins zu untersuchen und eine Aussage über ihre Struktur im aggregierten Zustand zu treffen, wurden zunächst verschiedene Prionproteinfragmente hergestellt, die um jeweils eines der drei genannten Sekundärstrukturelemente variieren (Abb. 5)

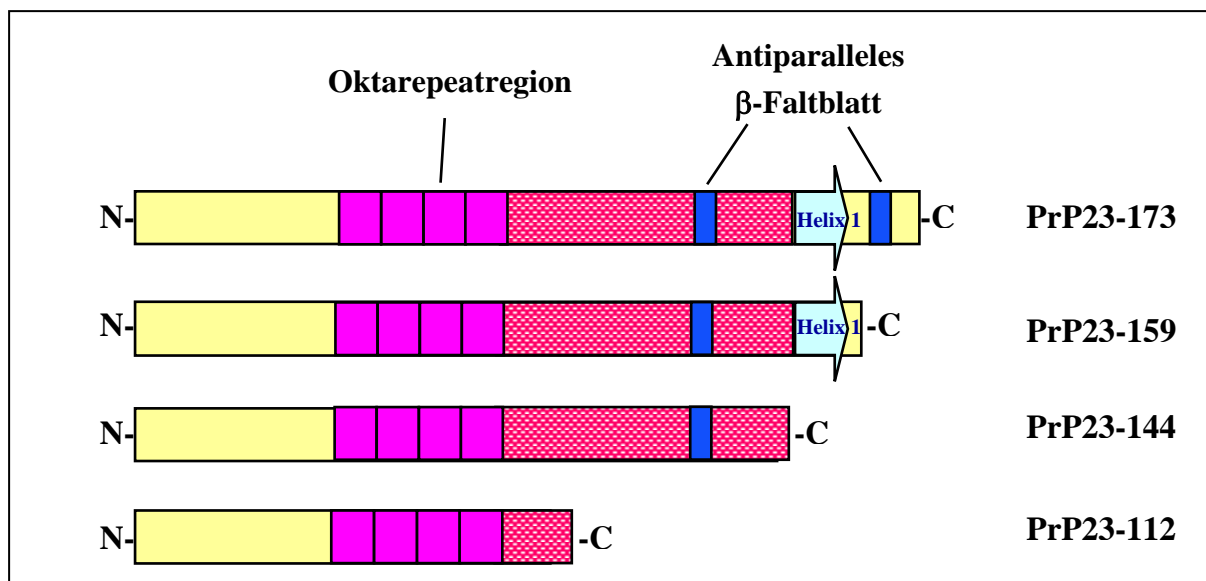


Abb. 5: Schematische Darstellung der untersuchten Prionproteinfragmente mit den erwarteten Sekundärstrukturelementen. Dargestellt sind die Prionproteinfragmente *humPrP23-173*, *humPrP23-159*, *humPrP23-144* und *humPrP23-112*. Die Oktarepeatregion wurde in pink, die im PrP^{Sc} umgefaltete Region 90-145 in rot (Peretz *et al.*, 1997), das antiparallele β -Faltblatt in dunkelblau und die Helix 1 in hellblau dargestellt.

Diese Fragmente waren *humPrP23-112*, *humPrP23-144*, *humPrP23-159* und *humPrP23-173* (Abb. 5). Das kleinste Fragment *humPrP23-112* umfasste den unstrukturierten und flexiblen N-terminalen Bereich des Prionproteins inklusive der Oktarepeat-Region. Das zweite

untersuchte Fragment *humPrP23-144* wies zusätzlich zu *humPrP23-112* die Proteinsequenz für den β -Strand S1 auf. Damit enthielt es nach *Peretz et al.* (1997) auch den im PrP^{Sc} umgefalteten Bereich 90-145.

Das dritte untersuchte Fragment *humPrP23-159* war um das sehr polare Helix 1-Segment relativ zu *humPrP23-144* verlängert, dessen Einfluss auf die Aggregation des Prionproteins durch einen direkten Vergleich der beiden Fragmente untersucht werden sollte. Analog dazu sollte der Einfluss des β -Strands S2 auf die Aggregation des Prionproteins durch einen Vergleich der Prionproteinfragmente *humPrP23-159* mit *humPrP23-173* untersucht werden. Das Fragment *humPrP23-173* war relativ zu *humPrP23-159* um den zweiten β -Strand S2 verlängert und umfasste den vermuteten Konversionsbereich in den PrP^{Sc}-Strukturmodellen (*Govaerts et al.*, 2004; *Wille et al.*, 2002; *DeMarco & Daggett*, 2004).

3.1.1. Herstellung der verschiedenen Prionproteinfragmente

Die Beschreibung der Herstellung der verschiedenen *Prnp*-Konstrukte erfolgt in Kapitel 2.2.13.

Die Expression der für die verschiedenen Prionproteinfragmente codierenden Konstrukte wurde in *E. coli* BL21 (DE3) unter Bildung zytoplasmatischer Einschlusskörper (*Inclusion Bodies*) durchgeführt. Nach Reinigung der *Inclusion Bodies* wurde die chromatographische Aufreinigung der Prionproteinfragmente unter vollständig denaturierenden Bedingungen durchgeführt (Kapitel 2.3.2.).

3.1.2. Überprüfung der Reinheit der Prionproteinfragmente

Die Reinheit der Prionproteinfragmente wurde zunächst in der SDS-Page (Abb. 6) überprüft. Nach Coomassie-Färbung wurde jeweils nur eine Bande für jedes Prionproteinfragment erhalten (Abb. 6). Aus einem Vergleich des Migrationsverhaltens der Prionproteinfragmente mit den Markerproteinen konnte das ungefähre Molekulargewicht der Fragmente abgeschätzt werden. Es stimmte jeweils gut mit den aus der Proteinsequenz berechneten Molmassen (Tabelle 5, Kapitel 2.3.1) überein.

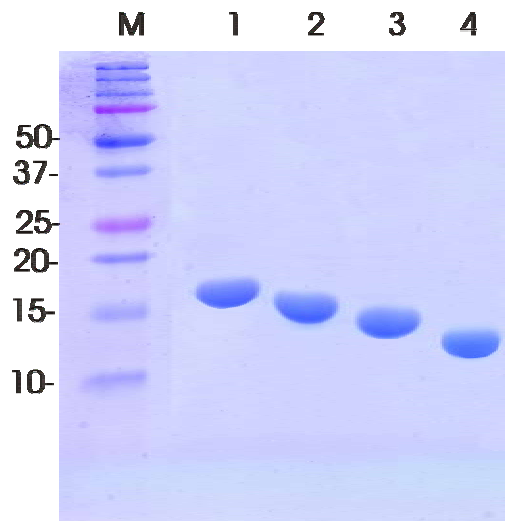


Abb. 6: SDS-PAGE von humanen Prionproteinfragmenten nach Coomassie-Färbung. Der Reinheitsgrad der Proteine wurde nach dem letzten Aufreinigungsschritt überprüft. Die Prionproteinfragmente 1-4 wurden durch eine SDS-PAGE (15 % Polyacrylamidgel) analysiert. Jede Spur wurde mit je 20 µg Protein beladen. M = BioRad-Marker (Precision Plus Protein™ Standards), 1 = *humPrP23-173*, 2 = *humPrP23-159*, 3 = *humPrP23-144*, 4 = *humPrP23-112*.

Zur exakten Reinheitsbestimmung und zum Ausschluss von Modifikationen der Proteinsequenz wurde eine massenspektrometrische Analyse (MALDI-MS) der Prionproteinfragmente durchgeführt (Abb. 7).

In den Massenspektrogrammen der Prionproteinfragmente (Abb.7) wurden jeweils nur zwei Peaks mit unterschiedlichem Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) detektiert, die beide dem gleichen Prionproteinfragment bei unterschiedlicher positiver Ladung (+1, +2) zugeordnet werden konnten, was für eine sehr hohe Reinheit der rekombinanten Proteine spricht.

Zum Nachweis von Modifikationen der Prionproteinfragmente wurden die experimentell bestimmten Massen der Prionproteinfragmente mit aus der Proteinsequenz berechneten Massen verglichen (Tabelle 11). Eine mögliche Erklärung für die Abweichungen zwischen experimentell bestimmten und theoretisch berechneten Masse war eine Hydrolyse von Asparaginen zu Aspartaten. Diese Modifikation würde in einer Massendifferenz von +1 Dalton resultieren. Als besonders hydrolyseempfindlich haben sich die Asparaginsequenzen NG/ SN/ NS/ TN/ NT/ KN/ LN/ VN herausgestellt (Wright *et al.*, 1991, Robinson *et al.*, 1974). Das humane Prionprotein *humPrP23-231* weist elf Asparagine in seiner Proteinsequenz auf, von denen vier (Aminosäuren 32, 108, 173, 181) als besonders hydrolyseempfindlich eingestuft wurden (Wright *et al.*, 1991).

Bei *humPrP23-173* wurde eine Massendifferenz von 34 Dalton zwischen experimentell bestimmter und theoretisch berechneter Masse festgestellt, die aus einer Oxidation eines Methionin-Schwefels in eine Sulfon-Gruppe (32 Dalton) und einer Hydrolyse von ein bis zwei Asparaginen in Aspartate resultieren könnte (Tabelle 11).

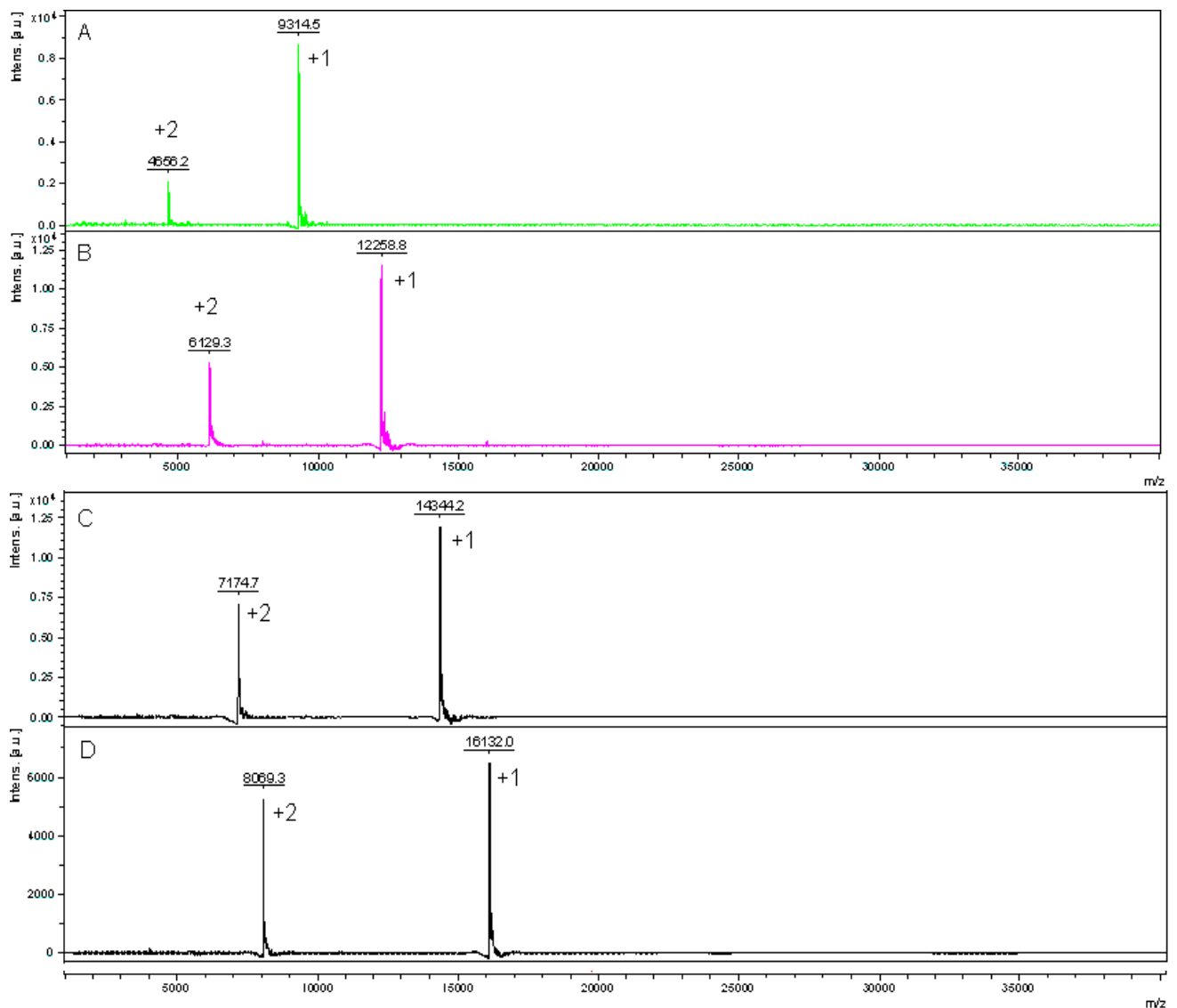


Abb. 7: Massenspektrometrische Analyse (Maldi-MS) der humanen Prionproteine. Maldi-TOF von (A) PrP23-112, (B) PrP23-144, (C) PrP23-159, (D) PrP23-173. Alle Proteine wurden nach Rückfaltung in 10 mM Natriumacetat-Puffer, pH 4.5 vermessen. Die neben den Peaks aufgeführten Zahlenwerte +1 und +2 geben die jeweilige positive Ladung (z) des zu jedem Signal korrespondierenden Fragmentes wider. Die unterstrichenen Zahlenwerte oberhalb der Signale geben das jeweilige Masse/Ladungsverhältnis (m/z) der detektierten Fragmente wider. Die Bestimmung der Massen wurde von *Dr. Hartmut Kratzin* am Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen durchgeführt.

Tabelle 11: Vergleich der experimentell bestimmten Massen mit theoretisch berechneten Massen der humanen Prionproteinfragmente

| Protein | experimentell bestimmte Massen (Dalton) | | theoretisch berechnete Massen (Dalton) | Massendifferenz (gemittelte experimentelle minus theoretische Masse) (Dalton) | Apparativer Fehler von MALDI-TOF (Dalton) | Erklärung der Abweichung zum apparativen Fehler |
|---------------------|---|----------|--|---|---|---|
| | +1 (m/z) | +2 (m/z) | | | | |
| <i>humPrP23-112</i> | 9313.5 | 9308.4 | 9310.1 | +0.9 | +/- 0.9 | sehr gute Übereinstimmung |
| <i>humPrP23-144</i> | 12257.8 | 12254.6 | 12254.5 | +1.7 | +/- 1.2 | Asn-->Asp (eventuell 1x) |
| <i>humPrP23-159</i> | 14343.2 | 14345.4 | 14342.7 | +1.6 | +/- 1.4 | Asn-->Asp (eventuell 1x) |
| <i>humPrP23-173</i> | 16133.0 | 16134.6 | 16099.5 | +34.3 | +/- 1.6 | Oxidation des Schwefels in eine SO ₂ -Gruppe, Asn-->Asp (1-2x) |

Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die nach der Formel: $(m-z)*z$ umgerechneten Massen aus den experimentell bestimmten Masse/Ladungs-Quotienten (m/z) der untersuchten Prionproteine wider (Abb. 7). Zum Vergleich wurden die theoretisch berechneten Massen der Prionproteinfragmente angeführt. Die Differenz aus den beiden gemittelten experimentell bestimmten Massen mit Ladungszahlen von +1 und +2 und theoretisch berechneten Massen sind mit dem maximalen apparativen Fehler von MALDI-TOF Messungen (0.01 %) (Vorm & Mann, 1994) zu vergleichen.

Zusammen mit einem in der Messmethodik begründeten Fehler der MALDI-TOF-Messungen von 0.01 % oder 100 ppm (Vorm & Mann, 1994) lassen sich die Abweichungen zwischen experimentell bestimmter und theoretisch berechneter Masse sehr gut erklären und unterstreichen die hohe Qualität der rekombinant hergestellten Prionproteine.

3.1.3. Strukturanalyse der Prionproteinfragmente

Eine Strukturanalyse der humanen Prionproteinfragmente war zwingend erforderlich, da die Aufreinigung der Proteine aus *Inclusion Bodies* unter vollständig denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurde.

Ein Nachweis der in den Prionproteinfragmenten vorhandenen Sekundärstrukturelemente war

insofern erforderlich, als ein Einfluss dieser Elemente auf das Aggregationsverhalten des Prionproteins untersucht werden sollte. Die gemäss dem Volllängen-Prionprotein zu erwartenden Sekundärstrukturen in den Prionproteinfragmenten sind in Abbildung 5 zusammengefasst.

Vor der strukturellen Analyse mussten die Prionproteinfragmente zunächst rückgefaltet werden. Dabei zeigt sich dass die drei kürzeren Fragmente *humPrP23-112*, *humPrP23-144* und *humPrP23-159* nach Austausch des Denaturierungsmittels problemlos in Wasser gelöst werden konnten, während *humPrP23-173* erst durch ein spezielles Rückfaltungsprotokoll in Lösung gebracht werden konnte (Kapitel 2.3.4) (Zahn *et al.*, 1997). Um eine Vergleichbarkeit der verschiedenen Prionproteinfragmente zu gewährleisten, wurde dieses Rückfaltungsprotokoll auf alle Fragmente angewendet.

Die strukturelle Analyse der Prionproteinfragmente wurde zunächst mit Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie durchgeführt (Abb.8).

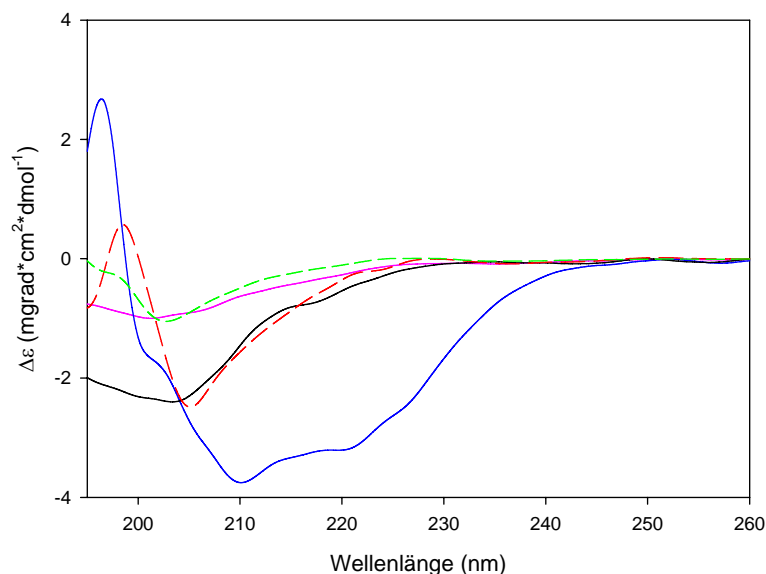


Abb. 8: CD-Spektren der fernen UV-Region der Prionproteinfragmente. Die CD-spektroskopischen Messungen wurden bei 20 °C an einem J-810 CD-Spektrometer (Jasco) durchgeführt. Die Schichtdicke der Küvette betrug 0.1 cm. Alle Spektren wurden in 10 mM Natriumacetat, pH 4.0 mit jeweils 50 µM Proteinkonzentrationen aufgenommen. Jedes CD-Spektrum repräsentiert Mittelwerte aus 10 Messungen. Die Datenerfassung erfolgte im Abstand von 0.1 nm mit einer Geschwindigkeit von 100 nm pro Minute. Das CD-Spektrum von *humPrP23-173* wurde in schwarz (durchgezogene Linie), das von *humPrP23-159* in rot (gestrichelte Linie), von *humPrP23-144* in grün (gestrichelte Linie) und von *humPrP23-112* in pink (durchgezogene Linie) dargestellt. Zum Vergleich wurde das CD-Spektrum von *humPrP23-231* beigegefügt (blaue durchgezogene Linie) (Hornemann *et al.*, 1997).

CD-spektroskopische Untersuchungen der fernen UV-Region von *humPrP23-159* und *humPrP23-173* führten zu sehr ähnlichen Spektren (Abb. 8). Die für α -Helices typischen Minima bei 208 nm und 222 nm, wie sie für das Volllängen-Prionprotein beschrieben werden (Hornemann *et al.*, 1997), konnten jeweils nicht nachgewiesen werden. Stattdessen lagen die Minima bei 205 nm für *humPrP23-159* bzw. 203 nm für *humPrP23-173*, was auf einen noch beträchtlichen unstrukturierten Anteil hindeutete (Abb. 8). Die CD-spektroskopischen Untersuchungen von *humPrP23-144* und *humPrP23-112* führten ebenfalls zu vergleichbaren Spektren innerhalb der fernen UV-Region. Die Minima lagen in den CD-Spektren bei 203 nm für *humPrP23-144* bzw. 201 nm für *humPrP23-112*, was auf einen sehr hohen unstrukturierten Anteil in den Prionproteinfragmenten hindeutete (Kundu *et al.*, 2003) (Abb. 8).

Tabelle 12: Dekonvolution der CD-Spektren der Prionproteinfragmente durch das Programm CDNN (Böhm *et al.*, 1992)

| untersuchte Prionproteine | α -Helix (%) | Antiparalleles β -Faltblatt (%) | Paralleles β -Faltblatt (%) | β -Turn (%) | Random coil (%) |
|---------------------------|---------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------|
| <i>humPrP23-173</i> | 13.5 | 14.0 | 13.7 | 18.1 | 40.7 |
| <i>humPrP23-159</i> | 12.7 | 14.0 | 14.0 | 17.9 | 41.4 |
| <i>humPrP23-144</i> | 10.1 | 14.9 | 15.0 | 17.6 | 42.4 |
| <i>humPrP23-112</i> | 10.0 | 14.1 | 14.0 | 17.9 | 44.0 |

Eine Dekonvolution der CD-Spektren durch das Programm CDNN (Böhm *et al.*, 1992) führte für die Prionproteinfragmente zu sehr ähnlichen Sekundärstrukturgehalten mit insgesamt sehr hohen *random coil*-gehalten (Tabelle 12). Die α -helikalen Werte für die Prionproteinfragmente lagen zwischen 10.0-13.5 %, wobei *humPrP23-112* und *humPrP23-144* gemäss der NMR-Struktur des Volllängen-Prionproteins keine Helices beinhalten sollten (Zahn *et al.*, 2000). Bei einer zum Volllängen-Prionprotein vergleichbaren Länge der Helix 1 sollte der α -helikale Gehalt von *humPrP23-173* 9 % und der von *humPrP23-159* 10 % betragen.

Der β -Faltblatt-Gehalt (antiparallel) war für alle Prionproteinfragmente ebenfalls sehr ähnlich

und lag mit 14.0-14.9 % ebenfalls deutlich zu hoch. *humPrP23-112* sollte in Anlehnung an die NMR-Struktur des Volllängen-Prionproteins keinerlei β -Faltblatt-Struktur aufweisen.

Die Anwesenheit einer Helix 1 in *humPrP23-159* und *humPrP23-173* und des β -Faltblattes in *humPrP23-173* konnte aus der quantitativen Analyse der CD-Spektren (Tabelle 12) nicht eindeutig bestimmt werden. Da auch FTIR-spektroskopische Messungen (Daten nicht abgebildet) keinen eindeutigen Nachweis der Helix 1 in *humPrP23-159* erbringen konnten, wurden *humPrP23-159* und *humPrP23-173* NMR-spektroskopisch zum Nachweis von Helix 1 bzw. des β -Faltblattes untersucht.

Die NMR-spektroskopische Untersuchung von *humPrP23-159* (Abb. 9 A, B) diente in erster Linie dem Nachweis der Helix 1 bei pH 6.5 und pH 4.5.

Die Zuordnung der Signale zu den Aminosäuren der Helix 1-Region erfolgte im zweidimensionalen ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum (Abb. 9 A). Aminosäuren in Helices resonieren üblicherweise in der ^1H -Dimension zwischen 7.8-8.8 ppm, was allerdings auch für Aminosäuren in unstrukturierten Bereichen des Proteins gilt. Die ^{15}N -chemischen Verschiebungen in der zweiten Dimension sind stärker von der jeweiligen Aminosäure als von der sie umgebenden Struktur abhängig. Aminosäuren in β -Faltblättern resonieren üblicherweise zwischen 7-10 ppm in der ^1H -Dimension und zwischen 105-135 ppm in der ^{15}N -Dimension. Insofern konnte als direkte strukturelle Information aus dem ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum (Abb. 9 A) nur abgeleitet werden, dass die Region zwischen den Aminosäuren 135-159 kein eindeutiges β -Faltblatt-Spektrum aufweist. Auf der Grundlage der Zuordnung der gemessenen Signale zu den Aminosäuren des Prionproteins *humPrP23-159* im ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum konnte eine sekundärstrukturelle Zuordnung der Aminosäuren zu α -Helices oder β -Faltblätter vorgenommen werden (Abb. 9 B).

Aminosäuren mit Tendenz zur Ausbildung von β -Faltblattstruktur in *humPrP23-159* weisen negative $\Delta\delta\text{C}'$ -Werte auf (Abb. 9 B), während Aminosäuren mit Tendenz zur Ausbildung von Helices positive $\Delta\delta\text{C}'$ -Werte besitzen. Insofern konnte die Region 144-152 eindeutig einer α -Helix zugeordnet werden. Im Vergleich zum Volllängen-Prionprotein *humPrP23-230* (Zahn *et al.*, 2000; Calzolari & Zahn, 2003) war die Helix 1 in *humPrP23-159* um vier Aminosäuren verkürzt. Die Tendenz zur Ausbildung helikaler Strukturen innerhalb der Helix 1-Region in *humPrP23-159* ($\Delta\delta\text{C}'$ -Werte in Abb. 9 B) war im Vergleich zum Volllängen-Prionprotein um einen Faktor 3-4 reduziert, was auf einen dynamischeren Charakter der Helix 1 in *humPrP23-159* hindeutete.

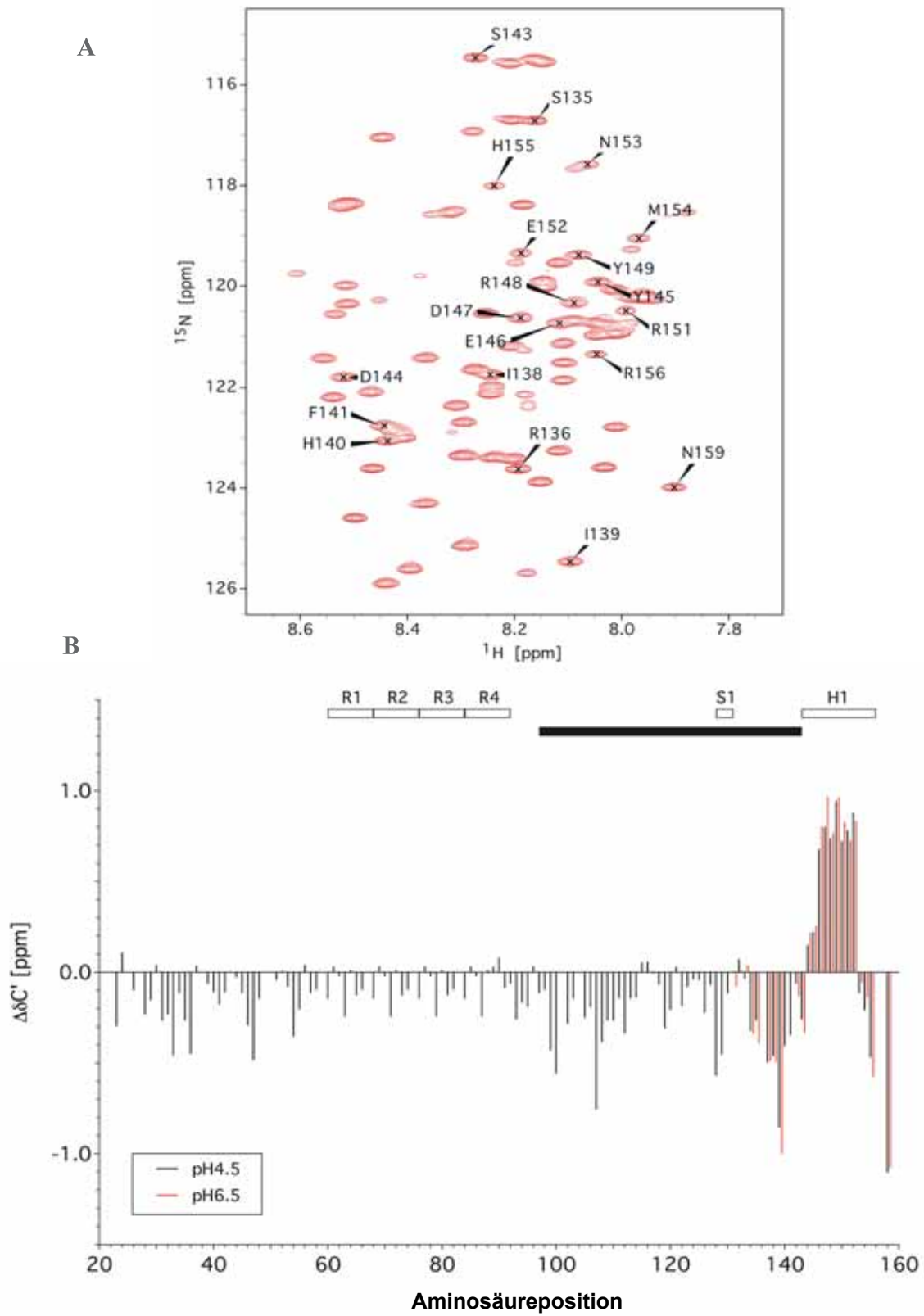


Abb. 9: NMR-Spektroskopie von monomerem *humPrP23-159* zum Nachweis der Helix 1 bei verschiedenen pH-Werten. (A) ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum von *humPrP23-159* bei pH 4.5 in 10 mM Natriumacetat. Die Zuordnung der Aminosäuren der Helix 1-Region zwischen Aminosäure 135-159 ist durch Pfeile gekennzeichnet. (B) Gemittelte ^{13}C -chemische Verschiebungen von *humPrP23-159* bei pH 4.5 (schwarz) in 10 mM Natriumacetat und pH 6.5 (rot) in 10 mM MES-Puffer. Die gemittelten Verschiebungen wurden berechnet gemäß $[\Delta\delta(\text{C}\alpha)+\Delta\delta(\text{C}')]/2$. Jeder $\Delta\delta$ -Wert entspricht der Differenz aus der chemischen Verschiebung von $\text{C}\alpha$ bzw. dem Carbonyl-Kohlenstoffatom C' in *humPrP23-159* und empirischen Werten für $\text{C}\alpha$ bzw. C' der gleichen Aminosäure in *random coils* (Schwarzinger *et al.*, 2001; Wishart *et al.*, 1994). Die offenen Balken zeigen die Position der Oktarepeat-Region (R1-R4), des β -Strand S1 (S1) und der Helix 1 (H1) an. Der ausgefüllte Balken markiert die Region PrP90-145 mit erwarteter hoher Umfaltungstendenz im PrP^C zu PrP^{Sc} (Peretz *et al.*, 1997). Die NMR-spektroskopische Vermessung und Analytik der Proteine wurde von *Lukasz Skora* und *Dr. Markus Zweckstetter* am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt.

Zwischen den beiden pH-Werten 6.5 und 4.5 konnte keine wesentliche Veränderung der Sekundärstruktur in *humPrP23-159* detektiert werden.

Die hohe Umfaltungstendenz der Region 90-145 in ein β -Faltblatt (Peretz *et al.*, 1997) im Volllängen-Prionprotein konnte durch die negativen $\Delta\delta\text{C}'$ -Werte dieser Region in *humPrP23-159* bestätigt werden (Abb. 9 B).

Interessanterweise wies das Isoleucin 139 die höchste β -Faltblatt-Tendenz in *humPrP23-159* auf. In einem Modellsystem mit rekombinanten Prionproteinen zur Simulation von Speziesbarrieren konnten die Aminosäuren 138 und 139 in der humanen, murinen und Hamster-Prionproteinsequenz als entscheidende Determinante für die Ausbildung einer Speziesbarriere ausgemacht werden (Jones *et al.*, 2005; Vanik *et al.*, 2004).

Das wichtigste Resultat der NMR-spektroskopischen Untersuchung von *humPrP23-159* war der Nachweis der Helix 1 bei pH-Werten von 6.5 und 4.5.

Die NMR-Struktur von löslichem *humPrP23-173* wurde in erster Linie zum Nachweis des β -Faltblattes und der Helix 1 angefertigt, sowie um strukturelle Unterschiede zu *humPrP23-159* aufzuzeigen.

Die Zuordnung der gemessenen Signale zu den Aminosäuren des Segmentes 135-173 erfolgte im zweidimensionalen ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum (Abb. 10 A). Die chemische Verschiebung der Aminosäuren 135-159 in der ^1H - und ^{15}N -Dimension war für *humPrP23-173* (Abb. 10 A) fast identisch zu *humPrP23-159* (Abb. 9 A). Eine eindeutige Zuordnung der Region 161-164 zu einem β -Faltblatt war aus dem ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum nicht möglich.

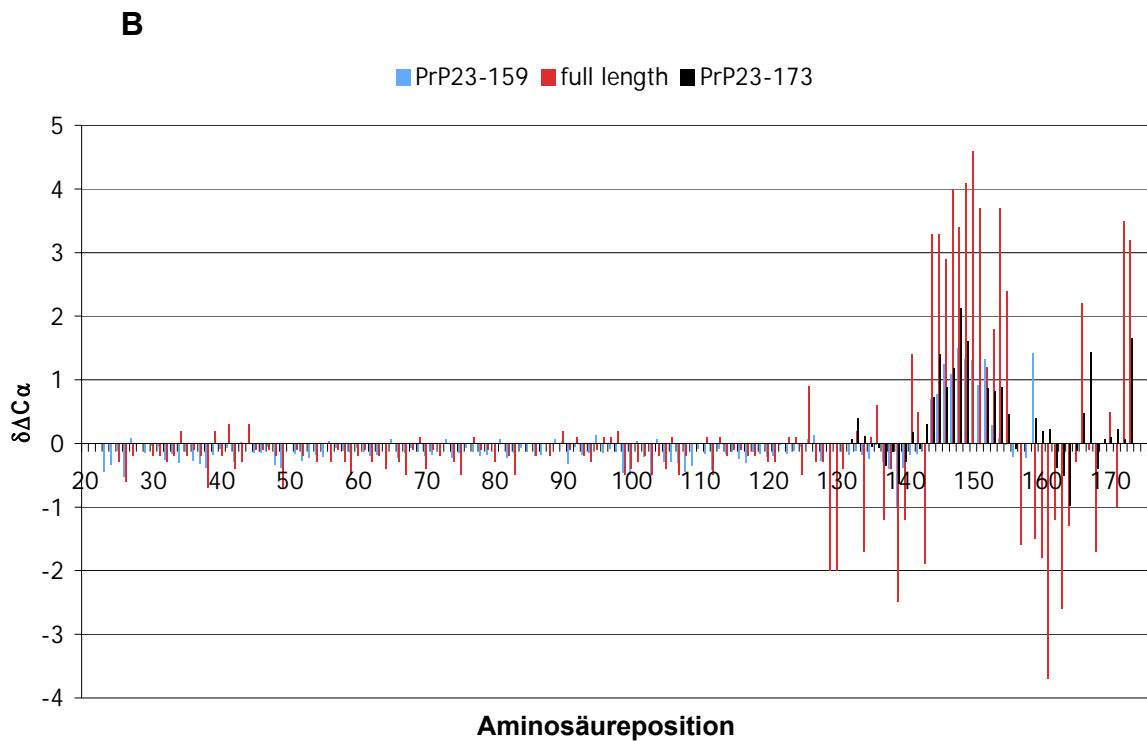
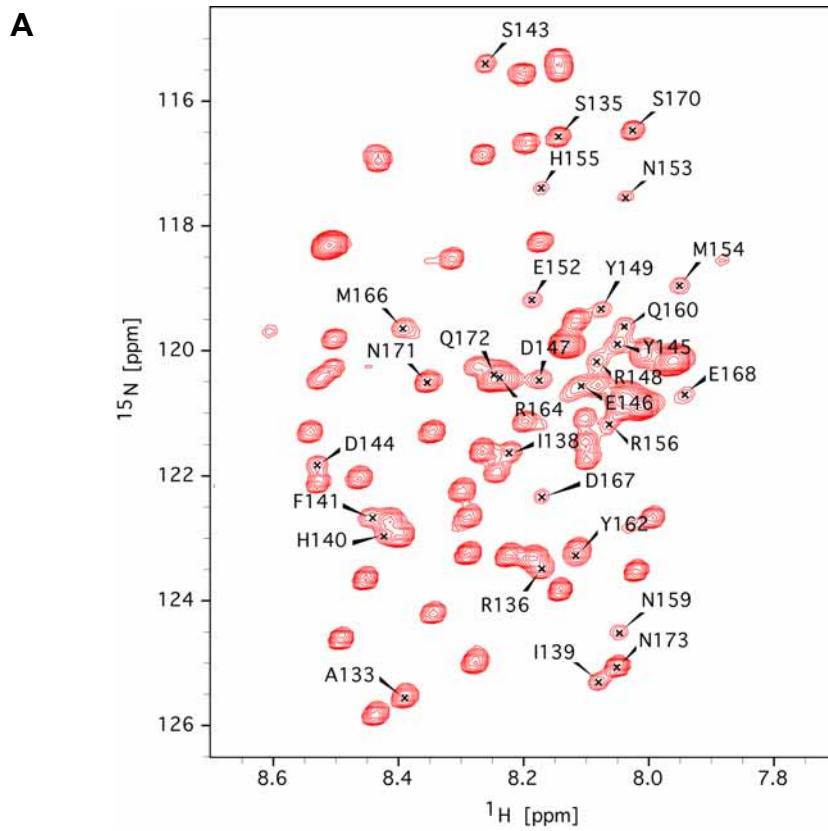


Abb. 10: NMR-Spektroskopie von *humPrP23-173* im Vergleich zu *humPrP23-159* und *humPrP23-230*. (A) ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum von *humPrP23-173* bei pH 4.5 in 10 mM Natriumacetat. Die Zuordnung der Aminosäuren der Region 135-173 ist durch Pfeile gekennzeichnet. (B) ^{13}C -chemische Verschiebungen der $\text{C}\alpha$ -Kohlenstoffatome in *humPrP23-173* (schwarz), *humPrP23-159* (blau) und *humPrP23-230* (rot) bei pH 4.5 (schwarz) in 10 mM Natriumacetat im Vergleich. Die NMR-Struktur von *humPrP23-230* war nicht Teil dieser Arbeit und wurde zum Vergleich beigefügt (Zahn *et al.*, 2000). Die Differenz der chemischen Verschiebung für die $\text{C}\alpha$ -Kohlenstoffatome in *humPrP23-173* ($\Delta\delta\text{C}\alpha$) wurde mit empirischen Werten von $\text{C}\alpha$ -Kohlenstoffatomen aus *random coils* berechnet (Wishart *et al.*, 1994). Die $\Delta\delta\text{C}\alpha$ -Werte der Aminosäuren 23-130 in *humPrP23-173* waren identisch zu den Werten in *humPrP23-159* (blau) und wurden deshalb nicht doppelt abgebildet. Die NMR-spektroskopische Vermessung und Analytik der Proteine *humPrP23-159* und *humPrP23-173* wurde von *Lukasz Skora* und *Dr. Markus Zweckstetter* am Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt.

Aus der Differenz der chemischen Verschiebungen der $\text{C}\alpha$ -Kohlenstoffatome in *humPrP23-173* zu empirischen chemischen Verschiebungen der $\text{C}\alpha$ -Atome ($\Delta\delta\text{C}\alpha$ -Werte) in *random coils* (Wishart *et al.*, 1994) konnte gezeigt werden, dass die Region 162-164 die stärkste Tendenz zur Ausbildung von β -Faltblattstruktur in *humPrP23-173* besitzt (Abb. 10 B). Im Vergleich zur NMR-Struktur von *humPrP23-230* (Zahn *et al.*, 2000) war die Tendenz der Aminosäuren 162-164 zur Ausbildung von β -Faltblattstruktur in *humPrP23-173* durchschnittlich um einen Faktor 3.5 vermindert. Die Tendenz zur Ausbildung helikaler Strukturen in den Helix 1-Segmenten von *humPrP23-173* und *humPrP23-159* war dagegen nahezu identisch (Abb. 10 B, $\Delta\delta\text{C}\alpha$ -Werte). Die Länge der Helix 1 (143-154) in *humPrP23-173* war mit zwölf Aminosäuren um eine Aminosäure zur Helix 1 im Volllängen-Prionprotein verkürzt und um drei Aminosäuren gegenüber der Helix 1 in *humPrP23-159* verlängert.

Die Charakterisierung der Prionproteinfragmente zu folgenden Ergebnissen:

Alle Prionproteinfragmente konnten in ausgezeichneter Reinheit hergestellt werden, wobei lediglich *humPrP23-173* eine Modifikation seiner Proteinsequenz durch eine mögliche Oxidation aufwies.

Strukturell konnte die Existenz der Helix 1 sowohl in *humPrP23-159* als auch in *humPrP23-173* bewiesen werden. Ebenso konnte der β -Strand S2 in *humPrP23-173* nachgewiesen werden.

3.2. Einfluss der Helix 1 auf die Aggregation des humanen Prionproteins

Nachdem die Reinheit der Prionproteinfragmente und ihre korrekte Faltung sichergestellt waren, sollte der Einfluss der Helix 1 auf die Aggregation des Prionproteins untersucht werden. Dazu sollte die Aggregation der humanen Prionproteinfragmente *humPrP23-144* und *humPrP23-159* direkt miteinander verglichen werden.

3.2.1. Nachweis von monomerem *humPrP23-144* und *humPrP23-159*

Auf Präparationsartefakten beruhende bereits vorhandene oligomere oder fibrilläre Formen der Prionproteinfragmente mussten vor dem Start der Aggregation ausgeschlossen werden. Deshalb konnten nur Proteine im monomeren Zustand untersucht und ihre Eigenschaften miteinander verglichen werden.

In dieser Arbeit wurde die kapillare Zonenelektrophorese (CZE) genutzt, um oligomere oder aggregierte Formen der Prionproteinfragmente nachzuweisen. Bei der CZE werden geladene Moleküle auf Grund unterschiedlicher Ladungszahl und Mobilität in einer englumigen Kapillare durch Anlegen einer Hochspannung voneinander getrennt. Neben der Gesamtladung des Moleküls sind die angelegte Feldstärke, die Viskosität des Mediums und der Radius des Moleküls für seine Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld entscheidend.

Da bei der CZE von *humPrP23-159* (Abb. 11 A) und *humPrP23-144* (Abb. 11 B) jeweils nur ein einzelner Peak in den Spektren zu sehen war, konnten sowohl oligomere als auch multimere Formen der Prionproteine ausgeschlossen werden. Die Retentionszeiten von *humPrP23-159* (A) und *humPrP23-144* (B) bei der CZE betragen 13.9 Minuten bzw. 15.2 Minuten. Oligomere oder aggregierte Proteine wurden bei der CZE als Spezies von geringerer elektrophoretischer Mobilität beschrieben, denen oftmals ein ungewöhnliches negatives Signal vorangeht. Die negative Peakform kann mit einer starken Adsorption von Ionen aus dem umgebenen Milieu an die Aggregate begründet werden, da es in der Umgebung der Aggregate zu einer kurzfristigen Verarmung an Ionen kommen kann (Righetti *et al.*, 2001).

Durch dynamische Lichtstreuungsexperimente (Dynamic Light Scattering) wurde der monomere Charakter der Proteine *humPrP23-144* und *humPrP23-159* bei pH 4.5 zusätzlich bestätigt (Daten nicht abgebildet).

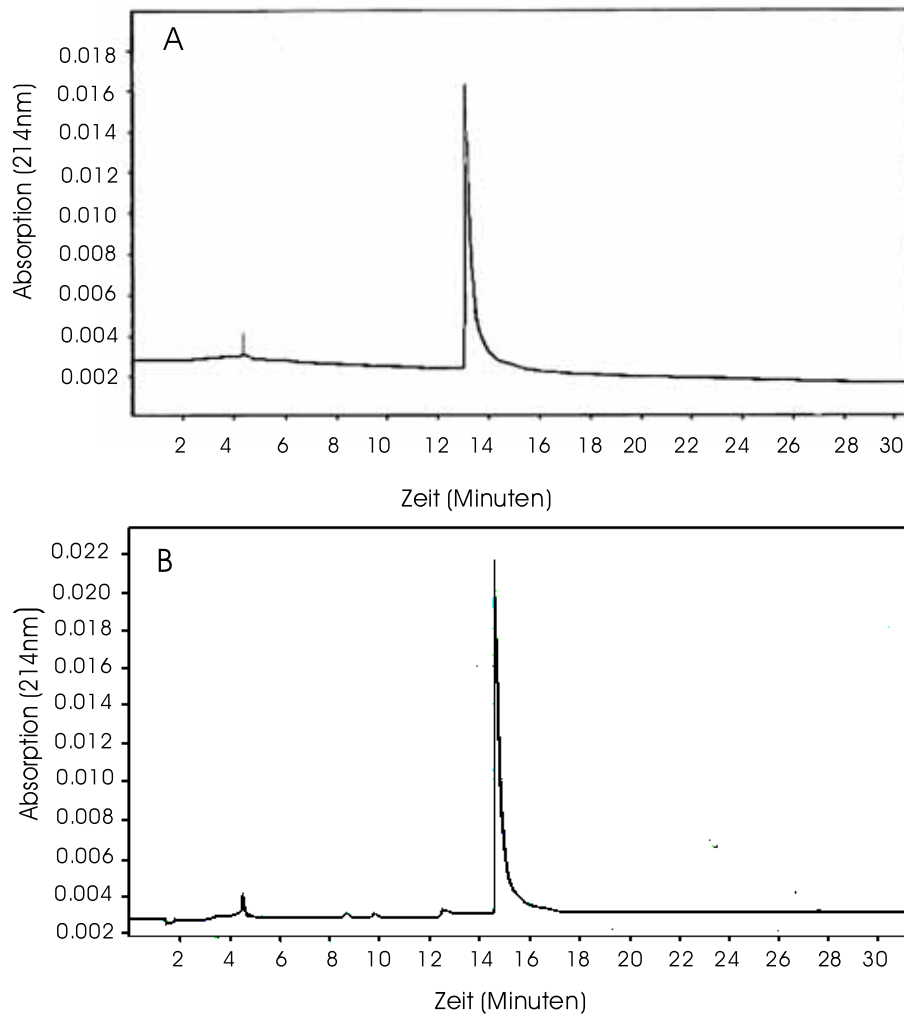


Abb. 11: Kapillare Zonenelektrophorese (CZE) von *humPrP23-144* und *humPrP23-159* als Nachweis des monomeren Zustandes. (A) *humPrP23-159* und (B) *humPrP23-144* wurden in destilliertem Wasser in einer Konzentration von jeweils 0.15 mg/ml gelöst und mittels CZE bei 12.5 kV und 25 °C in *bare fused silica* Kapillaren untersucht. Zur Unterdrückung von Adsorptionseffekten an die Kapillarinne wand wurde bei einem pH-Wert von 2.77 in einem 50 mM Aspartat-Puffer gearbeitet. Die Absorption der Proteine wurde mit einem UV-Detektor bei 214 nm verfolgt.

3.2.2. Vergleich der spontanen Aggregation von *humPrP23-159* mit *humPrP23-144*

Die Helix 1 des *humanen* Prionproteins ist eine der polarsten Helices, die innerhalb der Protein Data Base (RCSB-PDB) (Morrissey & Shakhnovich, 1999) gefunden wurde. Folglich

sollte das Helix 1-Segment in *humPrP23-159* die Löslichkeit des Prionproteinfragmentes erhöhen.

Um den Einfluss der Helix 1 auf die Aggregation des humanen Prionproteins zu verstehen, wurde die Aggregation von *humPrP23-159* mit Helix 1 und *humPrP23-144* ohne Helix 1 in Parallelversuchen miteinander verglichen (Abb. 12). *humPrP23-159* war das bislang längste unter physiologischen, nicht-denaturierenden Bedingungen untersuchte Prionproteinfragment, bei dem eine Bestimmung der Aggregationsgeschwindigkeit durchgeführt wurde. Der pH-Wert der Aggregationsversuche wurde analog zu *Kundu et al.* (2003) gewählt, der die Aggregation von *humPrP23-144* in einem physiologischen System beschrieben hatte. *humPrP23-159* und *humPrP23-144* waren in der Lage unter physiologischen Bedingungen zu aggregieren. Entgegen der Erwartung aggregierte *humPrP23-159* bei gleicher Proteinkonzentration schneller als *humPrP23-144*. Auch wiederholte Messungen bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (Abb. 12 A-C) führten zum gleichen Ergebnis. Eine Abhängigkeit der Aggregationsgeschwindigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration wurde auch durchgeführt, um ionische oder polare Wechselwirkungen mit der Reaktionsgefäßwandung (Borosilikatglass) unter Bildung von Aggregationskeimen als Ursache für das unterschiedliche Aggregationsverhalten der beiden Proteinfragmente auszuschliessen. In diesem Fall sollte die Aggregation des Prionproteins bei unterschiedlicher Proteinkonzentration durch die gebildeten Aggregationskeime nahezu gleich schnell ablaufen. Der zeitliche Unterschied der Halbwertsaggregation war bei hohen und sehr unphysiologischen Proteinkonzentrationen am geringsten ausgeprägt. Je niedriger die Proteinkonzentrationen waren, desto grösser wurde der Unterschied der Aggregationsgeschwindigkeit zwischen *humPrP23-159* und *humPrP23-144*. Bei 200 μM und 80 μM Proteinkonzentrationen betrug der zeitliche Unterschied der Halbwertsaggregation zwischen beiden Prionproteinfragmenten jeweils etwa 70 h. Bei 340 μM Proteinkonzentrationen betrug der zeitliche Unterschied der Halbwertsaggregation zwischen beiden Prionproteinfragmenten dagegen nur 12 h (Tabelle 14).

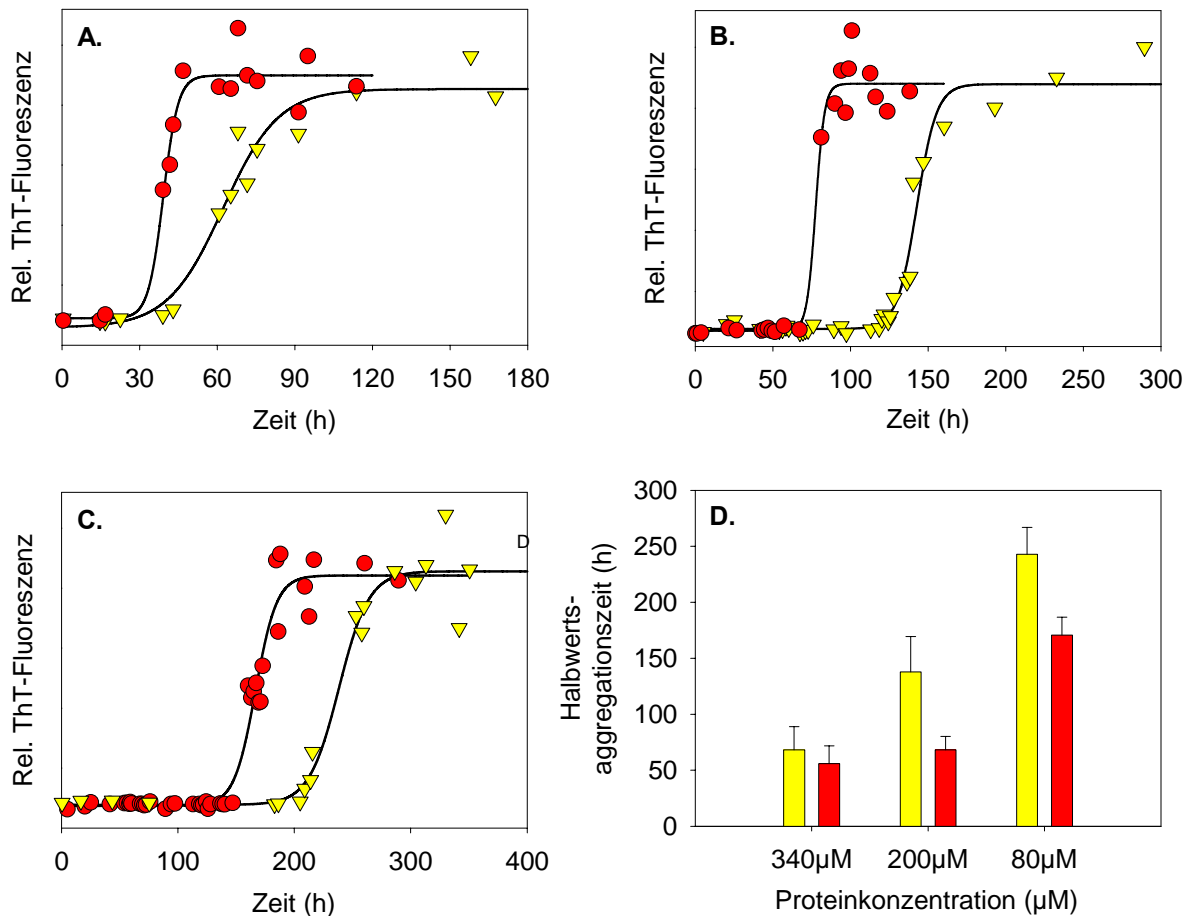


Abb. 12: *humPrP23-159* aggregiert signifikant schneller als *humPrP23-144*. Vergleich der Aggregationsgeschwindigkeiten von *humPrP23-144* (gelbe Dreiecke) und *humPrP23-159* (rote Kreise) durch Bestimmung der Thioflavin T (ThT)-Fluoreszenz in 20 mM Natriumacetat- und 20 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 6.5 bei verschiedenen Proteinkonzentrationen: (A) 340 μM Konzentrationen, (B) 200 μM Konzentrationen, (C) 80 μM Konzentrationen. (D) Vergleich der Halbwertsaggregationszeiten von *humPrP23-144* (gelbe Balken) mit *humPrP23-159* (rote Balken) aus neun unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden bei deutlich unterschiedlicher ThT-Fluoreszenz von *humPrP23-144* und *humPrP23-159* in A-C die relativen ThT-Fluoreszenzwerte angegeben.

Da die Helix 1 neun der fünfzehn Aminosäuren Differenz zwischen *humPrP23-159* und *humPrP23-144* ausmachte und das einzige nachweisbare strukturelle Element dieses Segmentes war (Abb. 9 B), lässt sich zusammenfassend sagen, dass die polare Helix 1 einen aggregationsbeschleunigenden Effekt auf das humane Prionprotein ausübt.

Tabelle 14: Halbwertsaggregationszeiten von *humPrP23-159* und *humPrP23-144* bei verschiedenen Proteinkonzentrationen unter physiologischen Bedingungen

| Proteinkonzentration (μM) | <i>humPrP23-159</i> gemittelte Halbwertsaggregationszeit (h) aus neun Experimenten plus Standardabweichung | <i>humPrP23-144</i> gemittelte Halbwertsaggregationszeit (h) aus neun Experimenten plus Standardabweichung |
|--|---|---|
| 340 μM | 56 \pm 16 | 68 \pm 21 |
| 200 μM | 68 \pm 12 | 138 \pm 32 |
| 80 μM | 171 \pm 16 | 243 \pm 24 |

3.2.3. Vergleich der Aggregation von *humPrP23-159* mit *humPrP23-144* unter Zugabe von fibrillärem Prionprotein („Seeding“)

In den Experimenten unter Zugabe von fibrillärem Prionprotein hängt der Verlauf der Aggregation nicht nur von den Eigenschaften der monomeren Proteine, sondern auch von den Eigenschaften der Aggregationskeime ab.

Ein zusätzlicher Beleg einer Beteiligung der Helix 1 an der Aggregation von *humPrP23-159* könnte erbracht werden, wenn sich der aggregationsfördernde Effekt der Helix 1 gegen die Beschleunigung der Aggregation durch die Nukleationskeime durchsetzt (Abb. 13).

Die Aggregationskeime bestanden aus jeweils fibrillärem *humPrP23-144*, *humPrP23-159* und *humPrP106-126*. Interessanterweise erfolgte die Aggregation von monomerem *humPrP23-159* mit fibrillärem *humPrP23-144* und fibrillärem *humPrP23-159* jeweils deutlich schneller als die Aggregation von monomerem *humPrP23-144* unter Verwendung der gleichen Aggregationskeime (Abb. 13 und 14). Die Halbwertsaggregationszeiten von monomerem *humPrP23-159* betragen bei Zugabe von fibrillärem *humPrP23-159* bzw. fibrillärem *humPrP23-144* 4.3 ± 0.7 h bzw. 4.7 ± 0.9 h und waren damit in beiden Fällen nahezu identisch. Die Aggregation von *humPrP23-144* zeigte bei Zugabe von fibrillärem *humPrP23-159* und fibrillärem *humPrP23-144* einen ungewöhnlichen biphasischen Verlauf. Die erste Phase bei Zugabe von fibrillärem *humPrP23-159* wies eine Halbwertsaggregationszeit von 10.9 ± 3.0 h, die Hauptphase eine Halbwertsaggregationszeit von 47.8 ± 9.5 h auf. Fibrilläres *humPrP23-144* war im Vergleich zu fibrillärem *humPrP23-159* der effizientere Nukleationskeim bei der Aggregation von monomerem *humPrP23-144*. Die Halbwertsaggregationszeit der Vorphase bei Zugabe von fibrillärem *humPrP23-144* betrug 2.7 ± 0.7 h, die der Hauptphase 10.4 ± 1.5 h (Abb. 13 + 14).

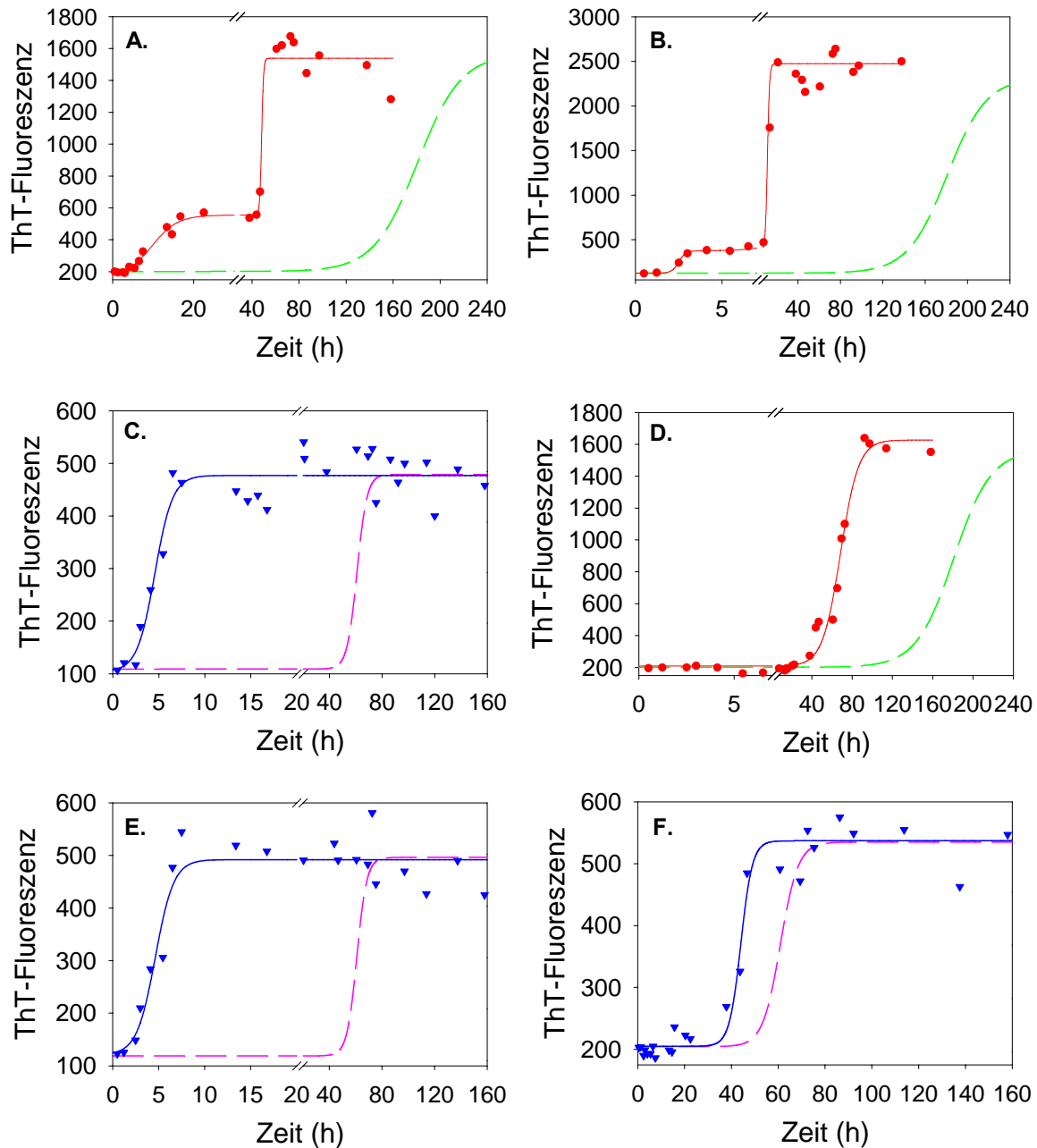


Abb. 13: Vergleich der Aggregationskinetiken von *humPrP23-159* und *humPrP23-144* bei Zugabe von fibrillärem Prionprotein (*Seeding*). Bestimmung der Aggregationsgeschwindigkeiten von je 200 μ M Proteinkonzentrationen von *humPrP23-144* (A, B, D) und *humPrP23-159* (C, E, F) bei Zugabe von fibrillärem Prionprotein. Die monomeren Proteine wurden in einem 20 mM Natriumacetat- und 20 mM Natriumphosphat-Puffer bei einem pH-Wert von 6.5 eingesetzt. Als Aggregationskeime (*Seed*) wurden jeweils 1% (v/v) fibrilläres *humPrP23-159* (A, C), fibrilläres *humPrP23-144* (B, E) oder fibrilläres *humPrP106-126* (D, F) eingesetzt. Die Zeitabhängigkeit der Aggregation des Prionproteins bei Zugabe von fibrillärem Prionprotein wurde als durchgezogene Linie bei *humPrP23-144* (rot) bzw. *humPrP23-159* (blau) dargestellt. Als direkter Vergleich wurde jeweils die Zeitabhängigkeit der Aggregation des Prionproteins ohne externe Zugabe von fibrillärem Prionprotein von *humPrP23-144* (grün) bzw. *humPrP23-159* (pink) gegenübergestellt.

Im Gegensatz zur Literatur (Kundu *et al.*, 2003) konnte gezeigt werden, dass fibrilläres *humPrP106-126* sowohl die Aggregation von monomerem *humPrP23-159* als auch von monomerem *humPrP23-144* beschleunigt. Die Halbwertsaggregationszeiten bei Aggregation von monomerem *humPrP23-144* und monomerem *humPrP23-159* mit fibrillärem PrP106-126 als Aggregationskeim betragen 71 ± 14 h bzw. 42 ± 6.3 h. Die Halbwertsaggregationszeiten von monomerem *humPrP23-144* und monomerem *humPrP23-159* ohne Zugabe von Aggregationskeimen lagen im Vergleich dazu bei 138 ± 32 h bzw. 68 ± 12 h (Abb. 14)

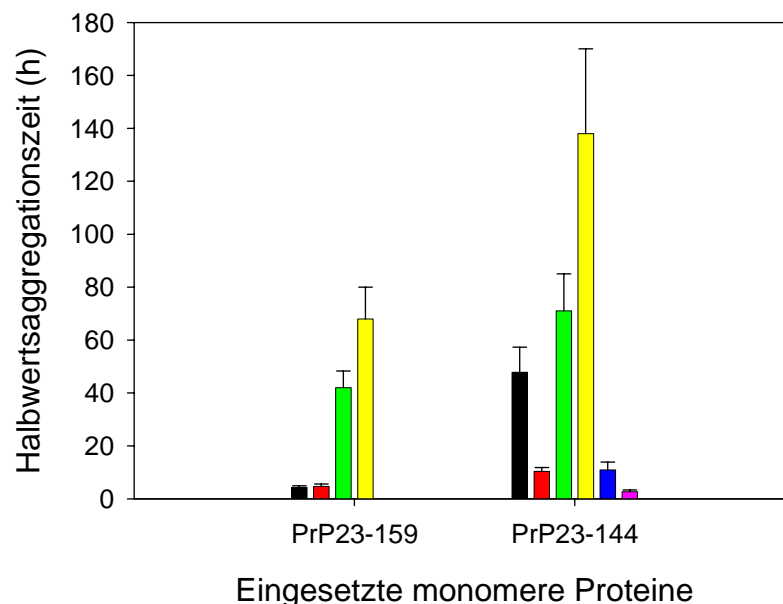


Abb. 14: Vergleich der Halbwertsaggregationszeiten von *humPrP23-159* (links) und *humPrP23-144* (rechts) bei Zugabe von fibrillären Prionproteinen (*Seeding*). Die Bestimmung der Halbwertsaggregation erfolgte jeweils aus drei unabhängigen Experimenten. Als monomere Proteine wurden *humPrP23-159* und *humPrP23-* eingesetzt. Als Aggregationskeime wurden 1% (v/v) fibrilläres *humPrP23-159* (schwarze Balken, Hauptphase), fibrilläres *humPrP23-144* (rote Balken, Hauptphase) und fibrilläres *humPrP106-126* (grüne Balken) eingesetzt. Zum Vergleich sind die Halbwertsaggregationszeiten ohne Zugabe von Aggregationskeimen abgebildet (gelbe Balken). *humPrP23-144* zeigte bei Zugabe von fibrillärem *humPrP23-144* und fibrillärem *humPrP23-159* eine Vorphase und eine Hauptphase. Die Halbwertsaggregationszeit der Vorphase von *humPrP23-144* bei Zugabe von fibrillärem *humPrP23-159* ist als blauer Balken, die Halbwertsaggregationszeit der Vorphase von *humPrP23-144* bei Zugabe von fibrillärem *humPrP23-144* ist als pinker Balken dargestellt. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Zusätzlich zu dem aggregationsfördernden Effekt der Helix 1 bei der spontanen Aggregation des Prionproteinfragmentes *humPrP23-159*, aggregierte *humPrP23-159* auch unter Zugabe

von Aggregationskeimen (*Seeding*) schneller als *humPrP23-144*, was den aggregationsfördernden Effekt der Helix 1 im humanen Prionprotein unterstützend belegte.

3.2.4. Morphologie von aggregiertem *humPrP23-159*

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass *humPrP23-144* und *humPrP23-159* unter Zugabe von Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 6.5 fibrilläre Aggregate bildeten (Abb. 15). Dabei konnten keine signifikanten morphologischen Unterschiede für die Prionproteine *humPrP23-144* und *humPrP23-159* gezeigt werden.

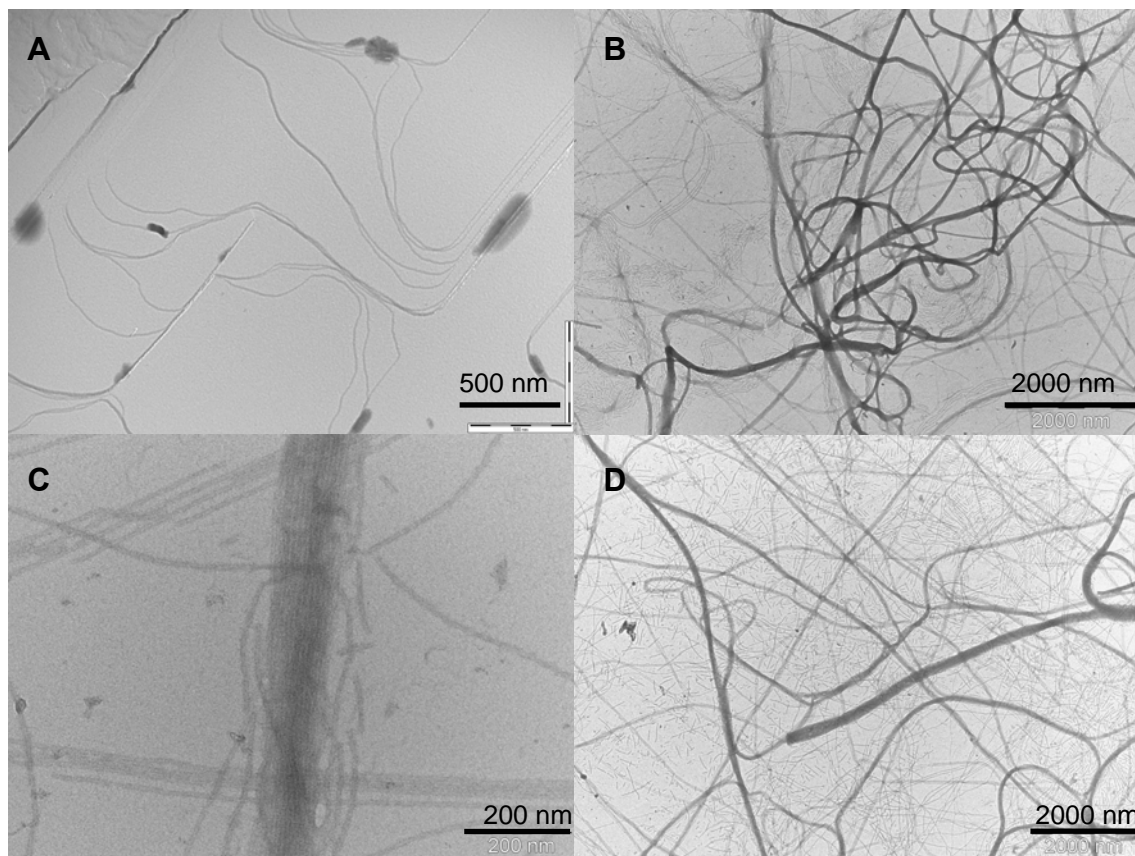


Abbildung 15: Elektronenmikroskopische Darstellung von fibrillärem *humPrP23-159* und fibrillärem *humPrP23-144*. Je 200 μ M *humPrP23-159* (C, D) und *humPrP23-144* (A, B) wurden in 20 mM Natriumphosphat und 20 mM Natriumacetat bei pH 6.5 und 25 °C zur Aggregation gebracht und nach drei Wochen elektronenmikroskopisch untersucht. Alle Proteinlösungen enthielten 0.1 % (w/v) Natriumazid. Die Kontrastierung der Aggregate erfolgte nach 20 facher Verdünnung im gleichen Puffer und Auftrag auf *Carbon coated Copper Grids* durch 2 % (w/v) Uranylacetat. Die Aufnahmen B und D wurden bei 12500 facher Vergrößerung, die Aufnahmen A und C bei 50000 facher bzw. 100000 facher Vergrößerung aufgenommen.

Beide aggregierten Prionproteinfragmente bildeten ein Netzwerk aus stark gebündelten Fibrillen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 50-70 nm, der bis auf 350 nm ansteigen konnte. Die Länge der ungerührten Aggregate betrug jeweils mehrere Mikrometer. Die einzelnen Fibrillen der Bündel wiesen für beide Proteine einen Durchmesser von 8-12 nm auf. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der literaturbeschriebenen Morphologie von fibrillärem *humPrP23-144* (Kundu *et al.*, 2003). Auffällig bei beiden Prionproteinfragmenten war die starke Neigung der Fibrillen zur parallelen Anordnung in Bündel (laterale Aggregation).

3.2.5. Proteinase K Resistenz der Helix 1 in fibrillärem *humPrP23-159*

Eine plausible Erklärung für den aggregationsbeschleunigenden Effekt von *humPrP23-159* wäre, dass Helix 1 einen fñhen Kontakt zwischen PrP-Molekülen herstellt und selbst in ein β -Faltblatt umgefaltet wird. Ein Beleg für diese Hypothese wäre eine Resistenz des Helix 1-Segmentes im fibrillären *humPrP23-159* gegenüber proteolytischem Verdau durch die Proteinase K. Im infektiösen PrP^{Sc} geht man davon aus, dass alle β -Faltblatt-haltigen Strukturen durch ihre kompakte Struktur partiell resistent gegenüber proteolytischem Abbau durch die Proteinase K werden. Der im PrP^{Sc} unstrukturierte Bereich 23-89 ist dagegen nicht vor einem Angriff durch Proteinase K geschützt (Rogers *et al.*, 1993, Flechsig *et al.*, 2000). Insofern sollte auch die Helix 1 im fibrillären *humPrP23-159* eine partielle Resistenz gegenüber Proteinase K aufweisen, falls eine Umfaltung des Helix 1-Segmentes in ein β -Faltblatt stattgefunden hat. Andernfalls würde das Helix 1-Segment durch die Proteinase K abgedaut werden.

In den fibrillären Aggregaten von *humPrP23-144* und *humPrP23-159* wurde ein proteolytischer Verdau durch die Proteinase K durchgeführt, wobei die Grösse der entstandenen Fragmente durch eine SDS-PAGE analysiert wurde. Die Resistenz bestimmter Regionen des aggregierten Prionproteins gegenüber proteolytischem Abbau wurde durch ein *Epitop-Mapping* im Western Blot überprüft (Abb. 16).

Aufgrund eines starken Schmier-Effektes der Proteinase K verdauten Prionproteinfragmente in der klassischen SDS-PAGE (Lämmli *et al.*, 1970) wurde ein spezielles SDS-PAGE System benutzt, das zur Auftrennung von A β -Peptiden mit nur einer Aminosäure Unterschied entwickelt wurde (Wiltfang *et al.*, 2001). Fibrilläre Aggregate von *humPrP23-144* und

humPrP23-159 waren selbst bei Proteinase K Konzentrationen von 100 µg/ml und einer Verdauzeit von 1 h noch resistent gegenüber proteolytischem Abbau (Abb. 16 A). Das Migrationsverhalten des Proteinase K resistenten Fragmentes von fibrillärem *humPrP23-144* in der SDS-PAGE entsprach etwa dem eines 7 kDa-Fragmentes und verhielt sich damit identisch zur Literatur (Ghetti *et al.*, 1996). Durch Vergleich mit den Markerproteinen konnte die Grösse des Proteinase K verdauten Fragmentes von fibrillärem *humPrP23-159* auf ~ 8 kDa abgeschätzt werden. Eine Erklärung für den Grössenunterschied zwischen beiden Proteinase K verdauten Fragmenten könnte in einer unterschiedlichen N- oder C-terminalen Spaltstelle der Proteinase K in den fibrillären Prionproteinen analog zu den beiden PrP^{Sc}-Spaltungstypen des infektiösen Erregers (PrP^{Sc}-Typ1 und PrP^{Sc}-Typ2, Kapitel 1.3.3.) begründet sein. Fibrilläres *humPrP23-159* könnte demnach eine PrP^{Sc}-Typ-1 Spaltstelle und fibrilläres *humPrP23-144* eine PrP^{Sc}-Typ-2 Spaltstelle aufweisen.

Um das zu überprüfen wurden Western Blots der Proteinase K resistenten Fragmente von aggregiertem *humPrP23-144* und *humPrP23-159* mit den Antikörpern 3B5 (Abb. 16 E) und 1E4 (Abb. 16 C) durchgeführt. Der Antikörper 3B5 erkennt die Aminosäuren 59-89 im Prionprotein (PrP^{Sc}-Typ 1), während der 1E4-Antikörper an das Motiv 98-109 (PrP^{Sc}-Typ 2) bindet.

Beide Proteinase K verdauten Fragmente wurden vom 3B5-Antikörper nicht erkannt, was einen PrP^{Sc}-Typ 1 ausschloss. Der 1E4-Antikörper erkannte dagegen beide Proteinase K verdauten Fragmente im Western Blot (Abb. 16 C), was einem PrP^{Sc}-Typ2 entsprechen könnte. Eine Edman-Sequenzierung der Proteinase K verdauten Aggregate von *humPrP23-144* und *humPrP23-159* konnte diese Annahme bestätigen (Abb. 16 B). Beide Fragmente starteten mit der Aminosäure 97, was exakt dem PrP^{Sc}-Typ2 entsprach. Infolge dessen sollte der beobachtete Grössenunterschied zwischen den Proteinase K verdauten Fragmenten durch einen C-terminalen Grössenunterschied zu erklären sein, welcher der Helix 1 entsprechen könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden spezifisch gegen das Helix 1-Motiv gerichtete monoklonale Antikörper 6H4 (Motiv: 144-152) und 12F10 (Motiv: 144-152) im Western Blot verwendet (Abb. 16 D). Monomeres *humPrP23-159* aber nicht die Proteinase K verdauten Prionproteinfragmente von fibrillärem *humPrP23-159* konnten durch die

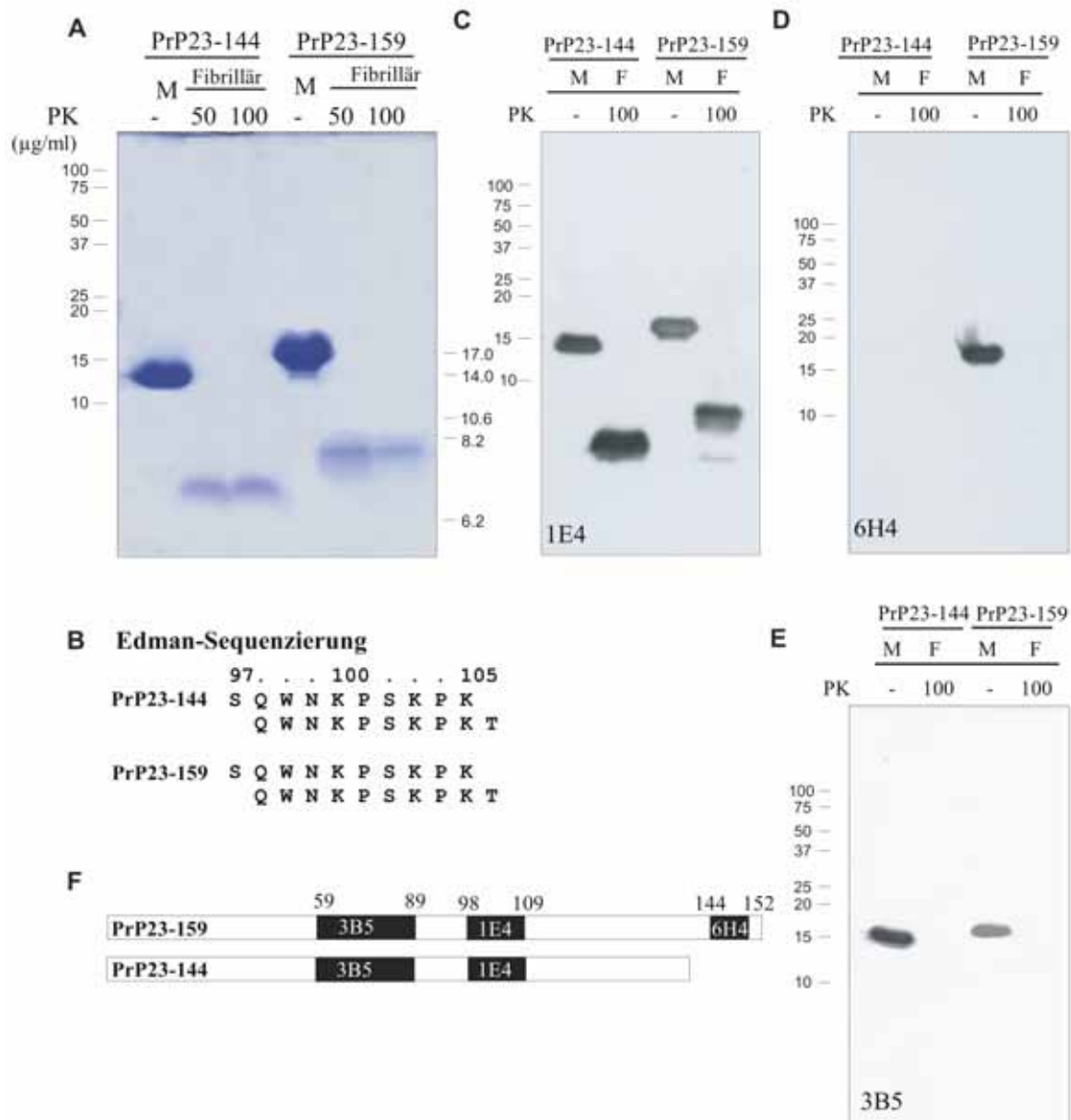


Abb. 16: Helix 1 in fibrillärem *humPrP23-159* ist nicht Proteinase K resistent. (A) SDS-PAGE von monomerem (M) und Proteinase K verdautem fibrillärem (Fibrillär) *humPrP23-144* und *humPrP23-159* bei Proteinase K Konzentrationen von 50 µg/ml und 100 µg/ml. Es wurden pro Spur je 5 µg der monomeren Proteine und je 30 µg der Proteinase K verdauten fibrillären Prionaggregate aufgetragen. (B) Edman-Sequenzierung von fibrillärem *humPrP23-144* und fibrillärem *humPrP23-159* nach Proteinase K-Verdau (1 h, 37 °C, 100 µg/ml Proteinase K). Die N-terminale Startsequenz der PK resistenten Fragmente von *humPrP23-159* und *humPrP23-144* war jeweils identisch und startete mit Aminosäure 97 bzw. 98. (C) Western Blot von monomerem (M) und fibrillärem (F) Proteinase K verdautem (100 µg/ml Proteinase K, 37 °C, 1 h) *humPrP23-144* und *humPrP23-159* mit dem Antikörper 1E4. (D) Western Blot von monomerem (M) und fibrillärem (F) Proteinase K verdautem *humPrP23-159* und *humPrP23-144* mit dem Antikörper 6H4. (E) Western Blot von monomerem (M) und fibrillärem (F) Proteinase K verdautem *humPrP23-144* und *humPrP23-159* mit dem Antikörper 3B5. (F) Schematische Übersicht über die Antikörperbindungsstellen in *humPrP23-159* und *humPrP23-144* durch die verwendeten Antikörper.

Antikörper 6H4 und 12F10 detektiert werden. Die Helix 1 war demnach nicht Proteinase K resistent. Eine Konversion der Helix 1 in ein β -Faltblatt erschien damit sehr unwahrscheinlich.

Die unterschiedliche Grösse der beiden Proteinase K verdauten Fragmente von fibrillärem *humPrP23-144* und *humPrP23-159* in der SDS-PAGE (Abb. 16 A) könnte demnach das Resultat einer C-terminalen Trunkierung von nur 1-2 Aminosäuren sein, was bereits bei A β -Fragmenten mit ähnlich differierendem Migrationsverhalten gezeigt werden konnte (Wiltfang *et al.*, 2001).

3.2.6. FTIR-spektroskopische Untersuchung der fibrillären Aggregate von *humPrP23-159* und *humPrP23-144*

Da die fehlende Proteinase K Resistenz der Helix 1 im fibrillären Prionprotein gegen eine Umfaltung des Segmentes in ein β -Faltblatt sprach, wurde eine zweite Methode zur Überprüfung der Faltung des Helix 1-Segmentes in fibrillärem *humPrP23-159* herangezogen. Eine quantitative Analyse der FTIR-Spektren (Kapitel 3.2.6.2.) von unverdauten fibrillären Aggregaten von *humPrP23-159* und *humPrP23-144* sollte Aufschluss darüber geben, ob die aus neun Aminosäuren bestehende Helix 1 (Abb. 9) in *humPrP23-159* komplett in ein β -Faltblatt umgewandelt worden ist (Abb. 17, Tabelle 15).

3.2.6.1. Zuordnung der Absorptionsbanden zu spezifischen Strukturelementen in *humPrP23-159* und *humPrP23-144*

Eine qualitative Zuordnung von FTIR-Signalen zu spezifischen Sekundärstrukturelementen im rekombinanten Prionprotein ist bereits mehrfach durchgeführt worden (Sokolowski *et al.*, 2003; Torrent *et al.*, 2004; Cordeiro *et al.*, 2005).

Die qualitative Analyse der FTIR-Spektren (Abb. 17, Tabelle 15) resultierte für *humPrP23-144* und *humPrP23-159* in Absorptionsbanden bei Wellenzahlen von 1627 cm^{-1} , 1640 cm^{-1} , 1652 cm^{-1} und 1664 cm^{-1} , die nahezu identisch zu Literatur beschriebenen Daten von fibrillärem *humPrP23-144* waren (Tabelle 15) (Kundu *et al.*, 2003). Absorptionsbanden

zwischen Wellenzahlen von 1611 cm^{-1} bis 1620 cm^{-1} in der Amid I-Region sind charakteristisch für β -Faltblätter in amyloiden Fibrillen, während Absorptionsbanden zwischen Wellenzahlen von 1630 cm^{-1} bis 1643 cm^{-1} charakteristisch für „native“ β -Faltblätter sind (Zandomenighi *et al.*, 2004). Insofern zeigten die Absorptionsbanden (Abb. 17 A-H, Tabelle 15) zwischen 1615 cm^{-1} und 1627 cm^{-1} die Anwesenheit von amyloiden β -Faltblättern in den fibrillären Proteinen an. Eine starke Absorptionsbande bei einer Wellenzahl von 1640 cm^{-1} wurde *random coil* bei 1642 cm^{-1} zugeordnet (Torrent *et al.*, 2004, Cordeiro *et al.*, 2005). Da die Region 23-96 im monomeren Prionprotein vollständig unstrukturiert ist und auch in fibrillären Prionproteinfragmenten Proteinase K-sensitiv war (Abb. 16), sollte diese Region auch im aggregierten Prionprotein noch einen sehr hohen *random coil*-Gehalt aufweisen, der in Bezug zur Länge dieser Region mehr als 50 % der Proteinsequenz in *humPrP23-159* und *humPrP23-144* ausmachte.

Ein Signal bei einer Wellenzahl von 1652 cm^{-1} wurde ebenfalls *random coil* zugeordnet, das eigentlich charakteristisch für eine α -Helix ist (Cordeiro *et al.*, 2005). Allerdings gab es in den FTIR-Spektren von monomerem *humPrP23-159* und monomerem *humPrP23-144* (Daten nicht abgebildet) jeweils keine Evidenz für die Anwesenheit einer α -Helix. Insofern wurde die Bildung α -helikaler Strukturen in den fibrillären Proteinen als sehr unwahrscheinlich angesehen. Die Summe der Absorptionsbanden für *random coils* bei 1640 cm^{-1} und 1652 cm^{-1} betrug 42 % für *humPrP23-144* bzw. 46 % für *humPrP23-159* (Tabelle 15), womit auch die fibrillären Proteine noch einen sehr hohen unstrukturierten Anteil aufwiesen.

Die bei Wellenzahlen von 1664 cm^{-1} und 1675 cm^{-1} berechneten Absorptionsbanden sind charakteristisch für *Loops* und *Turns* im Prionprotein (Bocharova *et al.*, 2005a). Eine bei 1684 cm^{-1} absorbierende Molekülschwingung wurde einer hochfrequenten Komponente eines amyloiden β -Faltblattes zugeordnet (Cordeiro *et al.*, 2005).

3.2.6.2. Quantitative Analyse der FTIR-Spektren von fibrillärem *humPrP23-159* und fibrillärem *humPrP23-144*

Die quantitative Analyse der FTIR-Daten wurde vor allem deshalb durchgeführt, um eine Aussage über die Sekundärstruktur des Helix 1-Segmentes in fibrillärem *humPrP23-159* treffen zu können. Dazu wurden beide Prionproteinfragmente *humPrP23-144* und *humPrP23-159* formal in verschiedene Sekundärstrukturbereiche eingeteilt, denen aus den FTIR-Daten

eine bestimmte Anzahl an Aminosäuren zugeteilt wurde. Wenn die Helix 1 aus neun Aminosäuren oder das ganze Helix 1-Segment aus 15 Aminosäuren, das den Unterschied zwischen *humPrP23-144* und *humPrP23-159* ausmacht, in ein β -Faltblatt umgewandelt worden wäre, sollte in beiden Fällen eine Erhöhung des β -Faltblatt-Gehaltes im Vergleich zu *humPrP23-144* zu erwarten sein. Aus der quantitativen Analyse der FTIR-Daten von fibrillärem *humPrP23-144* wurde ein Gesamtgehalt an β -Faltblatt-Struktur von 34.7 % ermittelt (Tabelle 15, Abb. 17 A), was umgerechnet 42 Aminosäuren entspricht. Wenn zusätzlich zu diesen 42 Aminosäuren in *humPrP23-159* weitere neun Aminosäuren aus der Helix 1 bzw. fünfzehn Aminosäuren des ganzen Helix 1-Segmentes in β -Faltblatt-Struktur umgewandelt worden wären, sollte ein β -Faltblatt-Gehalt von 37.3 % bzw. 41.7 % in fibrillärem *humPrP23-159* zu erwarten sein.

Tatsächlich konnte aber nur ein β -Faltblatt-Gehalt von 30.7 % in *humPrP23-159* ermittelt werden, was einer Beteiligung von ebenfalls 42 Aminosäuren an β -Faltblatt-Strukturen entspricht (Tabelle 15, Abb. 17 E). Damit war kein Unterschied an β -Faltblatt-Struktur zwischen *humPrP23-144* und *humPrP23-159* zu detektieren und eine Umfaltung der Helix 1 in ein β -Faltblatt war damit sehr unwahrscheinlich.. Umgekehrt konnten aber annähernd 63 Aminosäuren in *humPrP23-159* und nur 51 Aminosäuren in *humPrP23-144* *random coil* zugeordnet werden. Die resultierende Differenz aus zwölf Aminosäuren stimmt gut mit der aus neun Aminosäuren bestehenden Helix 1 bzw. dem Helix 1-Segment aus fünfzehn Aminosäuren überein, was als zusätzliches Indiz gewertet werden kann, dass die Helix 1 nicht in ein β -Faltblatt konvertiert worden ist.

Interessanterweise variierten die β -Faltblattgehalte von fibrillärem *humPrP23-144* stark in Abhängigkeit zum eingesetzten Aggregationskeim. Fibrilläres *humPrP23-144* war bezogen auf die Induktion von amyloiden β -Faltblättern in monomerem *humPrP23-144* der einzige effektive Aggregationskeim, während fibrilläres *humPrP23-159* und fibrilläres *humPrP106-126* zu keiner Zunahme des amyloiden β -Faltblattgehaltes verglichen mit der Aggregationen ohne Aggregationskeim führten. Dieser Effekt konnte mit monomerem *humPrP23-159* nicht gezeigt werden. Für die Plausibilität der FTIR-Daten spricht, dass die Zunahme des β -Faltblattgehaltes stets mit einer Abnahme des *random coil*-Gehaltes korrelierte.

Fibrilläres *humPrP106-126* konnte als Aggregationskeim keine „native“ β -Faltblattstruktur in *humPrP23-144* erzeugen (Abb, 17 C). Das Signal für amyloide β -Faltblattstruktur“ bei 1620 cm^{-1} war dagegen deutlich erhöht, was auf andere Eigenschaften der so entstandenen Fibrillen hindeutete.

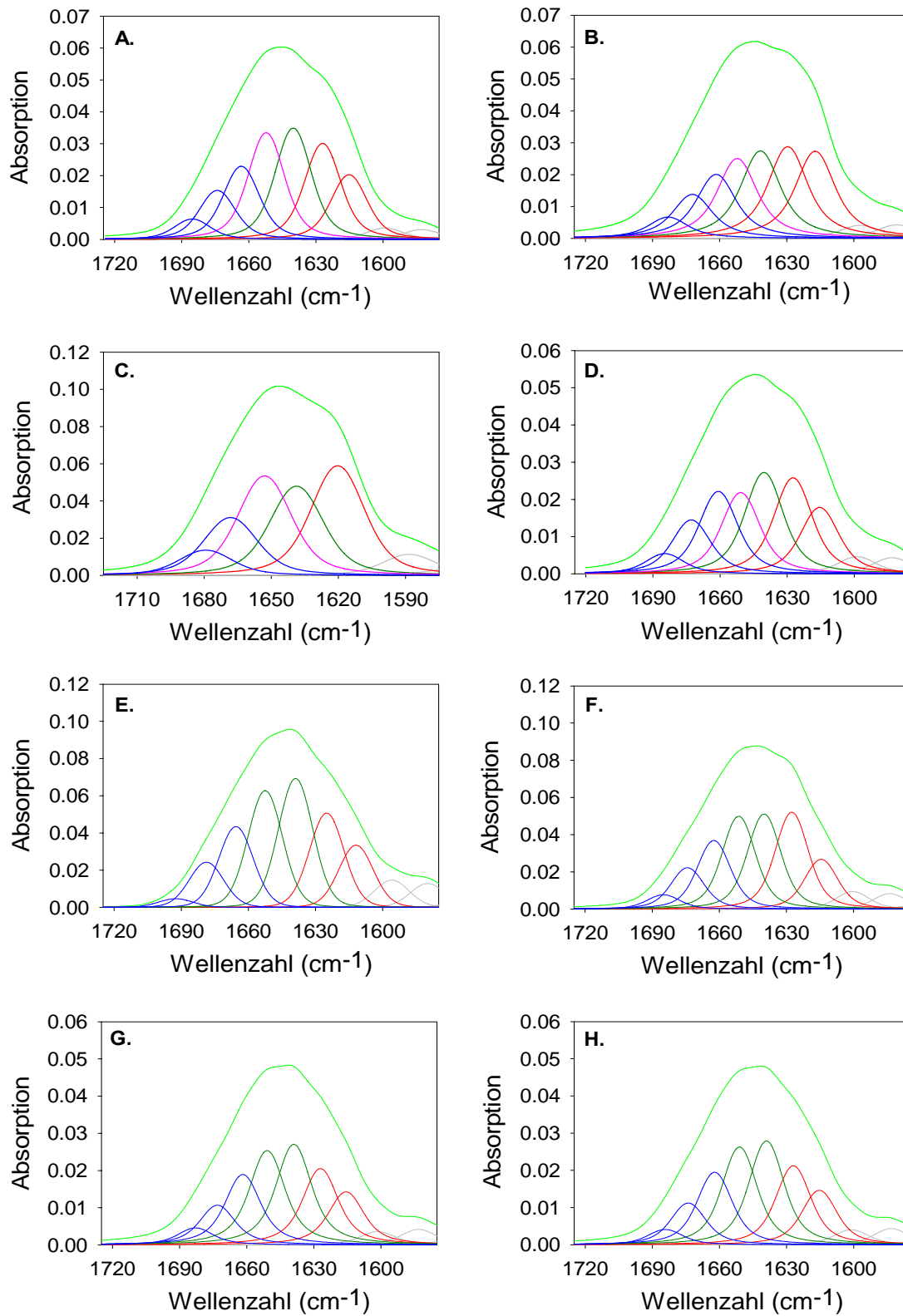


Abb. 17: FTIR-Spektroskopie von fibrillärem *humPrP23-144* (A, B, C, D) und fibrillärem *humPrP23-159* (E, F, G, H). Monomeres *humPrP23-159*, monomeres *humPrP23-144* und Natriumhydrogenphosphat, pD 6.5

wurden je dreimal aus D₂O lyophilisiert. Die Proteinaggregation erfolgte in D₂O mit 50 mM deuteriertem Natriumphosphat bei einem pD-Wert von 6.5 und 340 μM Proteinkonzentrationen innerhalb von 3 Wochen bei 25 °C. Fibrilläres *humPrP23-144* (A, B, C, D) und fibrilläres *humPrP23-159* (E, F, G, H) wurden durch Analyse der Amide I-Region (1600-1700 cm⁻¹) in D₂O mittels FTIR-Spektroskopie untersucht. Die erhaltenen Rohdaten (hellgrüne übergeordnete Linie) wurden durch das Programm „*PeakFit*“ in einzelne unter den Rohdaten abgebildete Absorptionsbanden (Peaks) (dunkelgrüne, rote, blaue und graue Linien) untergliedert. Die Aggregation von *humPrP23-159* in (E) und von *humPrP23-144* in (A) erfolgte ohne Zugabe von Aggregationskeimen. Jeweils 1% (v/v) fibrilläres *humPrP23-144* (B, F), fibrilläres *humPrP106-126* (C, G) oder fibrilläres *humPrP23-159* (D, H) wurden als Aggregationskeim zu den monomeren Proteinen gegeben. Die verwendeten Aggregationskeime wurden ebenfalls in D₂O hergestellt. Die Zuordnung der Absorptionsbanden zu bestimmten Sekundärstrukturelementen wurde durch Verwendung unterschiedlicher Farben verdeutlicht: β-Faltblätter wurden in rot, *random coils* in grün, Helices bzw. „helixartige“ Strukturen in rosa, *Loops* und *Turns* in blau, eine hochfrequente Schwingungen eines amyloiden β-Faltblattes in orange und Aminosäureseitenketten in grau dargestellt.

Elektronenmikroskopische Daten liessen dagegen keine unterschiedliche Morphologie der Proteinfibrillen im Vergleich zu fibrillären Strukturen von *humPrP23-144* erkennen, die ohne zugeführten Aggregationskeim entstanden sind.

Das wichtigste Resultat aus den FTIR-spektroskopischen Daten von fibrillärem *humPrP23-159* und fibrillärem *humPrP23-144* war, dass unter der Annahme einer vergleichbaren Struktur im fibrillären *humPrP23-144* und fibrillärem *humPrP23-159* keine der 9 Aminosäuren der Helix 1 in ein β-Faltblatt konvertiert worden sein sollte, was sehr gut mit der vergleichbaren Zunahme des *random coil*-Gehaltes in *humPrP23-159* im Vergleich zu *humPrP23-144* korrelierte.

Tabelle 15: Quantitative Analyse der FTIR-Spektren von fibrillärem Prionprotein

| Sekundärstruktur- element | | Prozentualer Anteil des Sekundärstrukturelementes | | | | |
|---|------|---|------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| | | Wellenzahl (cm ⁻¹) | ungeseedet | geseedet mit | | |
| | | | | PrP ₂₃₋₁₅₉ | PrP ₂₃₋₁₄₄ | PrP ₁₀₆₋₁₂₆ |
| <i>humPrP</i> ₂₃₋₁₅₉ | | | | | | |
| Amyloides β-Faltblatt (LF) | 1615 | 11.6 | 11.8 | 10.8 | 11.7 | |
| „natives“ β-Faltblatt | 1627 | 17.5 | 17.1 | 21.1 | 17.0 | |
| <i>random coil</i> | 1640 | 24.1 | 22.4 | 20.7 | 22.4 | |
| α-Helix* | 1652 | 21.8 | 21.1 | 20.3 | 20.9 | |
| Turn/Loop | 1664 | 15.1 | 15.6 | 15.0 | 15.6 | |
| Turn/Loop | 1675 | 8.4 | 9.0 | 9.0 | 8.7 | |
| Amyloides β-Faltblatt (HF) | 1684 | 1.6 | 3.2 | 3.1 | 3.7 | |
| <i>humPrP</i> ₂₃₋₁₄₄ | | | | | | |
| Amyloides β-Faltblatt (LF) | 1615 | 12.4 | 13.1 | 18.1 | 28.8 | |
| „natives“ β-Faltblatt | 1627 | 18.4 | 19.0 | 19.1 | (1620cm ⁻¹) | |
| <i>random coil</i> | 1640 | 21.4 | 20.0 | 17.9 | 23.4 | |
| α-Helix* | 1652 | 20.5 | 16.4 | 16.7 | 26.1 | |
| Turn/Loop | 1664 | 14.0 | 16.7 | 14.1 | 15.1 | |
| Turn/Loop | 1675 | 9.4 | 10.7 | 9.5 | - | |
| Amyloides β-Faltblatt (HF) | 1684 | 3.9 | 4.0 | 4.5 | 6.5 | |
| <p>*die Helix-artige Struktur wurde hauptsächlich dem N-terminus des Prionproteins und damit einem <i>random coil</i> zugeordnet;</p> <p>(LF) niederfrequente Schwingung, (HF) hochfrequente Schwingung in amyloiden β-Faltblättern</p> | | | | | | |

3.3. Einfluss des pH-Wertes auf die Aggregation von *humPrP23-144* und *humPrP23-159*

In den in dieser Arbeit durchgeführten Aggregationsstudien mit rekombinanten Prionproteinfragmenten und bei *Kundu et al.* (2003) wurde bei einem pH-Wert von 6.5 unter nicht-denaturierenden Bedingungen gearbeitet. Die Struktur der Aggregate war jeweils fibrillärer Natur.

Unter denaturierenden Bedingungen wurden dagegen bei sauren pH-Werten von 4.0-5.0 fibrilläre und amorphe Aggregate des Prionproteins detektiert, während bei neutralen pH-Werten keine bzw. eine stark verlangsamte Aggregation beobachtet wurde (*Morillas et al.*, 2001; *Swietnicki et al.*, 2000).

Um diesen Widerspruch aufzuklären wurde die pH-Abhängigkeit der Aggregation von *humPrP23-144* und *humPrP23-159* innerhalb eines pH-Bereiches von 4.0-8.1 unter physiologischen, nicht-denaturierenden Bedingungen untersucht.

Bei der Aggregation der Prionproteine *humPrP23-144* und *humPrP23-159* zeigte sich in verschiedenen Puffersystemen mit unterschiedlichen pH-Werten, dass beide Proteine zwischen pH-Werten von 4.0-5.0 keine Aggregationsneigung unter physiologischen, nicht denaturierenden Bedingungen aufweisen. Erst bei einem pH-Wert von 6.2 konnte für beide Proteine eine geringe Erhöhung der Absorptionen (ΔA_{400}) unter Ausbildung von fibrillären Strukturen gemessen werden (Abb. 18 C + F; Abb. 19 C + F, Abb. 21 A+B). Unter neutralen Bedingungen bei pH 7.2 zeigte *humPrP23-159* nach vergleichbarer Zeit eine deutliche verstärkte Absorption (ΔA_{400}) im Vergleich zur Aggregation bei pH 6.2. Nach 16 Tagen konnten bei pH-Werten von 7.2 und 8.1 in der stationären Phase der Aggregation von *humPrP23-159* ähnliche Absorptionen von 0.11 bzw. 0.13 gemessen werden (Abb. 19 D + E). Im Vergleich dazu wurde bei *humPrP23-144* nach 16 Tagen in der stationären Phase der Aggregation ein Absorptionenwert (ΔA_{400}) von 0.14 bei einem pH-Wert von 8.1 detektiert (Abb. 18 E), während die Absorptionenwerte bei pH-Werten von 7.2 und 6.2 nach 16 Tagen noch um einen Faktor 3.2 bzw. 3.8 reduziert waren (Abb. 18 D bzw. C).

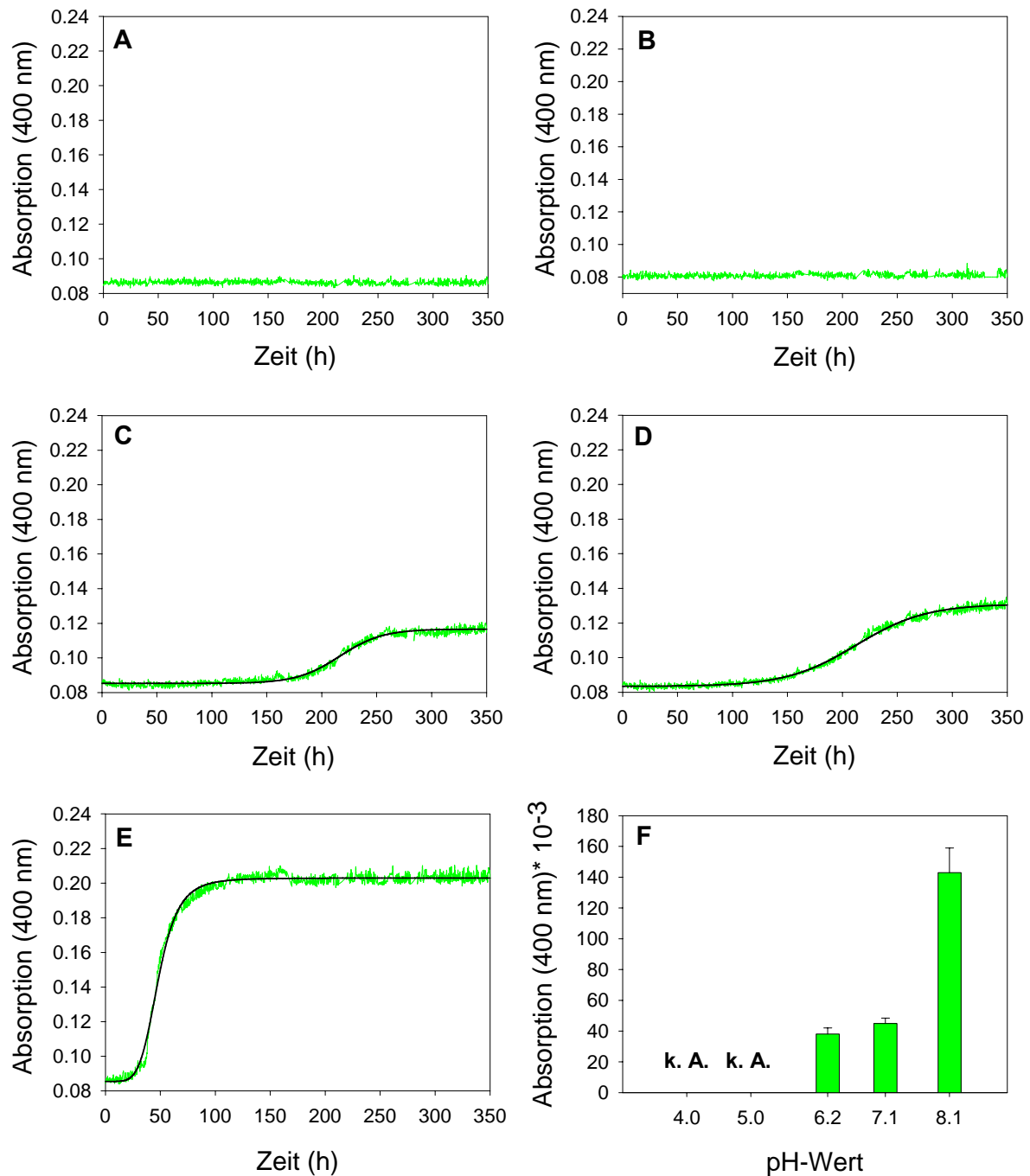


Abb. 18: Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Aggregation von *humPrP23-144*. Die Geschwindigkeit der Aggregation von *humPrP23-144* wurde kontinuierlich alle 10 Minuten durch Messung der Absorption bei 400 nm bei 30 °C im Titerplattenlesegerät Tecan Safire bestimmt. Die Proteinkonzentration betrug jeweils 200 µM. Alle Versuche wurden dreifach durchgeführt und die gemittelten Werte abgebildet. Als Puffersubstanzen dienen in (A) 50 mM Natriumacetat, pH 4.0; in (B) 50 mM Natriumacetat, pH 5.0; in (C) 50 mM MES pH 6.2; in (D) 50 mM MOPS pH 7.2 und in (E) 50 mM Tris pH 8.1. Alle Lösungen enthielten 0.1 % (w/v) Natriumazid. Ein Vergleich der Endpunkte der Absorption von *humPrP23-144* bei unterschiedlichen pH-Werten ist in (F) abgebildet. k. A. = keine detektierbaren Aggregate.

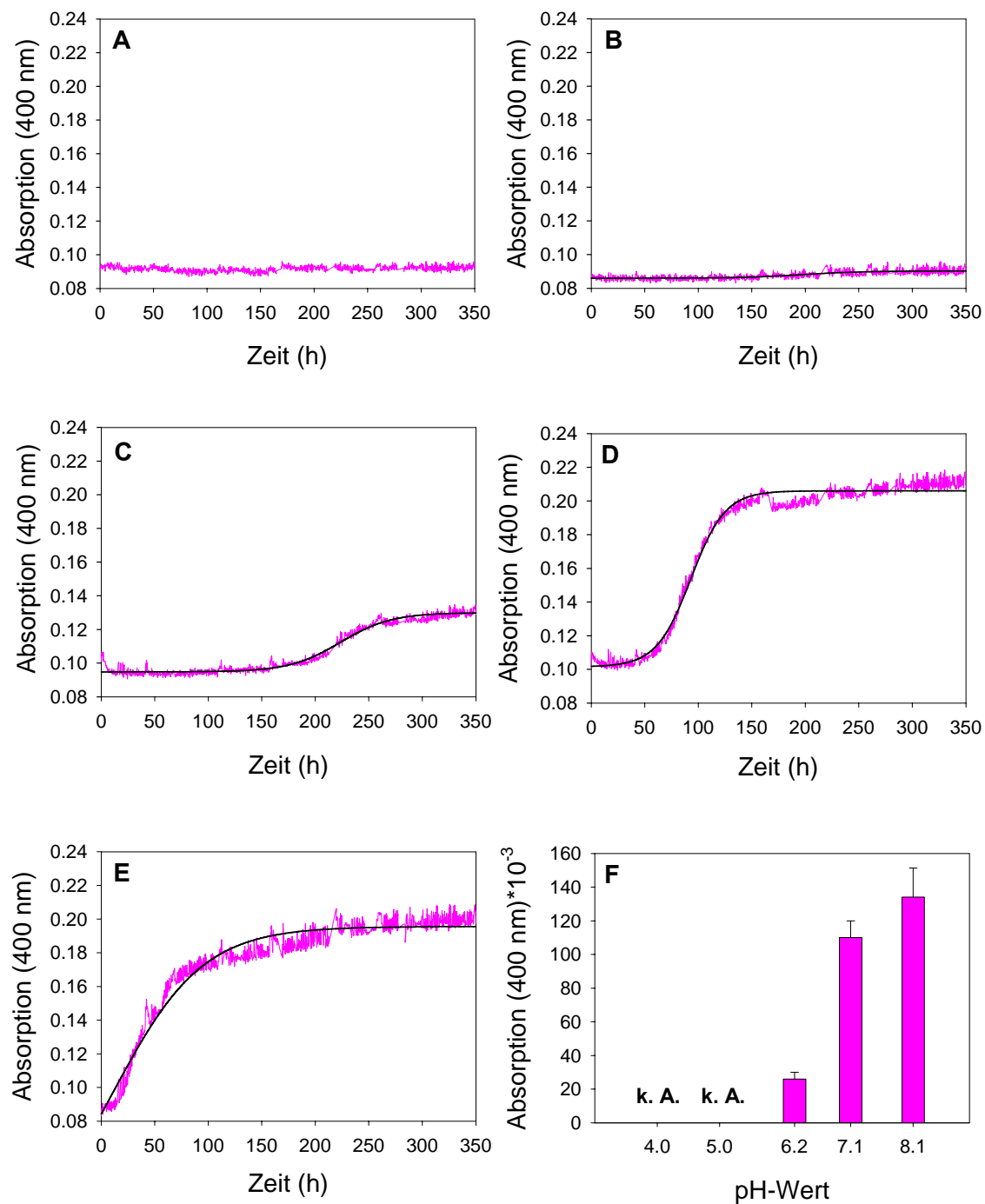


Abb. 19: Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Aggregation von *humPrP23-159* (pink). Die Geschwindigkeit der Aggregation von *humPrP23-159* wurde kontinuierlich alle 10 Minuten durch Messung der Absorption bei 400 nm bei 30 °C im Titerplattenlesegerät Tecan Safire bestimmt. Die Versuche wurden dreifach durchgeführt und die gemittelten Werte abgebildet. Die Proteinkonzentrationen betrug jeweils 200 µM. Als Puffersubstanzen dienten in (A) 50 mM Natriumacetat, pH 4.0; in (B) 50 mM Natriumacetat, pH 5.0; in (C) 50 mM MES pH 6.2; in (D) 50 mM MOPS pH 7.2; in (E) 50 mM Tris pH 8.1. Alle Lösungen enthielten 0.1 % (w/v) Natriumazid. Ein Vergleich der Endpunkte der Absorption von *humPrP23-159* bei unterschiedlichen pH-Werten ist in (F) abgebildet. k. A. = keine detektierbaren Aggregate.

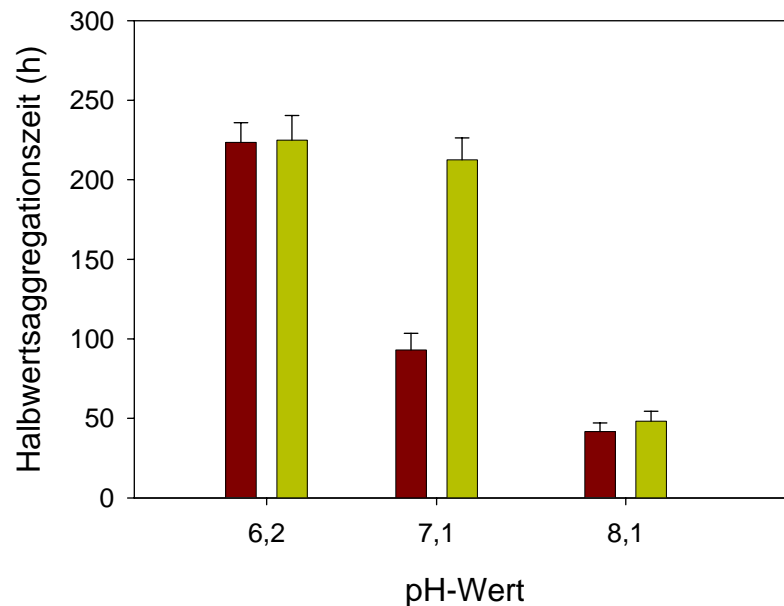


Abb. 20: Abhängigkeit der Halbwertsaggregationszeiten vom pH-Wert: *humPrP23-159* (braune Balken) und *humPrP23-144* (grüne Balken) aggregieren analog zur Veränderung der Absorption bei unterschiedlichen pH-Werten unterschiedlich schnell bei neutralem pH-Wert.

Interessanterweise korrelierten die Veränderungen der Absorptionen ($A_{400\text{nm}}$) (Abb. 18 F und 19 F) bei der Aggregation von *humPrP23-144* und *humPrP23-159* bei verschiedenen pH-Werten mit den entsprechenden Halbwertsaggregationszeiten (Abb. 20).

So konnte eine deutliche Veränderung der Halbwertsaggregationszeit um einen Faktor 4.4 bei *humPrP23-144* analog zur stärksten Veränderung der Absorptionen erst beim Übergang des pH-Wertes von 7.2 auf 8.1 gemessen werden, während sich die Halbwertsaggregationszeiten von *humPrP23-159* kontinuierlich bei beiden pH-Änderungen um einen Faktor 2.3 voneinander unterschieden.

Der wesentliche Unterschied der pH-Abhängigkeit der Aggregation von *humPrP23-144* und *humPrP23-159* war, dass bereits ein neutraler pH-Wert einen deutlichen Beschleunigungseffekt auf die Aggregation von *humPrP23-159* verglichen mit der Aggregation bei pH 6.2 ausübte, während erst ein pH-Wert von 8.1 einen vergleichbaren Effekt auf die Aggregation von *humPrP23-144* hatte (Abb. 20).

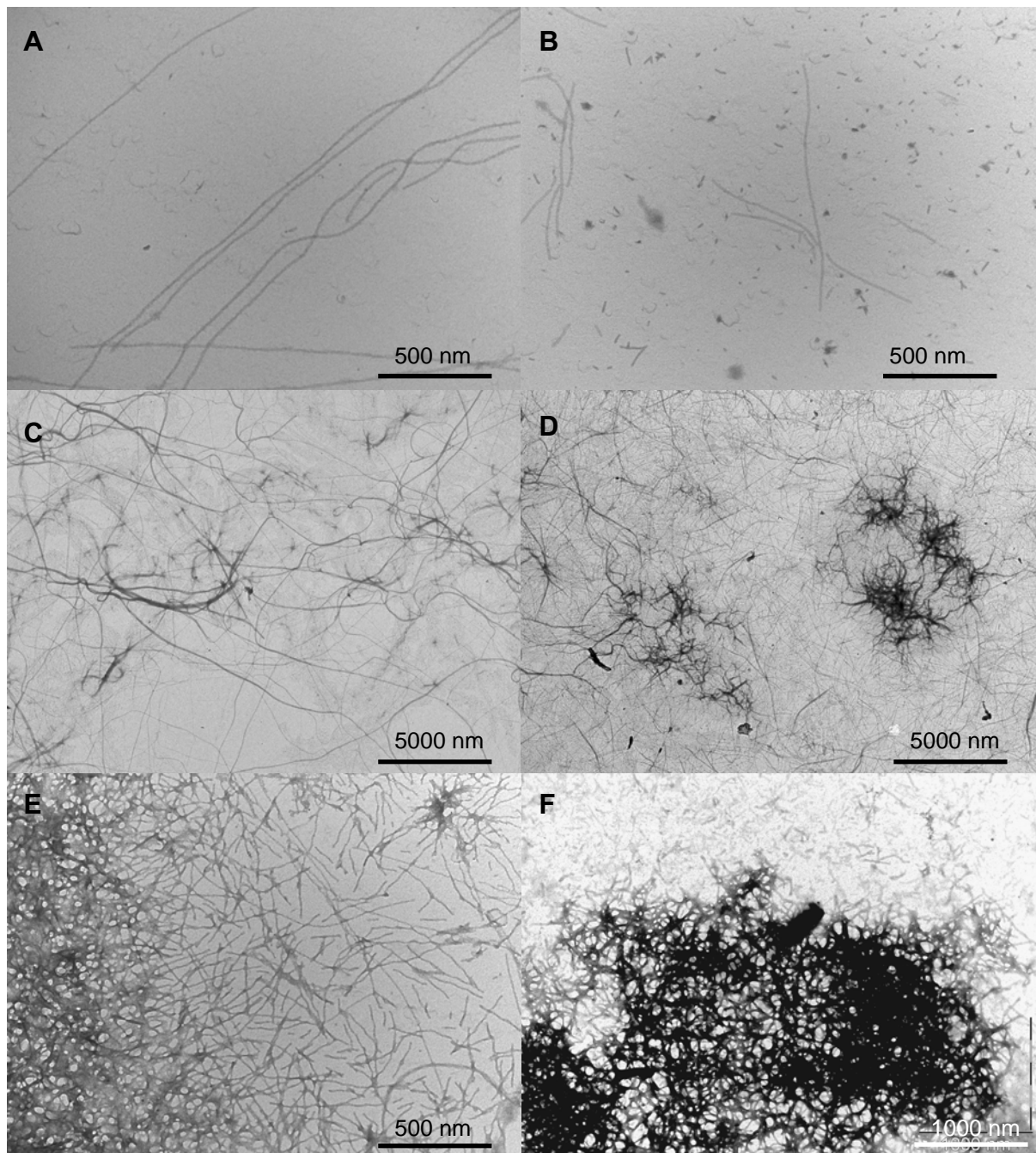


Abb. 21: Elektronenmikroskopische Darstellung von aggregiertem *humPrP23-159* und *humPrP23-144* bei unterschiedlichen pH-Werten. *humPrP23-144* (A, C, E) und *humPrP23-159* (B, D, F) wurden in einer Konzentration von je 200 μM für 16 Tage in unterschiedlichen Puffer-Systemen bei verschiedenen pH-Werten in einer Helma 96-well Quarzplatte in einem Reaktionsvolumen von 250 μl bei 30 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Alle Lösungen enthielten 0.1 % (w/v) Natriumazid. Als Puffersystem wurden verwendet: A+B: 50 mM MES, pH 6.2; C+D: 50 mM MOPS, pH 7.2; E+F: 50 mM TRIS, pH 8.1. Die Kontrastierung der Aggregate erfolgte nach 20 facher Verdünnung im gleichen Puffer und Auftrag auf *Carbon coated Copper Grids* (Plano GmbH, Wetzlar) durch 2 % (w/v) Uranylacetat. Die Aufnahmen A, B und E wurden bei 50000 facher Vergrößerung, die Aufnahmen C und D bei 5000 facher Vergrößerung und die Aufnahme F bei 25000 facher Vergrößerung aufgenommen

Mit einer zweiten unabhängigen Methode sollten die Ergebnisse zur pH-Abhängigkeit der Aggregation (Abb. 18, 19, 20) des Prionproteins bestätigt werden. Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen (Abb. 21) sollte geklärt werden, ob sich die Morphologie der Aggregate bei Variation des pH-Wertes verändert, was als Ursache für die verschiedenen Absorptionswerte bei unterschiedlichen pH-Werten herangezogen werden könnte.

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von *humPrP23-159* und *humPrP23-144* innerhalb des pH-Bereiches von 6.2-8.1 führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Morphologie der Aggregate von *humPrP23-144* und *humPrP23-159* war unter gleichen äusseren Bedingungen nahezu identisch. Einzelne PrP-Fibrillen wiesen jeweils unabhängig vom untersuchten Protein und pH-Wert einen Durchmesser von 8-12 nm auf, wobei die Länge der Fibrillen jeweils mehrere Mikrometer betragen konnte
2. pH-Wert-Änderungen von 6.2 auf 7.2 führten nicht zu einer veränderten Morphologie der Aggregate, sondern lediglich zu einer deutlichen Zunahme von fibrillären Strukturen. Bei pH-Werten von 8.1 schienen insbesondere bei *humPrP23-159* grössere Aggregate gebildet zu werden, die nur zum Teil noch eine fibrilläre Struktur aufwiesen, aber auch nicht deutlich amorpher Natur waren.
3. Die Zunahme an fibrillären Strukturen bei Zunahme des pH-Wertes korrelierte zum grössten Teil mit der Veränderung der Absorptionswerte in der stationären Phase der Aggregation bei unterschiedlichen pH-Werten. Lediglich die relativ grosse Anzahl an fibrillären Strukturen bei *humPrP23-144* bei einem pH-Wert von 7.2 im Vergleich zu pH 6.2 (Abb. 21 C) war nicht gut mit den annähernd gleichen, niedrigen Absorptionswerten nach 16 Tagen bei pH-Werten von 7.2 bzw. 6.2 zu vereinbaren.

Insgesamt konnte bei der Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Aggregation von *humPrP23-144* und *humPrP23-159* unter nicht-denaturierenden Bedingungen durch zwei verschiedene Methoden gezeigt werden, dass im Gegensatz zur pH-Abhängigkeit der Aggregation unter denaturierenden Bedingungen keine Aggregation des Prionproteins bei sauren pH-Werten von 4.0-5.0 erfolgt. Mit zunehmendem pH-Wert wurden immer mehr fibrilläre und keine amorphen Aggregate gebildet. Bereits neutralen pH-Werte führten zu einer deutlichen Beschleunigung der Aggregation von *humPrP23-159*, während *humPrP23-144* einen

vergleichbaren Effekt erst bei einem pH-Wert von 8.1 zeigte. Daraus kann geschlossen werden, dass die Helix 1 die Aggregation des Prionproteins bei neutralem pH-Wert beschleunigt.

3.4. Einfluss der N-terminalen Region des Prionproteins auf seine Aggregation

Der für die Aggregation des humanen Prionproteinfragmentes *humPrP23-159* entscheidende pH-Bereich lag im neutralen Bereich zwischen pH-Werten von 6.2-7.2. Die einzige Aminosäure mit einem pK_s -Wert der Seitenkette in der Nähe dieses pH-Bereiches war das Histidin, dessen saures N-H-Proton im Imidazolring bei einem pH-Wert von 6.0 und 25 °C zu 50 % protoniert und zu 50 % unprotoniert vorliegt.

Der N-terminale Bereich des Prionproteins 23-112 enthielt sechs von acht Histidinen bezogen auf die untersuchte Proteinsequenz in *humPrP23-159*. Deshalb wurde angenommen, dass die pH-Abhängigkeit der Aggregation des Proteinfragmentes *humPrP23-112* am stärksten ausgeprägt sein sollte. *humPrP23-112* besitzt nur positiv geladene und keine negativ geladenen Aminosäuren. Seine Nettoladung bei pH-Werten von 5.0 bzw. 7.0 beträgt +16 bzw. +10.

Analog zu *humPrP23-159* und *humPrP23-144* wurde die pH-Abhängigkeit der Aggregation von *humPrP23-112* innerhalb eines pH-Bereiches von pH 4.0-8.0 untersucht. In allen in dieser Arbeit durchgeführten Aggregationsstudien mit rekombinantem *humPrP23-112* konnte innerhalb eines pH-Bereiches von 4.0-8.1 auch unter Zugabe von 200 mM NaCl und bis zu 400 μ M Proteinkonzentrationen keine Aggregation des Proteins innerhalb von sechs Monaten erreicht werden (Daten nicht abgebildet). Üblicherweise führte eine Agitation der Proteinlösung zu einer bis zu zehnfachen Beschleunigung der Aggregation des Prionproteins (Kundu *et al.*, 2003). Auch eine für drei Wochen durchgeführte Agitation der Proteinlösungen bei unterschiedlichen Temperaturen von 25-37 °C führte zu keiner nachweisbaren Aggregation von *humPrP23-112*. Es konnte weder ein Anstieg der Thioflavin T-Fluoreszenz als Nachweis für β -Faltblatt-Strukturen noch eine Erhöhung der Absorption bei 400 nm durch gebildete lichtstreuende Aggregate festgestellt werden. Auch elektronenmikroskopisch konnten keine Aggregate von *humPrP23-112* detektiert werden.

Daraus liess sich folgern, dass der N-terminale Bereich des humanen Prionproteins ohne weitere interagierende Regionen des Prionproteins keine Aggregationsneigung aufweist.

3.5. Einfluss des β -Strands S2 auf die Aggregation des humanen Prionproteins

3.5.1. Vergleich der Aggregation von *humPrP23-173* mit *humPrP23-159*

Um die Bedeutung des β -Strands S2 für die Aggregation des humanen Prionproteins zu klären, wurde das Prionprotein *humPrP23-159* C-terminal formal um 14 Aminosäuren (Sequenz: QVYYRPMDEYSNQN) verlängert. Das resultierende Protein *humPrP23-173* wies neben der Proteinsequenz für den ersten β -Strand S1 (PrP128-131) auch die Proteinsequenz für den zweiten β -Strand S2 (PrP161-164) zur Vervollständigung des antiparallelen β -Faltblattes auf (Abb. 10). *humPrP23-173* war rückgefaltet nach Zahn *et al.* (1997) über Wochen stabil. Unter den Pufferbedingungen des Aggregationsassays analog zu *humPrP23-144* und *humPrP23-159* zeigte *humPrP23-173* die deutlich stärkste Aggregationsneigung von allen untersuchten Prionproteinen (Abb. 22 A+B).

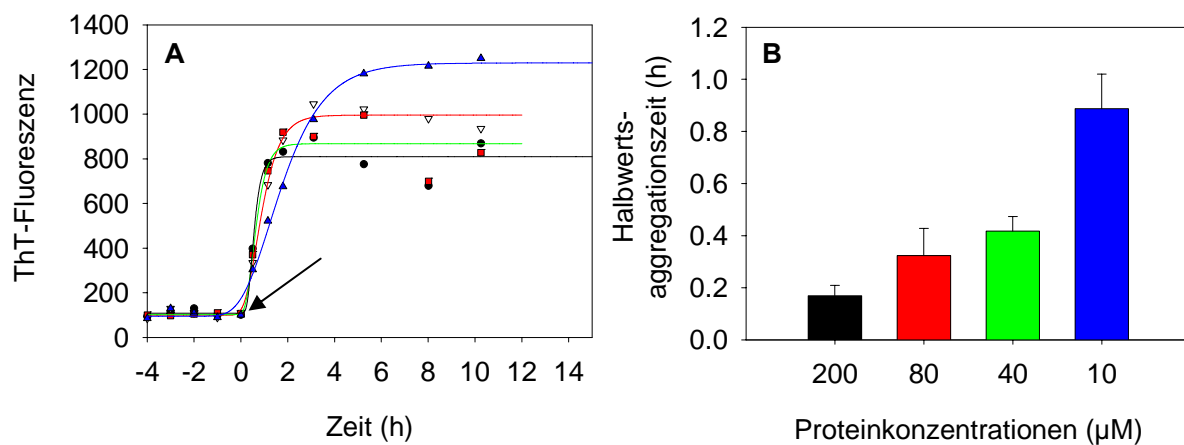


Abb. 22: Beschleunigung der Aggregation in *humPrP23-173* durch das Segment 160-173. (A) Thioflavin T Fluoreszenzassay zur Detektion von aggregiertem *humPrP23-173*. Eingesetzt wurden 200 μ M (schwarze Kreise), 80 μ M (rote Dreiecke), 40 μ M (grüne Quadrate) und 10 μ M (blaue Dreiecke) Proteinkonzentrationen in 20 mM Natriumacetat, 20 mM Natriumphosphat, pH 6.5 bei 25 °C in Borosilikatgefäßen mit Schraubverschluss. Die Zugabe des 10fach Puffers aus 100 mM Natriumacetat und 200 mM Natriumphosphat, pH 6.5 erfolgte zum Zeitpunkt „0“ (Pfeil). *humPrP23-173* war bis dahin über 24 h in 10 mM Natriumacetat, pH 6.5 stabil. (B) Vergleich der Halbwertsaggregationszeiten von *humPrP23-173* aus sechs Experimenten bei unterschiedlicher Proteinkonzentration (farbliche Zuordnung analog zu A). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Die Halbwertsaggregationszeiten für die eingesetzten Proteinkonzentrationen lagen alle unter einer Stunde und wiesen nur geringe Differenzen zueinander auf. Die Konzentrationsabhängigkeit der Aggregation war trotz der nur geringen zeitlichen Unterschiede weiterhin gegeben (Abb. 22 B). Die Halbwertsaggregationszeiten lagen für 200 μM , 80 μM , 40 μM und 10 μM Proteinkonzentrationen bei $0.17 \text{ h} \pm 0.04 \text{ h}$, $0.32 \text{ h} \pm 0.10 \text{ h}$, $0.42 \text{ h} \pm 0.06 \text{ h}$ und $0.89 \text{ h} \pm 0.13 \text{ h}$.

humPrP23-173 aggregierte bei identisch eingesetzten Proteinkonzentrationen von 200 μM bzw. 80 μM und identischen Pufferbedingungen im Vergleich zu *humPrP23-159* 400fach bzw. 812fach schneller. Das Segment 160-173 mit dem β -Strand S2 wies damit den stärksten aggregationsbeschleunigenden Effekt innerhalb der untersuchten Segmente bis PrP23-173 des humanen Prionoproteins auf.

3.5.2. Morphologie von aggregiertem *humPrP23-173*

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten in Analogie zu *humPrP23-144* und *humPrP23-159*, dass auch *humPrP23-173* bei der Aggregation fibrilläre Strukturen ausbildet (Abb. 23).

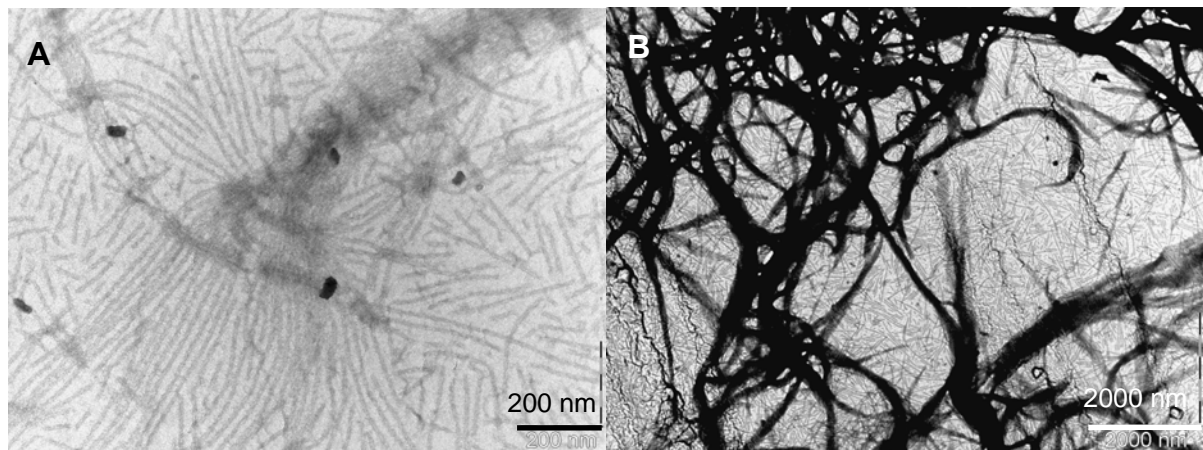


Abb. 23: Elektronenmikroskopische Darstellung von fibrillärem *humPrP23-173*. (A) 80 μM Konzentrationen von *humPrP23-173* wurden in 20 mM Natriumphosphat und 20 mM Natriumacetat bei pH 6.5 und 25 °C zur Aggregation gebracht. Die Kontrastierung der drei Wochen alten Aggregate erfolgte nach 8facher Verdünnung im gleichen Puffer und Auftrag auf *Carbon coated Copper Grids* durch 2 % (w/v) Uranylacetat. Die Aufnahme A wurde bei 80000 facher Vergrößerung Aufnahme B bei 10000 facher Vergrößerung aufgenommen.

Dabei wies aggregiertes *humPrP23-173* keine signifikanten morphologischen Unterschiede zu *humPrP23-144* und *humPrP23-159* auf. Auch *humPrP23-173* bildete ein Netzwerk aus stark gebündelten Fibrillen mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 50-70 nm aus, das bis auf 300 nm ansteigen konnte. Die Länge der Aggregate konnte bis auf mehrere Mikrometer ansteigen. Die einzelnen Fibrillen der Bündel wiesen einen Durchmesser von 8-12 nm auf. Auch *humPrP23-173* zeigte eine auffällige Tendenz zur lateralen Aggregation zu grossen Bündelstrukturen.

3.5.3. Proteinase K Resistenz des β -Strands S2 und der Helix 1 in fibrillärem *humPrP23-173*

Das Segment 160-173 des humanen Prionproteinfragmentes *humPrP23-173* mit dem β -Strand S2 führte zu einer sehr starken Beschleunigung der Aggregation des Proteins. Damit war annähernd das komplette im PrP^{Sc}-Strukturmodell umfaltende Segment 90-175 in *humPrP23-173* enthalten (Govaerts *et al.*, 2004). Nach dem Modell wäre zu erwarten, dass die Region 90-173 in eine linksgewundene parallele β -Helix umfaltet, die relativ stabil gegenüber proteolytischem Verdau durch die Proteinase K sein sollte. Die Helices 2 und 3 sind gemäss der bekannten PrP^{Sc}-Strukturmodelle für die Konversion des Prionproteins nicht bedeutsam (Govaerts *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 1996; DeMarco & Daggett, 2004). Durch einen Proteinase K-Verdau von fibrillärem *humPrP23-173* sollte das PrP^{Sc}-Strukturmodell überprüft werden. Falls nur die Region 90-175 für die Umfaltung des zellulären Prionproteins in die Proteinase K-resistente PrP^{Sc}-Form verantwortlich sein sollte, dann würde das rekombinante fibrilläre PrP23-173 zumindest eine deutlich höhere Proteinase K Resistenz als das fibrilläre *humPrP23-144* und *humPrP23-159* aufweisen.

In der SDS-PAGE von Proteinase K verdautem fibrillärem *humPrP23-173* wurden zwei Fragmente mit einem Molekulargewicht von etwa 8 kDa bzw. 6-7 kDa sichtbar, die eine Grösse vergleichbar zu Proteinase K verdautem *humPrP23-159* bzw. *humPrP23-144* aufwiesen (Abb. 24 A).

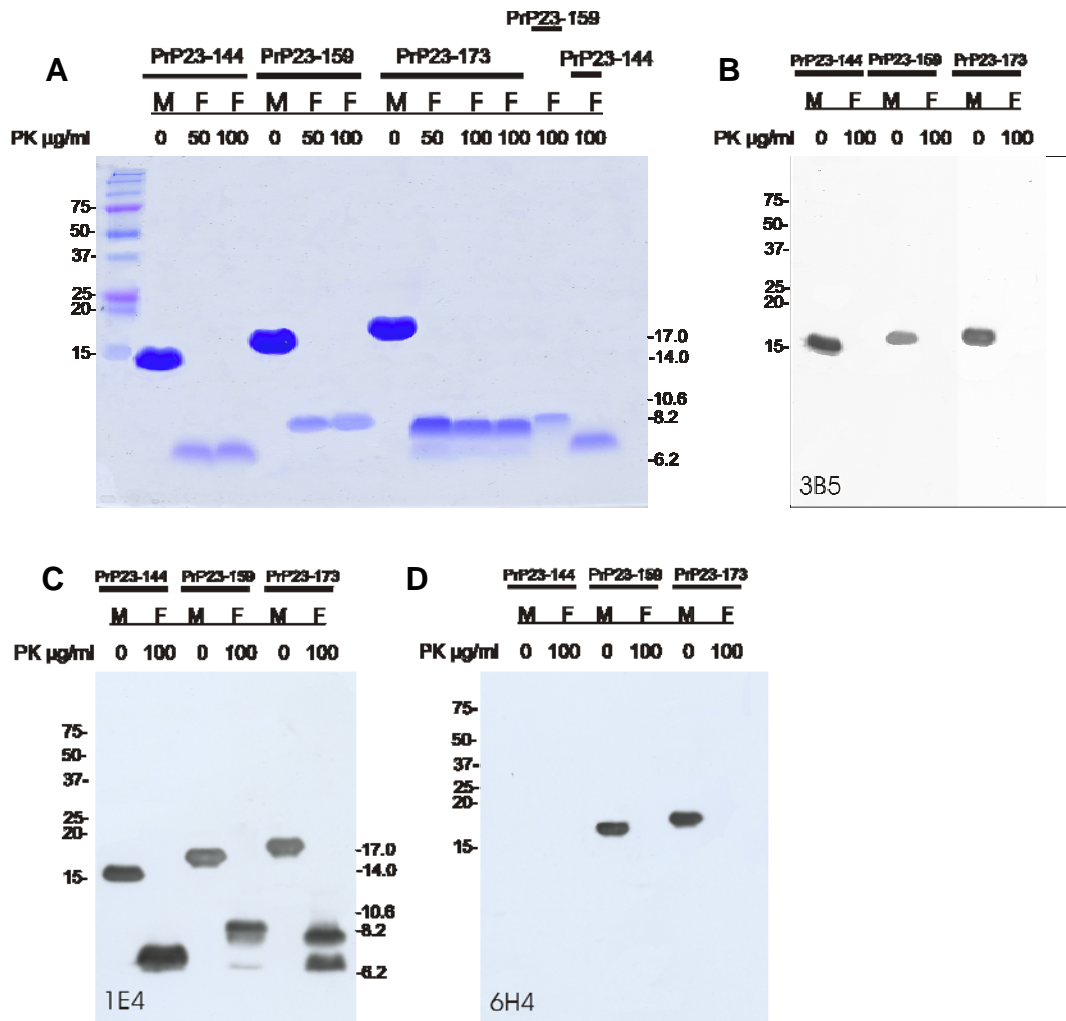


Abb. 24: Überprüfung der Proteinase K Resistenz des β -Strand S2 und der Helix 1 in fibrillärem *humPrP23-173*. (A) SDS-PAGE von monomerem (M) und Proteinase K verdaulichem fibrillärem (Fibrillär) *humPrP23-144*, *humPrP23-159* und *humPrP23-173* bei Proteinase K Konzentrationen von $50 \mu\text{g/ml}$ und $100 \mu\text{g/ml}$ in einer speziellen SDS-PAGE, die für die Auftrennung von A β -Peptiden mit nur einer Aminosäure Unterschied entwickelt wurde (Wiltfang *et al.*, 2001). Die aufgetragenen Proteinmengen pro Spur betragen je $5 \mu\text{g}$ der monomeren Proteine und je $30 \mu\text{g}$ der Proteinase K verdaulichem fibrillären Prionaggregate. (B) Western Blot von monomerem (M) und fibrillärem (F) Proteinase K verdaulichem ($100 \mu\text{g/ml}$ Proteinase K, 37°C , 1 h) *humPrP23-144*, *humPrP23-159* und *humPrP23-173* mit dem Antikörper 3B5 (C) Western Blot von monomerem (M) und fibrillärem (F) Proteinase K verdaulichem *humPrP23-173*, *humPrP23-159* und *humPrP23-144* mit dem Antikörper 1E4. (D) Western Blot von monomerem (M) und fibrillärem (F) Proteinase K verdaulichem *humPrP23-144*, *humPrP23-159* und *humPrP23-173* mit dem Antikörper 6H4. Nur monomeres *humPrP23-173* und monomeres *humPrP23-159* wurden vom 6H4 Antikörper erkannt.

Western Blots der Proteinase K verdauten fibrillären Strukturen von *humPrP23-173* mit den Antikörpern 3B5 (Motiv 59-89) (Abb. 24 B) und 1E1 (Motiv 98-109) (Abb. 24 C) zeigten, dass die N-terminale Startsequenz des Proteinase K resistenten Fragmentes von *humPrP23-173* zwischen den Bindungsmotiven der beiden Antikörper 1E4 und 3B5 analog zu *humPrP23-159* und *humPrP23-144* lag. Ein zum PrP^{Sc}-Typ 1 analoges Spaltungsmuster konnte auch hier ausgeschlossen werden (Abb. 24 B, C). Das aus der SDS-PAGE (Abb. 24 A) durch Vergleich mit dem Laufverhalten der Markerproteine abschätzbare Molekulargewicht des Proteinase K resistenten Fragmentes von *humPrP23-173* schien dem Molekulargewicht von Proteinase K verdaulichem *humPrP23-159* zu entsprechen.

Durch Western Blots mit dem an die Helix 1 Region bindenden Antikörper 6H4 (Motiv 144-152) konnte gezeigt werden, dass Proteinase K verdautes fibrilläres *humPrP23-173* kein Helix 1-Segment und auch keinen β -Strand S2 mehr enthält (Abb. 24 D).

Ein Fragment von der Grösse des Segmentes 160-173 (1.8 kDa) konnte in der SDS-PAGE (Abb. 24 A) nicht detektiert werden.

Neben dem qualitativen Nachweis der Helix 1 und des Segmentes 160-173 mit dem β -Strand S2 in den Proteinase K verdauten Prionproteinfragmenten wurde auch eine quantitative Analyse der Proteinase K verdauten Fragmente durchgeführt (Abb. 25). Die Annahme bei der Berechnung der Stoffmengenkonzentration war, dass das Proteinase K-resistente Fragment von fibrillärem *humPrP23-144* der Region 97-144 und die Proteinase K verdauten Fragmente von fibrillärem *humPrP23-159* und *humPrP23-173* jeweils der Region 97-146 entsprechen. Nach chromatographischer Aufreinigung der Fragmente ergab eine Proteinkonzentrationsbestimmung aus drei unabhängigen Experimenten ein molares Verhältnis von etwa **5 : 1 : 2.5** für *humPrP23-144* : *humPrP23-159* : *humPrP23-173*. Es ist anzumerken, dass auch ein hypothetisch Proteinase K-resistenter Bereich der Aminosäuren 97-159 in fibrillärem *humPrP23-159* und *humPrP23-173* die vorhandene Tendenz nur noch verstärkt hätte. Es würde sich ein molares Verhältnis von etwa **7 : 1 : 2.5** für *humPrP23-144* : *humPrP23-159* : *humPrP23-173* ergeben. Die eingesetzten Stoffmengenkonzentrationen der fibrillären Prionproteinaggregate für den Proteinase K-Verdau waren jeweils identisch. Danach war die Region 97-144 bezogen auf die eingesetzten Proteinmengen das gegen die Proteinase K deutlich resistenteste Fragment. Eine Verlängerung der Proteinsequenz von *humPrP23-144* um das Helix 1-Segment reduzierte die Proteinase K Resistenz der gebildeten fibrillären Aggregate von *humPrP23-159* im Vergleich zu fibrillärem *humPrP23-144* deutlich. Eine weitere Verlängerung der Proteinsequenz von *humPrP23-159* um das Segment 160-173

mit dem β -Strand S2 führte dagegen zu einer Erhöhung der Proteinase K Resistenz im Vergleich zu fibrillärem *humPrP23-159*, ohne jedoch die Resistenz von fibrillärem *humPrP23-144* gegenüber proteolytischem Abbau zu erreichen.

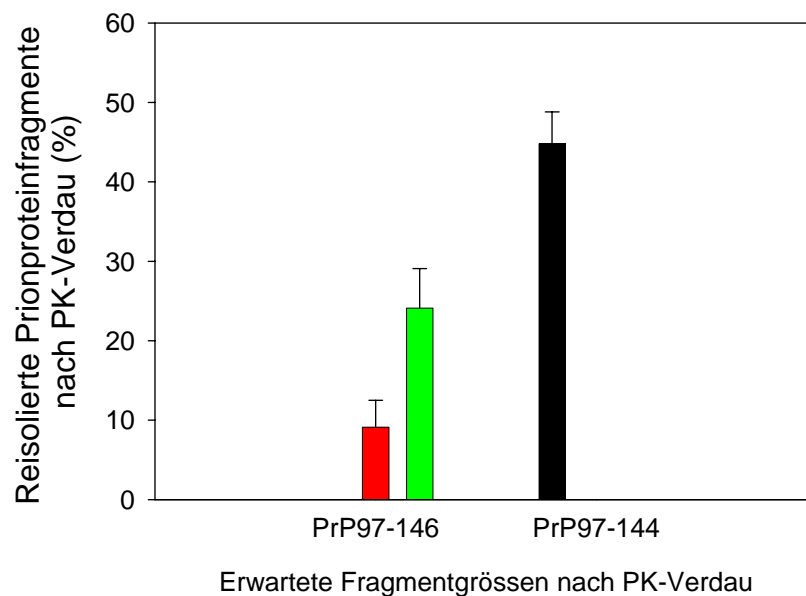


Abb. 25: Quantitative Analyse der Proteinase K (PK)-verdauten fibrillären Prionproteine. Je 0.2 μ mol der fibrillären Prionproteine *humPrP23-144* (schwarz), *humPrP23-159* (rot) und *humPrP23-173* (grün) wurden für je 1 h, 37 °C mit 100 μ g/ml Proteinase K bei 1400 rpm im Eppendorf-Thermoshaker verdaut und anschliessend chromatographisch reisoliert. Die Balken geben die reisolierten Stoffmengenkonzentrationen in Prozent relativ zur eingesetzten Stoffmengenkonzentration an. Die Berechnung der Stoffmengenkonzentration basierte für *humPrP23-159* und *humPrP23-173* auf einer Fragmentgrösse (PrP97-146), die auf der Edman-Sequenzierung von *humPrP23-144* und *humPrP23-159* (Abb. 16 B) und einer Grössenabschätzung der Proteinase K verdauten Fragmente aus der SDS-PAGE (Abb. 24 A) beruhte. Die Fragmentgrösse von Proteinase K verdautem *humPrP23-173* wurde basierend auf dem N- und C-terminalen Epitop-Mapping bei identischem Laufverhalten als identisch zu Proteinase K verdautem *humPrP23-159* angenommen.

Zusammenfassend konnte als Ergebnis des Proteinase K-Verdau von fibrillärem *humPrP23-173* gezeigt werden, dass die Proteinase K verdauten Fragmente von fibrillärem *humPrP23-159* und fibrillärem *humPrP23-173* eine wahrscheinlich sehr ähnliche oder identische Proteinsequenz aufweisen. Durch einen Verdau des Helix 1-Segmentes in *humPrP23-173* wurde auch die Region 160-173 vom Rest des Moleküls abgespalten. Eine Aussage über die Proteinase K Resistenz des Segmentes 160-173 in *humPrP23-173* ist aufgrund der geringen Grösse des Spaltfragmentes und einem Fehlen von spezifischen Antikörpern gegen diese

Region unsicher. Die Anwesenheit des β -Strands S2 führte nicht zu einer ähnlich hohen Proteinase K Resistenz der kompletten Region 90-173 wie im pathologischen Prionprotein. Allerdings führte die Existenz der Region 160-173 zu einer Erhöhung der Proteinase K Resistenz der Region 97-146 in *humPrP23-173* gegenüber *humPrP23-159*, womit offensichtlich nicht alle Proteinaggregate trotz gleicher Fragmentlänge eine identische Resistenz gegenüber proteolytischem Verdau aufweisen.

Eine massenspektrometrische Analyse der Proteinase K verdauten Fragmente war aufgrund ihrer Unlöslichkeit unter nicht-denaturierenden Bedingungen nicht möglich.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem physiologischen Konversionsassay der Einfluss der Helix 1 und des β -Faltblattes auf die Aggregation des Prionproteins untersucht. In der folgenden Diskussion werden die Bedeutung physiologischer Bedingungen für die Umfaltung des Prionproteins, der Einfluss des pH-Wertes, der Mechanismus der Umfaltung und die aus den hier erzielten Ergebnissen abgeleitete Struktur des pathologischen Prionproteins dargestellt.

4.1. *In vitro* Modell zur Simulation konformativer Änderungen des humanen Prionproteins in seine pathologische Isoform

Zur Simulation der Konversion des Prionproteins in seine pathologische Isoform wurde in der Vergangenheit fast ausschliesslich unter denaturierenden Bedingungen gearbeitet. Dadurch sollten hohe Aktivierungsenergien bei der Bildung von PrP^{Sc}-ähnlichen Aggregaten reduziert und die Konversion des Prionproteins in eine β -Faltblatt-reiche amyloide Struktur beschleunigt werden. Da das Volllängen-Prionprotein unter nativen Bedingungen bisher nicht unter Bildung fibrillärer Strukturen aggregierte, war die Frage, ob eine Umfaltung des Prionproteins unter nativen Bedingungen prinzipiell möglich sei.

Ein generelles Problem beim Arbeiten unter denaturierenden Bedingungen ist die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da die Minderung der Konversionsbarriere für die Umfaltung des Prionproteins auf prinzipiell unterschiedlichen Wegen erreicht werden kann. Nach *Morillas et al.* (2001) und *Swietnicki et al.* (2000) wurde ein nativ gefaltetes Prionprotein durch Zugabe von denaturierenden Agenzien partiell entfaltet. Alternativ sollte ausgehend von vollständig denaturiertem Prionprotein eine vergleichbare partielle Faltung durch ein Verdünnen des Denaturierungsmittels erreicht werden (*Bocharova et al.*, 2005b; *Breydo et al.*, 2005). Dabei ist anzumerken, dass der thermodynamische Weg auf dem die partiellen Faltungen erreicht werden, die Stabilität und die Art der Faltungsintermediate jeweils deutlich voneinander abweichen können. Insofern ist auch die Vergleichbarkeit der Endprodukte der Aggregation in Frage zu stellen.

Ein physiologischer Konversionsassay zur Bestimmung der Aggregationsgeschwindigkeit des Prionproteins wurde von *Kundu et al.* (2003) entwickelt. Darauf aufbauend konnte in jüngerer Zeit ein Modell zur Entstehung von Speziesbarrieren entwickelt werden (*Vanik et al.*, 2004; *Jones et al.*, 2005), was das enorme Potential physiologischer Bedingungen bei der Untersuchung der Aggregation des humanen Prionproteins andeutete.

In der vorliegenden Arbeit wurde analog zu *Kundu et al.* (2003) in einem physiologischen, nicht-denaturierenden Aggregationssystem mit humanem Prionprotein aus *E.coli* gearbeitet, welches die zellulären Bedingungen für die PrP^{Sc}-Bildung beim Menschen am ehesten simulieren sollte.

4.2. Einfluss des pH-Wertes auf die Bildung des pathologischen Prionproteins

Es konnte bislang nicht eindeutig geklärt werden, ob die Konversion des zellulären Prionproteins in einem bestimmten zellulären Kompartiment oder auf der Zelloberfläche erfolgt. Somit kann die Umfaltung des Prionproteins bei pH-Werten zwischen 4.0-7.4 erfolgen und durch den jeweiligen pH-Wert wesentlich beeinflusst werden.

Um den Einfluss physiologischer Bedingungen auf die pH-Abhängigkeit der Aggregation zu verstehen, wurde in dieser Arbeit die Aggregation der humanen Prionproteinfragmente *humPrP23-112*, *humPrP23-144* und *humPrP23-159* unter nicht-denaturierenden Bedingungen zwischen pH-Werten von 4.0-8.1 untersucht. *humPrP23-159* ist das bislang längste Prionproteinfragment, dessen Aggregationsverhalten unter physiologischen Bedingungen untersucht wurde (*Watzlawik et al.*, 2006). Unter physiologischen Bedingungen wurden innerhalb eines pH-Bereiches von 6.2-8.1 fibrilläre Aggregate gebildet, während bei pH-Werten zwischen 4.0-5.0 keine Bildung β -Faltblatt-reicher Strukturen erfolgte.

Nach *Borchelt et al.* (1992) erfolgt die Umwandlung des zellulären Prionproteins direkt nach seiner Internalisierung von der Zelloberfläche. Da eine Lagerung von permanent mit PrP^{Sc}-infizierten Neuroblastomazellen bei 18 °C die weitere Bildung des pathologischen Prionproteins reversibel blockierte, wurde ein Transport des Prionproteins in die sauren Endosomen bei der PrP^{Sc}-Bildung für notwendig erachtet. Die Konversion des Prionproteins

soll nach *Taraboulos et al.* (1992) aber vor der Fusion mit den Lysosomen bereits beendet sein. Unterstützend wurde von *Morillas et al.* (2001) und *Swietnicki et al.* (2000) angeführt, dass die Bildung β -Faltblatt-reicher oligomerer und fibrillärer Strukturen aus rekombinantem Prionprotein unter denaturierenden Bedingungen nur zwischen pH-Werten von 4.0-5.0 zu beobachten sei, während unter neutralen Bedingungen eine stark verlangsamte oder keine Aggregation bzw. Oligomerisierung des Prionproteins erfolgt.

Wenn ein saurer pH-Wert eine derart zentrale Rolle bei der Entstehung des pathologischen Prionproteins einnehmen würde, sollte die Aggregation des Prionproteins in β -Faltblatt-reiche Strukturen auch in unserem physiologischen System unter sauren pH-Bedingungen zu beobachten sein, was aber nicht der Fall war. Bei der Vermessung der NMR-Strukturen der Vollängen-Prionproteine von Maus und Mensch bzw. des Hamster-Prionproteins ShaPrP90-231 wurde unter nicht-denaturierenden Bedingungen bei pH-Werten zwischen 4.5 und 5.2 mit millimolaren Proteinkonzentrationen gearbeitet, ohne dass β -Faltblatt-reiche Aggregate des Prionproteins detektiert werden konnten (Riek *et al.*, 1997; Zahn *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1999), was auf einen prinzipiell unterschiedlichen Weg der Aggregation des Prionproteins unter sauren denaturierenden Bedingungen im Vergleich zu sauren nicht-denaturierenden Bedingungen hinweist.

Bei pH-Werten von 6.5 konnte dagegen in physiologischen Konversionsassays die Bildung fibrillärer Aggregate des Prionproteins beschrieben werden (Kundu *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2005), was eher für neutrale als saure pH-Werte bei der PrP^{Sc}-Bildung spricht.

Die zelluläre Akkumulation des pathologischen Prionproteins soll interessanterweise auch ohne einen Kontakt mit den sauren Lysosomen und Endosomen im Endoplasmatischen Retikulum (Sernataro *et al.*, 2004; Beranger *et al.*, 2002; Harris, 2003) und im Zytosol (Mironov *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2002; Ma & Lindquist, 2002; Cohen *et al.*, 2003) erfolgen. *Taraboulos et al.* (1992) bestätigte, dass ein saurer pH-Wert allein für die intrazelluläre Bildung des PrP^{Sc} nicht ausreichend ist.

Jüngere Arbeiten konnten auch unter denaturierenden Bedingungen die Bildung fibrillärer Aggregate des Prionproteins oberhalb eines pH-Wertes von 5.5 bestätigen (Breydo *et al.*, 2005; Bocharova *et al.*, 2005a, 2005b), was im direkten Widerspruch zu den Ergebnissen von *Morillas et al.* (2001) und *Swietnicki et al.* (2000) steht. Hierbei ist anzumerken, dass die partielle Denaturierung des Prionproteins auf sehr unterschiedlichen Wegen erzeugt wurde

und eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse nicht wahrscheinlich ist (Kapitel 4.1.). Zusätzlich wurde mit Prionproteinen aus zwei unterschiedlichen Spezies gearbeitet, so dass der beobachtete Unterschied auch in einer etwas anderen Proteinsequenz zwischen Maus- und Hamster-Prionprotein begründet sein kann.

Beim Vergleich der pH-Abhängigkeiten von *humPrP23-159* mit *humPrP23-144* zeigt sich, dass ein neutraler pH-Wert einen stark beschleunigenden Effekt auf die Aggregation von *humPrP23-159* ausübte, während ein vergleichbarer Effekt bei *humPrP23-144* erst bei einem pH-Wert von 8.1 beobachtet werden konnte. Das impliziert einen Mechanismus, bei dem das Helix 1-Segment und die Region 23-143 einen jeweils eigenen Einfluss auf die pH-Abhängigkeit der Umfaltung in *humPrP23-159* besitzen (Mechanismus s. Kapitel 4.3.). Die besondere pH-Abhängigkeit der Helix 1-Region im Prionprotein wurde kürzlich durch Elektronenspinresonanz (ESR)-Spektroskopie (ESR) bestätigt. Danach führten pH-Wert-Änderungen zwischen pH 5.0-7.4 zu strukturellen Veränderungen innerhalb des Helix 1-Segmentes, wobei insbesondere der N-terminale Bereich der Helix 1 mit den Aminosäuren 145-147 betroffen war (Watanabe *et al.*, 2006).

Es soll angemerkt werden, dass ein zusätzlicher Einfluss der Region 174-231 im humanen Prionprotein auf die pH-Abhängigkeit der Aggregation unter physiologischen Bedingungen nicht ausgeschlossen werden kann und einer weiteren Untersuchung bedarf.

Basierend auf den eigenen Ergebnissen scheint die Bildung des pathologischen Prionproteins eher unter neutralen als unter sauren pH-Werten zu erfolgen, was durch andere Arbeiten in physiologischen Aggregationssystemen bestätigt wird. Eine Konversion des Prionproteins unter physiologischen, nicht-denaturierenden Bedingungen konnte bislang nur oberhalb eines pH-Wertes von 6.0 nachgewiesen werden.

4.2. Einfluss der N-terminalen Domäne, der Helix 1 und des β -Strands S2 auf den Mechanismus der Aggregation des humanen Prionproteins

Das mechanistische Verständnis der Konversion des Prionproteins in seine pathogene Isoform ist für eine mögliche therapeutische Intervention eine Grundvoraussetzung und soll hier deshalb ausführlich diskutiert werden.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass innerhalb eines physiologischen Konversionsassays sowohl die sehr polare Helix 1 als auch die polare Region 160-173 mit

dem β -Strand S2 einen stark aggregationsfördernden Effekt auf das Prionprotein ausüben. Der unstrukturierte und sehr flexible N-terminale Bereich 23-112 im Prionprotein zeigte für sich allein dagegen keine Tendenz zur Bildung von β -Faltblatt-reichen Aggregaten.

Aus diesen Ergebnissen erscheint es evident, dass die Helix 1 und der β -Strand S2 mechanistisch an der Umfaltung des Prionproteins in eine pathogene Isoform beteiligt sind.

Dies ist umso erstaunlicher als beim α -Synuclein und dem Tau-Protein die Trunkierung einer nicht-amyloidogenen Region zu einer Erhöhung der Aggregationstendenz in dem verbleibenden Fragment führen sollte (Murray *et al.*, 2003; Hoyer *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005; Von Bergen *et al.*, 2002; Barghorn *et al.*, 2000).

Eine Berechnung der Aggregationstendenz der untersuchten Prionproteinfragmente durch das Programm Zyggregator (Pawar *et al.*, 2005) resultierte bei einem pH-Wert von 6.5 in einer Reihenfolge, bei der das Fragment *humPrP23-144* den höchsten relativen Aggregationsscore ($Z_{agg} = -0.18$) unter den drei Fragmenten aufwies, gefolgt von *humPrP23-159* ($Z_{agg} = -0.80$) und *humPrP23-173* ($Z_{agg} = -0.89$) mit dem niedrigsten Aggregationsscore, wobei die Reihenfolge den experimentellen Daten entgegengesetzt ist. Einschränkend muss gesagt werden, dass aufgrund einer Limitierung des Programms Zyggregator jeweils nur der Bereich ab Aminosäure 95 für die Berechnung der Aggregationsneigung der Fragmente berücksichtigt werden konnte (PrP95-144, PrP95-159, PrP95-173).

Aus den eigenen Ergebnissen lassen sich zwei verschiedene Mechanismen der Aggregation des Prionproteins ableiten:

Mechanismus A:

Obwohl der untersuchte N-terminale Bereich 23-112 des Prionproteins selbst nicht zur Aggregation neigte, könnten zwischen der ausschliesslich positiv geladenen und sehr flexiblen, unstrukturierten N-terminalen Domäne und der insgesamt neutral geladenen Helix 1-Region ionische Wechselwirkungen bei neutralem pH-Wert zur Stabilisierung von Aggregat-Aggregat-Interaktionen ausgebildet werden. Durch eine Interaktion des N-terminalen Bereiches mit der Helix 1 (Kopf-Schwanz-Interaktion) zwischen verschiedenen Prionproteinen könnte die schnellere Aggregation von *humPrP23-159* gegenüber *humPrP23-144* erklären werden. Mögliche Salzbrücken könnten durch eine Protonierung der Carboxylat-Gruppen in den Seitenketten von Aspartaten und Glutamaten mit zunehmend saurer werdendem pH-Wert gespalten werden, was die geringe Aggregationstendenz von *humPrP23-159* bei sauren pH-Werten erklären würde.

Da nur die Helix 1-Region negativ geladene Aminosäuren bei neutralem pH-Wert in dem Fragment *humPrP23-159* beinhaltet, müsste sie an jeder möglichen Salzbrücke beteiligt sein. Passend dazu soll die Stabilität der Helix 1 entscheidend durch zwei interne Salzbrücken gewährleistet werden (Speare *et al.*, 2003). Insofern könnte z.B. eine Interaktion der N-terminalen Startsequenz (KKRPK...) mit dem Helix 1-Segment anderer Prionproteinmoleküle durch die Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen bei neutralem pH-Wert entscheidend zur Aggregation von *humPrP23-159* bzw. von allen Prionproteinen mit Helix 1-Motiv und N-terminaler Domäne beitragen.

Mechanismus B:

Ein alternativer Mechanismus könnte auf der Ausbildung von Salzbrücken zwischen zwei oder mehreren Helix 1-Regionen basieren. Danach könnten zwei stabilisierende intrahelikale Salzbrücken (Asp-Arg) zu intermolekularen Salzbrücken umgeordnet werden, die einen frühen Kontakt zwischen mehreren Prionmolekülen herstellen und so die Aggregation des Prionproteins fördern könnten.

Bestätigend zur möglich Helix-Helix-Interaktion bei der Aggregation des Prionproteins (Mechanismus B) ergaben Proteindatenbankvergleiche des Prionproteins mit anderen Proteinen, dass die Helix 1 des Prionproteins eine der polarsten Helices innerhalb der *Protein Data Bank* (RCS-PDB) ist (Morissey & Shakhnovich, 1999). Diese ungewöhnlich hydrophile Helix 1 besitzt nur wenig Kontakt zum Rest des Moleküls (Riek *et al.*, 1996; Korth *et al.*, 1997), während die hydrophoben Helices 2 und 3 ein kompaktes Helix-Bündel ausbilden, dass zusätzlich durch eine Disulfidbrücke stabilisiert wird. Die meisten Ladungen befinden sich auf der Aussenseite der Helix 1, die vom globulären Teil des Proteins abgewandt ist (Morissey & Shakhnovich, 1999). Energetische Berechnungen zur β -Aggregation von Helix 1-Peptiden im Prionprotein ergaben nach Morissey & Shakhnovich (1999), dass die Bildung von Helix-Dimeren durch die Halbierung der möglichen internen Salzbrücken nicht begünstigt ist. Eine Interaktion der dimeren Strukturen mit weiteren Helix 1-Peptiden würde dagegen energetisch favorisiert werden (Morissey & Shakhnovich, 1999).

Bestätigend zum Einfluss der N-terminalen Domäne auf die Aggregation des Prionproteins wurde von Frankenfield *et al.* (2005) berichtet (Mechanismus A), dass *moPrP23-231* unter neutralen Bedingungen deutlich schneller unter Ausbildung grösserer Aggregatstrukturen als *moPrP90-231* aggregiert. Die unterschiedliche Grösse der Proteinaggregate von *moPrP23-231* und *moPrP90-231* wurde durch einen zweistufigen Aggregationsmechanismus erklärt. In der

ersten Stufe sollen sowohl *moPrP23-231* als auch *moPrP90-231* unter Verbrauch von monomerem Prionprotein relativ kleine Proteinaggregate ausbilden. In der zweiten Stufe soll der N-terminale Bereich des Prionproteins 23-89 Aggregat-Aggregat-Interaktionen unter Ausbildung sehr grosser Aggregat-Strukturen vermitteln, die bei *moPrP90-231* nicht detektierbar waren. Insofern führt auch hier eine Interaktion der N-terminalen Domäne mit der globulären C-terminalen Domäne zu einer Beschleunigung der Aggregation, die ohne sie nicht möglich wäre. Eine molekulare Erklärung könnte der vorgeschlagene Mechanismus A sein, wobei ionische Wechselwirkungen nicht zwingend zur Helix 1-Region im Volllängen-Prionprotein ausgebildet werden müssen.

Der aggregationsbeschleunigende Effekt der N-terminalen Region des Prionproteins könnte die falschen Berechnungen zur β -Aggregation der untersuchten Prionproteinfragmente durch das Programm Zyggregator nach Pawar *et al.* (2005) verursacht haben, da der N-terminale Bereich 23-94 zusammen mit den C-terminalen Regionen von *humPrP23-144*, *humPrP23-159* und *humPrP23-173* die maximal berechenbare Peptidgrösse von 100 Aminosäuren überstieg. Interessanterweise konnten Parallelen für die ungewöhnliche Aggregationstendenz der Helix 1 in *humPrP23-159* im Vergleich zu *humPrP23-144* zu einzelnen Krankheitsberichten gezogen werden. Bei einem Patienten mit einer Q160stop Mutation in der proteincodierenden Region des *Prnp*-Gens erfolgte das Auftreten der klinischen Symptome etwa 6 Jahre früher als bei einem Patienten mit einer Y145stop Mutation im *Prnp*-Gen (Ghetti *et al.*, 1996).

Bestätigend zum Einfluss der Helix 1 auf die Aggregation des Prionproteins konnte ein ungewöhnlicher Salzeffekt auf die thermodynamische Stabilität des humanen Prionproteins gezeigt werden. Danach reduzierten alle eingesetzten Salze in Konzentrationen unterhalb von 50 mM signifikant die thermodynamische Stabilität des Prionproteins. Als mögliche Ursache wurde eine Destabilisierung der allein durch ionische Wechselwirkungen stabilisierten Helix 1 angegeben (Apetri *et al.*, 2003), was im Einklang zur Interpretation der eigenen Ergebnissen steht.

Wichtige Arbeiten für die mechanistische Beteiligung der Helix 1 und des β -Strands S2 stammen aus Infektiositätsstudien in Zellkulturen. Diese Studien basieren auf transienten Transfektionen von stabil mit PrP^{Sc}-infizierten neuronalen Zelllinien. Bei den transienten Transfektionen der Zellen wurde mit Konstrukten gearbeitet, die eine veränderte Sequenz im für das Prionprotein codierenden Bereich enthalten. Wichtige für spezifische strukturelle Anteile des Prionproteins codierende Sequenzen sind daraus deletiert worden. Ziel der

Arbeiten war es, eine Übertragbarkeit der Infektiösität auf die transienten, veränderten zellulären Prionproteine aufzuzeigen, was die Bedeutung dieser Regionen bei der PrP^{Sc}-Bildung aufzeigen könnte. Dabei war zwischen dem stets endogen vorhandenen PrP^C der neuronalen Zellen und dem transient eingebrachten, veränderten Prionprotein durch spezifische Antikörper zu unterscheiden, um feststellen zu können, ob das veränderte Prionprotein auch in eine Proteinase K-resistente Form mit PrP^{Sc}-ähnlichen Eigenschaften umgewandelt werden kann.

Vorberg et al. (2001) zeigte in PrP^{Sc}-propagierenden Neuroblastomazellen, dass veränderte Prionproteine, denen entweder die Region 143-153 mit der Helix 1 oder die Region 160-163 mit dem β -Strand S2 oder die Region 127-130 mit dem β -Strand S1 fehlte, nicht in Proteinase K-resistente Formen mit PrP^{Sc}-ähnlichen Eigenschaften überführt werden können, was die Bedeutung der Helix 1 und des β -Faltblattes bei der Bildung des pathologischen Prionproteins bestätigt. Eine weitere Arbeit konnte die mechanistische Beteiligung der Helix 1 bei der PrP^{Sc}-Bildung noch weiter konkretisieren. Danach ist die Ladungsverteilung innerhalb der Helix 1 entscheidend für die Propagation der Infektiösität in Zellkulturen. So führte ein Austausch der geladenen Aminosäuren 147-151 gegen ungeladene Aminosäuren oder ein kompletter Austausch aller geladenen Aminosäuren innerhalb der Helix 1-Region gegen solche mit entgegen gesetzter Ladung zu einer Inhibierung der PrP^{Sc}-Propagation in Neuroblastoma-Zellen (*Norstrom et al.*, 2006). Damit könnte das Helix 1-Segment zusätzlich zur spontanen Konversion des Prionproteins auch bei erworbenen Prionerkrankungen den Kontakt zum pathologischen Prionprotein über ionische Wechselwirkungen herstellen.

Eine verlängerte Inkubationszeit bei einer tierexperimentellen Übertragung des PrP²⁷⁻³⁰ ohne N-terminale Region im Vergleich zum PrP^{Sc} deutet auch hier auf eine Beteiligung der N-terminalen Region neben Helix 1-Helix 1-Kontakten bei der Bildung des pathologischen Prionproteins hin. Unterstützt wird die Bedeutung der Helix 1 bei der PrP^{Sc}-Propagation durch verschiedene gegen das Helix 1-Motiv gerichtete Antikörper in Zellkulturexperimenten, die jeweils zu einer Inhibierung der PrP^{Sc}-Bildung führten (*Heppner et al.*, 2001; *Enari et al.*, 2001).

Mechanismus C:

Der aggregationsfördernde Effekt des β -Strands S2 in *humPrP23-173* relativ zu *humPrP23-159* kann prinzipiell mit beiden auf das Helix 1-Motiv bezogenen Aggregationsmechanismen verbunden werden. Obwohl es NMR-spektroskopisch keine Evidenz für die Ausbildung eines β -Faltblattes in *humPrP23-173* gab, wies der β -Strand S2 die stärkste Tendenz zur

Ausbildung von β -Faltblattstruktur innerhalb des Prionproteinfragmentes auf. Zusätzlich zur Helix 1-Helix 1-Interaktion oder zur Interaktion der Helix 1 mit der N-terminalen Region könnte eine Wechselwirkung der β -Strands S2 zwischen verschiedenen Prionproteinen bei der Aggregation von *humPrP23-173* zustande kommen. Anstelle eines intramolekularen β -Faltblattes würden intermolekulare β -Faltblätter zwischen den β -Strands S2 ausgebildet werden, die einer dimeren oder multimeren Struktur aus zwei oder mehreren Prionproteinen zusätzliche Stabilität verleihen würden. Die Bildungsgeschwindigkeit von Helix 1-Helix 1-Addukten könnte so deutlich erhöht werden, was der Grund für den zusätzlichen Beschleunigungseffekt des Segmentes 160-173 in *humPrP23-173* im Vergleich zu *humPrP23-159* sein könnte.

Aus den hier erzielten Ergebnissen lassen sich verschiedene Mechanismen für die Aggregation des Prionproteins ableiten, bei denen eine zentrale Helix 1 einen auf ionischen Wechselwirkungen basierenden Kontakt zwischen Prionproteinen bzw. zum PrP^{Sc} herstellt, der durch den β -Strand S2 zusätzlich stabilisiert werden könnte. Ein Fehlen der Helix 1-Region und der Region mit dem β -Strand S2 führte hier zu einer Verminderung der Aggregationsneigung des Prionproteins bzw. in anderen Arbeiten zur Inhibierung der PrP^{Sc}-Bildung.

4.4. Struktur des pathologischen Prionproteins

Die dreidimensionale Struktur des infektiösen Erregers könnte entscheidend zum Verständnis der Prionerkrankungen beitragen und einen Ansatz für therapeutische Interventionen bieten. Bislang konnten klassische NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalysen aufgrund der Unlöslichkeit des aggregierten Prionproteins bzw. einer nicht perfekten Kristallstruktur von fibrillärem Prionprotein nicht zur Strukturaufklärung des pathologischen PrP^{Sc} und des rekombinanten fibrillären Prionproteins beitragen.

Mit dem Bekanntwerden der ersten NMR-Struktur des Prionproteins (Riek *et al.*, 1996) wurde die isolierte Helix 1 ohne stabilisierende Tertiärkontakte als wahrscheinlichster Kandidat für eine Umfaltung in ein β -Faltblatt im PrP^{Sc} angesehen. In auf Sekundärstrukturanalysen und elektronenkristallographischen Daten basierenden PrP^{Sc}-Strukturmodellen wird die Region von Aminosäure 90-175 mit der Helix 1 und dem β -

Faltblatt als alleinige Konversionsregion des Prionproteins angesehen. Die Helices 2 und 3 sollen im PrP^{Sc} unverändert vorliegen (Govaerts *et al.*, 2004; Wille *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit konnte eine direkte Evidenz durch zwei unabhängige Methoden erbracht werden, dass die Helix 1 trotz eines starken Beschleunigungseffektes auf die Aggregation des humanen Prionproteins selbst nicht in ein β -Faltblatt umfaltet.

Antikörperbindungsstudien an PrP^C im Vergleich zu PrP^{Sc} zeigten, dass das Helix 1-Motiv in beiden Isoformen durch die Antikörper 6H4 und SAF61 detektiert wird (Korth *et al.*, 1997; Paramithiotis *et al.*, 2003; Perrier *et al.*, 2004; Moroncini *et al.*, 2004). Der Antikörper 6H4 wurde darüber hinaus zur Immunopräzipitation von PrP^C und PrP^{Sc} eingesetzt (Paramithiotis *et al.*, 2003). Daraus ergibt sich, dass das Helix 1-Motiv im PrP^C und PrP^{Sc} die gleiche Sekundärstruktur aufweisen sollte und nicht in ein β -Faltblatt umgewandelt wird.

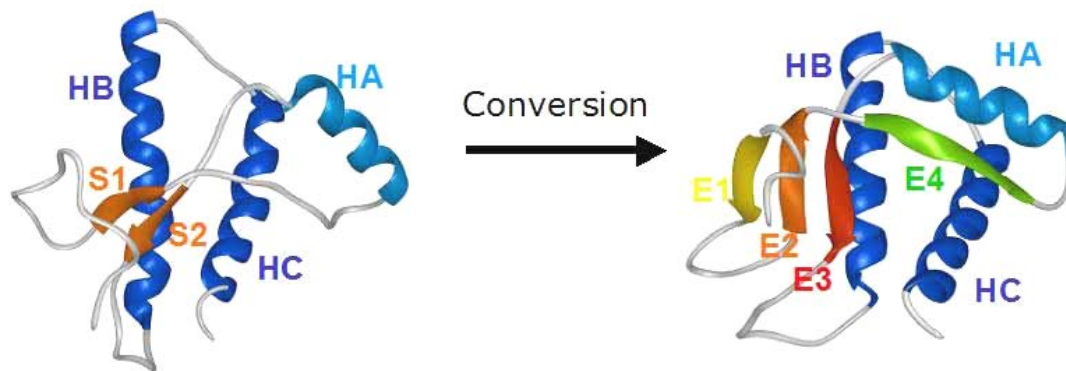


Abb. 26: Alternatives PrP^{Sc}-Strukturmodell (DeMarco und Daggett, 2004). Molekulardynamische (MD) Simulationen der Umfaltung des nativen Prionproteins PrP^C (Riek *et al.*, 1996, links) führten zu einem PrP^{Sc}-Modell, in dem die Region um die β -Strands S1 und S2 und der Bereich zwischen Helix 2 und Helix 3 im humanen Prionprotein in ein viersträngiges antiparalleles β -Faltblatt unter Erhalt der Helix 1 umgewandelt wird. HA: Helix 1, HB: Helix 2, HC: Helix 3, S1 und S2: β -Strands S1 und S2, E1-4: verlängerte β -Strands 1-4 im PrP^{Sc}: E1: 116-119, E2: 129-131, E3: 161-163, E4: 135-140.

In einem auf Molekulardynamischen (MD) Simulationen beruhenden alternativen PrP^{Sc}-Strukturmodell (DeMarco & Daggett, 2004) wurde eine Verlängerung der beiden β -Strands S1 und S2 in ein grosses antiparalleles β -Faltblatt (Abb. 26) als zentrale Einheit der Konversion unter Erhalt der Helix 1 beschrieben. Alle drei α -Helices und damit auch die Helix 1 waren in diesem PrP^{Sc}-Strukturmodell noch existent, wobei insbesondere die Helix 2 in deutlich verkürzter Form vorlag.

Der β -Strand S2 führte in dieser Arbeit analog zur Helix 1 zu einer signifikanten Beschleunigung der Aggregation des Prionproteins und erhöhte deutlich die Proteinase K-Resistenz des Prionproteinfragments *humPrP23-173* gegenüber *humPrP23-159*. Insofern ist anzunehmen, dass zumindest Teile der Region 160-173 um den β -Strand S2 in ein β -Faltblatt in fibrillärem *humPrP23-173* umgewandelt. Eine quantitative FTIR-Spektroskopie konnte aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden, würde aber zu einem wichtigen Aufschluss über die Struktur des Segmentes 160-173 in fibrillärem *humPrP23-173* führen. Eine exakte Einschätzung des β -Faltblattgehaltes der Region 160-173 in fibrillärem PrP23-173 konnte deshalb nicht vorgenommen werden.

Kurze Peptide, die neben dem Helix 1-Segment die Proteinsequenz für den β -Strand S2 umfassten, konnten in β -Faltblatt-reiche fibrilläre Aggregate umgewandelt werden (Kozin *et al.*, 2001; Jamin *et al.*, 2002), was für die Ausbildung von β -Faltblattstruktur im Segment 160-173 spricht.

Bei einem Fehlen des β -Strands S2 konnte verändertes Prionprotein ohne die Aminosäuren 160-163 in Zellkulturexperimenten nicht in PrP^{Sc} überführt werden (Vorberg *et al.* (2001), was die Bedeutung des β -Faltblattes für die Bildung des pathologischen Prionproteins unterstreicht.

Trunkierte Prionproteine ohne Helix 2 oder Helix 3 zeigten in stabil mit PrP^{Sc} transfizierten Neuroblastoma-Zellen keine zum PrP^{Sc} vergleichbare Proteinase K-Resistenz (Muramoto *et al.*, 1996), was die eigenen Ergebnisse zur Proteinase K Resistenz von *humPrP23-173* direkt bestätigt und für eine Beteiligung der Helices 2 und 3 an der PrP^{Sc}-Bildung spricht. Bestätigend dazu konnten Helix 2 und Helix 3 umspannende Peptide in β -Faltblatt-reiche Aggregate umgefaltet werden, während Prionpeptide, die fast nur aus dem sehr polaren Helix 1-Segment bestehen, nicht in fibrilläre Aggregate mit hohem β -Faltblattanteil umgewandelt werden konnten (Ziegler *et al.*, 2003; Jamin *et al.*, 2002, Sharman *et al.*, 1998). In Versuchen von Tizzano *et al.* (2005) und Bosques & Imperiali (2003) wies das kurze Prionpeptid *humPrP173-195* mit der Helix 2 bei neutralem pH-Wert eine ausserordentlich hohe Aggregationsneigung auf und konnte auch bei geringer Proteinkonzentration nur für sehr kurze Zeit stabil gehalten werden.

Vergleicht man die hier bestimmten FTIR-spektroskopischen β -Faltblattanteile von fibrillärem *humPrP23-159* und fibrillärem *humPrP23-144* mit den β -Faltblattanteilen im Proteinase K resistenten PrP^{Sc} (Aminosäure 90-231) (Tabelle 1), so ergibt sich, dass jeweils 42 Aminosäuren im aggregierten *humPrP23-159* und *humPrP23-144* und etwa 67-77

Aminosäuren im PrP^{Sc} in β -Faltblättern angeordnet sind. Bei einer vergleichbaren Sekundärstruktur der Region 23-159 im PrP^{Sc} wie in fibrillärem *humPrP23-159* sollten noch 25-35 Aminosäuren ausserhalb der Region 23-159 eine β -Faltblattstruktur besitzen. Da der vermutete Konversionsbereich im Prionprotein nur den Bereich 90-175 abdecken soll (Govaerts et al., 2004; Wille et al., 2002; DeMarco & Daggett, 2004), müssen 9-19 Aminosäuren ausserhalb des potentiellen Konversionsbereiches in der Region 176-231 eine β -Faltblattstruktur aufweisen. Vergleicht man umgekehrt die α -helikalen Strukturanteile im PrP^C mit denen im Proteinase K verdauten PrP^{Sc}, müssen bei einer nicht umgefalteten Helix 1 im PrP^{Sc} 27-38 der 63 Aminosäuren aus α -helikalen Segmenten im PrP^C in eine andere Struktur im PrP^{Sc} umfalten. Selbst wenn die aus 13 Aminosäuren bestehende Helix 1 in *random coil* umgefaltet würde, was ebenfalls aus den eigenen Ergebnissen abgeleitet werden kann, müssten zusätzlich noch 14-25 Aminosäuren der Helices 2 und 3 ihre Struktur bei der Konversion des Prionproteins verändern (s. Tabelle 1). Die sehr gute Übereinstimmung des Zugewinns an β -Faltblattstruktur mit dem Verlust an helikaler Struktur in der Region 176-231 spricht für die Plausibilität der eigenen Daten und macht eine Beteiligung der Helices 2 und 3 an der Umfaltung des Prionproteins sehr wahrscheinlich.

Kocisko *et al* konnte im PrP^{Sc} zeigen, dass die Helix 1 nicht durch die Proteinase K abgedaut werden kann (Kocisko *et al.*, 1996). Das resultierende PrP^{Sc}27-30 beinhaltet die Aminosäuren ~90-231, in denen auch die Helices 2 und 3 neben der Helix 1 noch intakt waren. Das PrP^{Sc}27-30 weist aber noch einen α -helikalen Anteil zwischen 18-25 % auf (Tabelle 1, Kapitel 1.3.1.). Ein mangelnder Zugriff der Proteinase K auf die einzelnen Prionproteine in den PrP^{Sc}-Aggregaten kann durch eine Abspaltung der N-terminalen Region im PrP^{Sc} ausgeschlossen werden (Rogers *et al.*, 1993; Flehsig *et al.*, 2000). Insofern muss die Region 174-231 im PrP^{Sc} mit den Helices 2 und 3 direkt vor einem Angriff durch die Proteinase K geschützt sein. Da die Helices 2 und 3 im PrP^C Proteinase K-sensitiv sind, aber 86 % der Aminosäuren der Region 174-231 ausmachen, die im PrP^{Sc} Proteinase K-resistent sind, ist zumindest von Teilbereichen der Helices 2 und 3 eine Umfaltung bei der PrP^{Sc}-Bildung zu erwarten.

Die Bedeutung der Region 174-231 mit den Helices 2 und 3 für die Infektiosität des Erregers wurde in verschiedenen Tierexperimenten untersucht. Das pathologische Prionprotein aus Patienten mit dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) ist überwiegend N- und C-terminal trunkiert. Es weist ein Hauptfragment von etwa 7-8 kDa (PrP81/82-144, PrP81/82-153) auf, dem die Helix 2 und Helix 3 komplett fehlen (Salmona *et al.*, 2003; Ghetti *et al.*, 2003; Gambetti *et al.*, 2003). Diese trunkierten Prionproteine sind interessanterweise nicht

mehr infektiös (Chesebro *et al.*, 2005; Tateishi *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1994). Als Ausnahmen seien die mit der GSS assoziierten P102L-Mutation und die Oktarepeat-Insertionsmutationen im *Prnp*-Gen anzuführen. Die resultierenden pathologischen Prionproteine werden nicht C-terminal gespalten (Ghetti *et al.*, 2003; Parchi *et al.*, 1998) und stellen die einzigen GSS-assoziierten Prionproteine dar, die sich im Tierexperiment erfolgreich übertragen liessen (Masters *et al.*, 1991; Tateishi *et al.*, 1996; Goldfarb *et al.*, 1992; Hsiao *et al.*, 1992, 1994). Da die Bildung eines infektiösen Prionproteins ohne die Helices 2 und 3 nicht möglich ist, müssen sie an der Konversion des Prionproteins beteiligt sein. Eine komplette Umfaltung der Helices 2 und 3 in β -Faltblattstruktur im PrP^{Sc} wird aber aufgrund der sie stabilisierenden Disulfidbrücke als sehr unwahrscheinlich beurteilt. Welker *et al.* (2002) konnte in aufgereinigtem und solubilisiertem PrP^{Sc} zeigen, dass keine intermolekularen Disulfidbrücken unter Ausbildung dimerer oder multimerer Strukturen existieren (Welker *et al.*, 2002).

Aus der Kristallstruktur des rekombinanten Schaf-Prionproteins PrP123-230 wurde abgeleitet, dass die Region 188-204 mit dem C-terminalen Ende der Helix 2 und dem *Turn* zwischen Helix 2 und Helix 3 neben den β -Strands S1 und S2 ein wahrscheinlicher Ausgangspunkt für die Bildung eines grossen β -Faltblattes sein könnte (Haire *et al.*, 2004). Eine Umfaltung von Teilen der C-terminalen Helices in β -Faltblattes könnte einen Ansatz für die hohe Proteinase K Resistenz dieser Region liefern und würde im Einklang mit allen strukturellen Anforderungen des PrP^{Sc} stehen.

In den PrP^{Sc}-Strukturmodellen (Govaerts *et al.*, 2004; DeMarco & Daggett, 2004) wird die Region 90-175 als zentrale Einheit der Konversion ohne Beteiligung der Helices 2 und 3 beschrieben. Gegen das Strukturmodell von Govaerts *et al.* (2004) sprechen folgende Aspekte: Die Helix 1 wird bei der Konversion des Prionproteins nicht in ein β -Faltblatt umgefaltet (Watzlawik *et al.*, 2006). Es ist sehr evident, dass die Helices 2 und 3 an der Konversion des Prionproteins beteiligt sind, was in diesem Modell nicht berücksichtigt wird. Darüber hinaus wird die Anwesenheit von β -Helices in amyloiden Fibrillen als sehr unwahrscheinlich beurteilt (Khurana & Fink, 2000). Aus dieser Datenlage heraus scheint dieses Modell (Abb. 27) die Struktur des infektiösen PrP^{Sc}-Erregers nur unvollständig korrekt wiedergeben zu können.

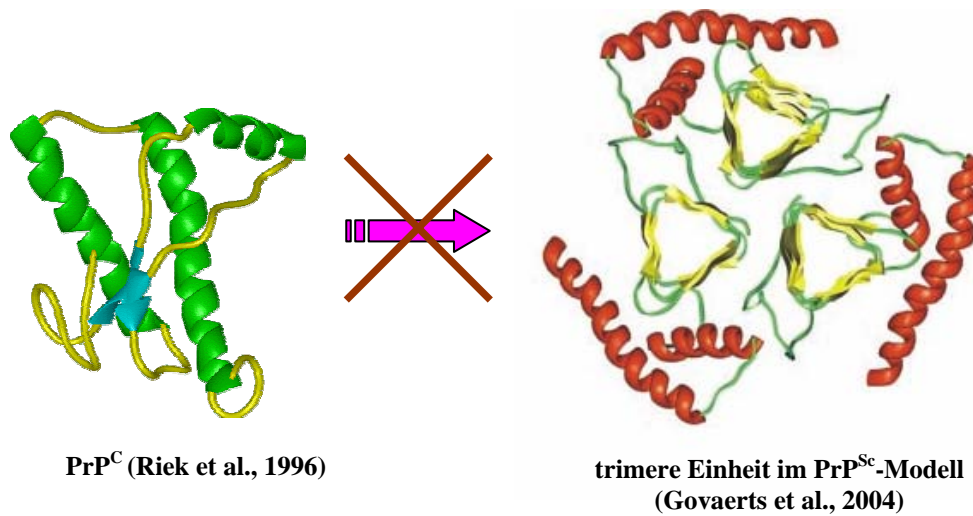


Abb. 27: Beurteilung des aktuellen PrP^{Sc}-Strukturmodells (Govaerts et al., 2004). Die Bildung einer parallelen linksgewundenen trimeren β -Helix aus nativem PrP^C (links, Zahn *et al.*, 2000) innerhalb der Region 90-175 im PrP^{Sc}-Modell (rechts, Govaerts *et al.*, 2004)) steht im Widerspruch zur aktuellen Erkenntnislage über die Helix 1 im *humanen* Prionprotein und der strukturellen Analytik des infektiösen Erregers.

Im PrP^{Sc}-Strukturmodell von *DeMarco & Daggett* (2004) (Abb. 26) wird die Region 90-175 ohne Beteiligung der Helix 1 in ein β -Faltblatt umgewandelt. Durch eine deutliche Verkürzung der drei Helices und insbesondere der Helix 2 soll der α -helikale Gehalt in diesem Modell entsprechend den experimentell bestimmten Werten im PrP^{Sc} angepasst werden. Teile der Helices 2 und 3 falten in diesem Modell allerdings in *random coil* und nicht in β -Faltblatt um. Damit ist auch aus diesem Modell nicht ersichtlich, warum die Helices 2 und 3 für die Infektiosität des Erregers essentiell sind und eine starke Proteinase K Resistenz im PrP^{Sc} erzeugen.

Eine Erklärung für die ungewöhnliche Proteinase K-Resistenz des pathologischen Prionprotein trotz α -helikalen Charakters könnte in einer starken Zusammenlagerung der kompakten globulären C-terminalen Domänen von mehreren Prionproteinen unter Ausbildung einer Mizellen-ähnlichen Anordnung liegen. Die unstrukturierten und flexiblen N-terminalen Bereiche des Prionproteins würden jeweils nach aussen weisen und proteolytisch angreifbar sein, was die Erklärung für das Fehlen der N-terminalen Region im PrP²⁷⁻³⁰ sein könnte. Die teilweise umgefalteten Helices 2 und 3 würden sich im Innereren der Strukturen befinden und vor einem Angriff der Proteinase K durch die resistenten Regionen 97-140 geschützt werden, während die Helix 1 umgeben von β -Faltblattstruktur mehr zur Aussenseite orientiert und den Kontakt zu anderen Prionproteinen herstellen könnte.

5. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Helix 1 die Aggregation des humanen Prionproteins beschleunigt ohne selbst in ein β -Faltblatt umzufalten. Strukturelle Analysen des PrP^{Sc} machen aber eine Konversion helikaler Bereiche des Prionproteins erforderlich. Wenn die Helix 1 nicht an der Umfaltung des Prionproteins beteiligt ist, müssen zumindest Teile der Helices 2 und 3 ihre Struktur im PrP^{Sc} verändern.

Aus dieser Sicht erscheint es sinnvoll, die Aggregation der humanen Prionproteinfragmente *humPrP23-194* und *humPrP23-199* sowie des Volllängen-Prionproteins zu untersuchen. Durch einen Vergleich der Aggregation dieser Fragmente bzw. des Volllängen-Prionproteins könnte der Einfluss der Helix 2, der Helix 3 und des *Turns* zwischen Helix 2 und Helix 3 untersucht werden, die als indirektes Resultat dieser Arbeit in die PrP^{Sc}-Bildung involviert sind. Eine quantitative FTIR-Spektroskopie der fibrillären Prionproteine könnte einen Einblick darüber geben, welche Struktur diese Segmente im aggregiertem Zustand einnehmen. Auf diese Weise könnte ein vertiefender Einblick in den Mechanismus der Aggregation des humanen Prionproteins und seiner Amyloidstruktur gewonnen werden. Zusätzlich könnte eine sehr viel versprechende neuere Methode der Festkörper-NMR-Strukturanalyse eingesetzt werden, anhand derer eine definitive Aussage über die Struktur des fibrillären Prionproteins getroffen werden könnte.

6. Zusammenfassung

Bei den Prionerkrankungen wird das α -helikale PrP^C in ein β -Faltblatt-reiches, Proteinase K resistentes aggregiertes PrP^{Sc} umgewandelt. Obwohl im Gegensatz zur Region 90-145 keine direkten Evidenzen für eine Umfaltung der Region 146-175 bestanden, gingen alle bisherigen PrP^{Sc}-Strukturmodelle davon aus, dass die Helix 1 (AS 144-156) in β -Faltblatt umgewandelt wird. Daher wurde erstmals die Aggregation der Prionproteinfragmente *humPrP23-159*, ein GSS-assoziiertes humanpathogenes Prionprotein, und *humPrP23-173* im Vergleich zu *humPrP23-144* unter physiologischen Bedingungen untersucht. Trotz einer deutlich schnelleren Aggregation von *humPrP23-159* im Vergleich zu *humPrP23-144* stellte sich überraschenderweise heraus, dass Helix 1 nicht in β -Faltblatt konvertiert wird. Dieser Effekt lässt sich nur durch intermolekulare ionische Wechselwirkung zwischen den zu 50 % geladenen Helix 1 –Segmenten erklären. Der aggregationsbeschleunigende Einfluß des β -Strand S2 enthaltenden Segmentes 160-173 in *humPrP23-173* im Vergleich zu *humPrP23-159*, sowie die erhöhte Proteinase K-Resistenz des fibrillären *humPrP23-173* legt nahe, dass dieser Bereich unter Ausbildung von intermolekularem β -Faltblatt direkt an der Aggregation beteiligt ist.

Um herauszufinden welchen Einfluß der pH-Wert auf die spontane Aggregation des Prionproteins während der Endozytose hat, wurde die pH-Abhängigkeit der Aggregation unter physiologischen, nicht-denaturierenden Bedingungen anhand der Prionproteinfragmente *humPrP23-144* und *humPrP23-159* bestimmt. Im Gegensatz zu unter denaturierenden Bedingungen durchgeführten Arbeiten, konnten fibrilläre Strukturen der Prionproteinfragmente nur oberhalb eines pH-Wertes von 6.0 beobachtet werden. Daher ist fraglich, ob die Erniedrigung des pH-Wertes in den endosomalen Kompartimenten während der Endozytose tatsächlich die spontane Aggregation des Prionproteins, wie bisher angenommen, fördert.

Vergleicht man die β -Faltblattanteile des Proteinase K resistenten PrP^{Sc} (~AS 90-231) mit denen der fibrillären Aggregate von *humPrP23-159* und *humPrP23-144*, sowie die α -helikalen Anteile von PrP^{Sc} mit denen im PrP^C, so müssten in der Region 145-231 annähernd genau so viele Aminosäuren in β -Faltblatt umgewandelt werden, wie an α -Helix verloren gehen. Da die Helix 1 nicht in β -Faltblatt umgewandelt wird, müssen die bisher nicht berücksichtigten Helices 2 und 3 an der Umfaltung beteiligt sein. Das würde auch die ungewöhnliche Proteinase K Resistenz der Region 176-231 im PrP^{Sc} mit den Helices 2 und 3 im Vergleich zum PrP^C erklären. Unterstützt wird dies zusätzlich durch die Tatsache, dass die Erzeugung der Infektiösität von der Gegenwart der Helix 2 und 3 abhängig ist. Daher scheint der Mechanismus der spontanen Aggregation des Prionproteins *in vivo* deutlich anders abzulaufen, als bisher angenommen.

7. Literaturverzeichnis

Alper, T., Haig, D. A., Clarke, M. C. (1966). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **22**, 278-284.

Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A., Clarke, M. C. (1967). *Nature* **214**, 764-766.

Anfinsen, C. B. (1973). *Science* **181**, 223-30.

Apetri, A. C., Surewicz, W. K. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 22187-22192.

Arnold, J. E., Tipler, C., Laszlo, L., Hope, J., Landon, M., Mayer, R. J. (1995). *J. Pathol.* **176**, 403-411.

Barghorn, S., Mandelkow, E. (2002). *Biochemistry* **41**, 14885-96.

Baskakov, I. V., Legname, G., Prusiner, S. B., Cohen, F. E. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 19687-90.

Bax, A., and Grzesiek, S. (1993). *Accounts Chem. Res.* **26**, 131-138.

Beranger, F., Mange, A., Goud, B., Lehmann, S. (2002). *J Biol Chem.* **277**, 38972-7.

Bessen, R. A., Marsh, R. F. (1992). *J. Virol.* **66**, 2096-2101.

Bessen, R. A., Marsh, R. F. (1994). *J. Virol.* **68**, 7859-7868.

Bessen, R. A., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., Nandan, S., Lansbury, P. T., Caughey, B. (1995). *Nature* **375**, 698-700.

Bjerrum, O.J. und Nielsen, C. S. (1986). *Electrophoresis*. VCH Publishers, Deerfield Beach, Fla., 315-327.

Bocharova, O. V., Breydo, L., Salnikov, V. V., Baskakov, I. V. (2005a). *Biochemistry* **44**, 6776-87.

Bocharova O. V., Breydo, L., Parfenov, A. S., Salnikov, V. V., Baskakov, I. V. (2005b). *J Mol Biol.* **346**, 645-59.

Böhm, G., Muhr, R. & Jaenicke, R. (1992). *Prot. Eng.* **5**, 191-195.

Borchelt, D. R., Taraboulos, A., Prusiner, S. B. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 16188-16199.

Bosques, C. J., Imperiali, B. (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 7593-8.

Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C., Aguzzi, A. (1996a). *Nature* **379**, 339-346.

Brandner, S., Raeber, A., Sailer, A., Blättler, T., Fischer, M., Weissmann, C., Aguzzi, A. (1996b). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13148-13151.

Breydo, L., Bocharova, O. V., Baskakov, I. V. (2005). *Anal Biochem.* **339**, 165-73.

Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., Kretzschmar, H. A. (1997). *Nature* **390**, 684-687.

Brown, D. R. (2001). *Brain Res Bull.* **55**, 165-73.

Brown, P., Gibbs, C. J. Jr., Rodgers-Johnson, P., Asher, D. M., Sulima, M. P., Bacote, A., Goldfarb, L. G., Gajdusek, D. C. (1994). *Ann Neurol.* **35**, 513-29.

Bruce, M. E., McConnell, I., Fraser, H., Dickinson, A. G. (1991). *J Gen Virol.* **72**, 595-603

Bruce, M. E., Chree, A., McConnell, I., Foster, J., Pearson, G., Fraser, H. (1994). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **343**, 405-411.

Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnel, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., Bostock, C. J. (1997). *Nature* **389**, 498-501.

Bruce, M. (2003). *British Medical Bulletin* **66**, 99–108.

Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., Weissmann, C. (1992). *Nature* **356**, 577-582.

Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R.-A., Autenried, P., Aguet, M. und Weissmann, C. (1993). *Cell* **73**, 1339-1347.

Bullock, W. O., Fernandez, J. M und Short, J. M. (1987). *BioTechniques* **5**, 376-378.

Calzolari, L., Zahn, R. (2003). *J Biol Chem.* **278**, 35592-6.

Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J., & Chesebro, B. (1989). *J. Virol.* **63**, 175-181.

Caughey, B. W., Dong, A., Bhat, K. S., Ernst, D., Hayes, S. F., Caughey, W. S. (1991). *Biochemistry* **30**, 7672-7680.

Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E., Oldstone, M.. (2005). *Science.* **308**, 1435-9.

Chiarini, L. B., Freitas, A. R., Zanata, S. M., Brentani, R. R., Martins, V. R., Linden, R. (2002). *EMBO J.* **21**, 3317-26.

Cohen, F.E. (1999). *J Mol Biol.* **293**, 313-20.

Cohen, E. and Taraboulos, A. (2003). *EMBO J.* **22**, 404–417.

Collinge, J. (2005). *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **76**, 906-919.

Cordeiro, Y., Kraineva, J., Gomes, M. P., Lopes, M. H., Martins, V. R., Lima, L. M., Foguel, D., Winter, R., Silva, J. L. (2005). *Biophys J.* **89**, 2667-76.

Creutzfeldt, H. G. (1920). *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* **57**, 1-18.

Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G. W., Zhu, G., Pfeifer, J. and Bax, A. (1995). *J. Biom. NMR* **6**, 277-293.

DeMarco, M.L., Daggett, V. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 2293-2298.

Dickinson, A. G. (1976). *Front Biol.* **44**, 209-41.

Diener, T. O., McKinley, M. P., Prusiner, S. B. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5220-5224.

Enari, M., Flechsig, E., Weissmann, C. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 9295-9.

Flechsig, E., Shmerling, D., Hegyi, I., Raeber, A. J., Fischer, M., Cozzio, A., von Mering, C., Aguzzi, A., Weissmann, C. (2000). *Neuron* **27**, 399-408.

Frankenfield, K. N., Powers, E. T., Kelly, J. W. (2005). *Protein Sci.* **14**, 2154-66.

Gajdusek, D. C., Zigas, V. (1959). *Am. J. Med.* **26**, 442-469.

Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., Chen, S. G. (2003). *Br Med Bull.* **66**, 213-39.

Gasset, M., Baldwin, M. A., Fletterick, R. J., Prusiner, S. B. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 1-5.

Gerstmann, J., Sträussler, E., Scheinker, I. (1936). *Z. Neurol.* **154**, 736-762.

Ghetti, B., Piccardo, P., Spillantini, M. G., Ichimiya, Y., Porro, M., Perini, F., Kitamoto, T., Tateishi, J., Seiler, C., Frangione, B., Bugiani, O., Giaccone, G., Prelli, F., Goedert, M., Dlouhy, S. R., Tagliavini, F. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 744-8.

Ghetti, B., Tagliavini, F., Takao, M., Bugiani, O., Piccardo, P. (2003). *Clin Lab Med.* **23**, 65-85.

Gill, S. C., von Hippel, P. H. (1989). *Anal Biochem* **182**, 319-326.

Glatzel, M., Stoeck, K., Seeger, H., Luhrs, T., Aguzzi, A. (2005). *Arch Neurol.* **62**, 545-552.

Goldfarb, L. G., Petersen, R. B., Tabaton, M., Brown, P., LeBlanc, A. C., Montagna, P., Cortelli, P., Julien, J., Vital, C., Pendelbury, W. W., Haltia, M., Wills, P. R., Hauw, J.-J., McKeever, P. E., Monari, L., Schrank, B., Swergold, G. D., Autilio-Gambetti, L., Gajdusek, D. C., Lugaresi, E., Gambetti, P. (1992). *Science* **258**, 806-808.

Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. (2004). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 8342-7.

Griffith, J. S. (1967). *Nature* **215**, 1043-1044.

Haire, L. F., Whyte, S. M., Vasisht, N., Gill, A. C., Verma, C., Dodson, E. J., Dodson, G. G., Bayley, P. M. (2004). *J Mol Biol.* **336**, 1175-83.

Hanahan, D. (1983). *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-580.

Harris, D.A. (2003). *British Medical Bulletin* **66**, 71-85.

Heppner, F. L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M. A., Rulicke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R. M., Kalinke, U., Aguzzi, A. (2001). *Science* **294**, 178-82.

Hill, A.F., Desbruslais, M., Joiner, S. (1997) *Nature* **389**, 448-50.

Hornemann, S., Korth, C., Oesch, B., Riek, R., Wider, G., Wuthrich, K., Glockshuber, R. (1997). *FEBS Lett.* **413**, 277-81

Hornshaw, M. P., McCermott, J. R., Candy, J. M. (1995). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **207**, 621-629.

Hoyer, W., Cherny, D., Subramaniam, V., Jovin, T. M. (2004). *Biochemistry* **43**, 16233-16242.

Hsiao, K., Dlouhy, S. R., Farlow, M. R., Cass, C., DaCosta, M., Conneally, P. M., Hodes, M. E., Ghetti, B., Prusiner, S. B. (1992). *Nat Genet.* **1**, 68-71.

Hsiao, K. K., Groth, D. F., Scott, M., Yang, S. L., Serbam, H., Rapp, D., Foster, D., Torchia, M., DeArmond, S. J. und Prusiner, S. B. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9126-9130.

Huang, Z., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. (1996). *Fold Des.* **1**, 13-19.

Ironside, J. W., Ritchie, D. L., Head, M. W. (2005). *Neuropathol Appl Neurobiol.* **31**, 565-79.

Jakob, A. (1921). *Z. Gesamte Neurol. Psychiatr.* **64**, 147-228.

Jamin, N., Coic, Y. M., Landon, C., Ovtracht, L., Baleux, F., Neumann, J. M., Sanson, A. (2002). *FEBS Lett.* **529**, 256-60.

Jones, E. M. & Surewicz, W. K. (2005). *Cell* **121**, 63-72.

Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C. M., Wallace, A. C., James, T. J., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10069-10074.

Kascsak, R. J., Rubenstein, R., Merz, P. A., Tonna-DeMasi, M., Fersko, R., Carp, R. I., Wisniewski, H. M. und Diringer, H. (1987). *Journal of Virology* **61**, 3688-3693.

Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S. B., Riesner, D. (1992a). *J. Gen. Virol.* **73**, 1025-1029.

Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S. B., Riesner, D. (1992b). *Arch. Virol. Suppl.* **7**, 215-225.

Khurana, R., Fink, A.L. (2000). *Biophys J.* **78**, 994-1000.

Kocisko, D.A., Lansbury Jr, P.T., Caughey, B. (1996). *Biochemistry* **35**, 13434-42.

Korth, C., Stierli, B., Streit, P., Moser, M., Schaller, O., Fischer, R., Schulz-Schaeffer, W., Kretzschmar, H., Raeber, A., Braun, U., Ehrensperger, F., Hornemann, S., Glockshuber, R., Riek, R., Billeter, M., Wuthrich, K., Oesch, B. (1997). *Nature.* **390**, 74-7.

Kozin, S. A., Bertho, G., Mazur, A. K., Rabesona, H., Girault, J. P., Haertle, T., Takahashi, M., Debey, P., Hoa, G. H. (2001). *J Biol Chem.* **276**, 46364-70.

Kramer, M. L., Kratzin, H. D., Schmidt, B., Römer, A., Windl, O., Liemann, S., Hornemann, S., Kretzschmar, H. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**, 16711-16719.

Krasemann, S., Groschup, M. H., Harmeyer, S., Hunsmann, G. und Bodemer, W. (1996). *Molecular Medicine* **2**, 725-734.

Kretzschmar, H. A., Stowring, L. E., Westaway, D., Stubblebine, W. H., Prusiner, S. B., DeArmond S. J. (1986). *DNA* **5**, 315-324.

Kretzschmar, H., Kapitel 26: „Die Pathologie und Genetik der Prionkrankheiten beim Menschen“ aus Hörnlimann, B., Kretzschmar, H., Riesner, D. (Hrsg.) (2001). „Prionen und Prionerkrankungen“, Walter de Gruyter-Verlag, New York, 207-224.

Kundu, B., Maiti, N. R., Jones, E. M., Surewicz, K. A., Vanik, D. L. & Surewicz, W. K. (2003). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12069-12074.

Kyhse-Andersen, J. (1984). *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 203-209.

Laemmli, U. K. (1970). *Nature* **227**, 680-685.

Lasmézas, C. I., Deslys, J.-P., Demaimy, R., Adjou, K. T., Dormont, D., Robain, O., Ornside, J., Hauw, J.-J. (1996). *Nature* **381**, 743-744.

Lee, K. S., Magalhaes, A. C., Zanata, S. M., Brentani, R. R., Martins, V. R., Prado, M. A. (2001) *J Neurochem.* **79**, 79-87.

Li, W., West, N.; Colla, E., Pletnikova, O., Troncoso, J. C., Marsh, L., Dawson, T. M., Jakala, P., Hartmann, T., Price, D. L., Lee, M. K. (2005). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 2162-2167.

Liemann, S., Glockshuber, R. (1999). *Biochemistry* **38**, 3258-67.

Liu, H., Farr-Jones, S., Ulyanov, N. B., Llinas, M., Marqusee, S., Groth, D., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., James, T. L. (1999). *Biochemistry* **38**, 5362-77.

Ma, J., Lindquist, S. (2002). *Science* **298**, 1785-8.

Ma, J., Wollmann, R., Lindquist, S. (2002). *Science* **298**, 1781-5.

Mallucci, G. R., Ratte, S., Asante, E. A., Linehan, J., Gowland, I., Jefferys, J. G., Collinge, J. (2002). *EMBO J.* **21**, 202–210.

Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P. C., Brandner, S., Collinge, J. (2003). *Science* **302**, 871–874.

Manetto, V., Medori, R., Cortelli, P., Montagna, P., Tinuper, P., Baruzzi, A., Rancurel, G., Hauw, J.-J., Vanderhaeghen, J.-J., Maillieux, P., Bugiani, O., Tagliavini, F., Bouras, C., Rizzuto, N., Lugaresi, E., Gambetti, P. (1992). *Neurology* **42**, 312-319.

Masters, C. L., Gajdusek, D. C. und Gibbs, C. J. (1981). *Brain* **104**, 559-588.

McKinley, M. P., Taraboulos, A., Kenaga, L., Serban, D., Stieber, A., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Gonatas, N. (1991). *Lab. Invest.* **65**, 622-630.

Medori, R., Tritschler, H.-J., LeBlanc, A., Villare, F., Manetto, V., Chen, H. Y., Xue, R., Leal, S., Montagna, P., Cortelli, P., Tinuper, P., Avoni, P., Mochi, M., Baruzzi, A., Hauw, J.-J., Ott, J., Lugaresi, E., Autilio-Gambetti, L., Gambetti, P. (1992). *N. Engl. J. Med.* **42**, 444-449.

Meyer, N. Rosenbaum, V., Schmidt, B., Gilles, K., Mirenda, C., Groth, D., Prusiner, S. B., Riesner, D. (1991). *J. Gen. Virol.* **72**, 37-50.

Mironov, A. Jr., Latawiec, D., Wille, H., Bouzamondo-Bernstein, E., Legname, G., Williamson, R. A., Burton, D., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Peters, P. J. Jr. (2003). *J. Neurosci.* **23**, 7183–7193

Morillas, M., Vanik, D. L., Surewicz, W.K. (2001). *Biochemistry* **40**, 6982-6987.

Moroncini, G., Kanu, N., Solfrosi, L., Abalos, G., Telling, G. C., Head, M., Ironside, J., Brockes, J. P., Burton, D. R., Williamson, R. A. (2004). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 10404-9.

Morrissey, M. P. & Shakhnovich, E. I. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11293-8.

Mouillet-Richard, S., Pietri, M., Schneider, B., Vidal, C., Mutel, V., Launay, J. M., Kellermann, O. (2005). *J Biol Chem.* **280**, 4592-601.

Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). *Meth. Enzymol.* **155**, 335-350.

Muramoto, T., Scott, M., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 15457-62.

Murray, I. V., Giasson, B. I., Quinn, S. M., Koppaka, V., Axelsen, P. H., Ischiropoulos, H., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M. (2003). *Biochemistry* **42**, 8530-40.

Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. und Sugino, Y. (1990). *Nucleic Acids Research* **18**, 6169.

Norstrom, E. M., Mastrianni, J. A. (2006). *J Virol.* **80**, 8521-9.

Pan, K.-M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Servan, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10962-10966.

Paramithiotis, E., Pinard, M., Lawton, T., LaBoissiere, S., Leathers, V. L., Zou, W. Q., Estey, L. A., Lamontagne, J., Lehto, M. T., Kondejewski, L. H., Francoeur, G. P., Papadopoulos, M., Haghghat, A., Spatz, S. J., Head, M., Will, R., Ironside, J., O'Rourke, K., Tonelli, Q., Ledebur, H. C., Chakrabarty, A., Cashman, N. R. (2003). *Nat. Med.* **9**, 893-9.

Parchi, P., Chen, S. G., Brown, P., Zou, W., Capellari, S., Budka, H., Hainfellner, J., Reyes, P. F., Golden, G. T., Hauw, J. J., Gajdusek, D. C., Gambetti, P. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**, 8322-7.

Parchi, P., Zou, W., Wang, W., Brown, P., Capellari, S., Ghetti, B., Kopp, N., Schulz-Schaeffer, W. J., Kretzschmar, H. A., Head, M. W., Ironside, J. W., Gambetti, P., Chen, S. G. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 10168-72.

Pauly, P. C., Harris, D. A. (1998). *J Biol Chem.* **273**, 33107-10.

Pawar, A. P., Dubay, K. F., Zurdo, J., Chiti, F., Vendruscolo, M., Dobson, C. M. (2005). *J. Mol. Biol.* **350**, 379-92.

Peretz, D., Williamson, R. A., Matsunaga, Y., Serban, H., Pinilla, C., Bastidas, R. B., Rozenshteyn, R., James, T. L., Houghten, R. A., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Burton, D. R. (1997). *J. Mol. Biol.* **273**, 614-22.

Perrier, V., Solassol, J., Crozet, C., Frobert, Y., Mourton-Gilles, C., Grassi, J., Lehmann, S. (2004). *J. Neurochem.* **89**, 454-63.

Peters P. J., Mironov, A., Vey, M., Peretz, D., van Donselaar, E., Leclerc, E., Erpel, S., DeArmond, S. J., Burton, D. R., Williamson, R. A., Prusiner, S. B. (2003). *J Cell Biol* **162**, 703-717.

Prado, M. A. et al. (2004). *J. Neurochem.* **88**, 769–781.

Prusiner, S. B. (1982). *Science* **216**, 136-144.

Rezaei, H., Marc, D., Choiset, Y., Takahashi, M., Hui Bon Hoa, G., Haertle, T., Grosclaude, J., Debey, P. (2000). *Eur J Biochem.* **267**, 2833-9.

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. und Wüthrich, K. (1996). *Nature* **382**, 180-182.

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R., Wüthrich, K. (1997). *FEBS Lett.* **413**, 282-288.

Righetti, P. G., Verzola, B. (2001). *Electrophoresis* **22**, 2359-74.

Robinson, A.B., Rudd, C.J. (1974). *Curr Top Cell Regul.* **8**, 247-95.

Rogers, M., Yehiely, F., Scott, M., Prusiner, S. B. (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 3182-3186.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K.B. und Erlich, H. A. (1988). *Science* **239**, 487-491.

Salmona, M., Morbin, M., Massignan, T., Colombo, L., Mazzoleni, G., Capobianco, R., Diomede, L., Thaler, F., Mollica, L., Musco, G., Kourie, J. J., Bugiani, O., Sharma, D., Inouye, H., Kirschner, D. A., Forloni, G., Tagliavini, F. (2003). *J Biol Chem.* **278**, 48146-53.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed.. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sarnataro, D., Campana, V., Paladino, S., Stornaiuolo, M., Nitsch, L., Zurzolo, C. (2004). *Mol Biol Cell*. **15**, 4031-42.

Schätzl, H. M., DaCosta, M., Taylor, L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. (1995). *J. Mol. Biol.* **245**, 362-374.

Schmid, F.X. (1989). "Spectral methods of characterizing protein conformation and conformational changes". In Creighton, T.E., ed. *Protein structure, a practical approach*. Oxford University Press.

Schwarzinger, S., Kroon, G.J., Foss, T.R., Chung, J., Wright, P.E., Dyson, H.J. (2001). *J Am Chem Soc.* **123**, 2970-2978.

Scott, M. R., Will, R., Ironside, J. W., Nguyen, H.-O. B., Tremblay, P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 15137-15142.

Sharman, G. J., Kenward, N., Williams, H. E., Landon, M., Mayer, R. J., Searle, M. S. (1998). *Fold. Des.* **3**, 313-20.

Sokolowski, F., Modler, A. J., Masuch, R., Zirwer, D., Baier, M., Lutsch, G., Moss, D. A., Gast, K., Naumann, D. (2003). *J Biol Chem.* **278**, 40481-92.

Speare, J., Rush III, T., Bloom, M., Caughey, B. (2003). *J. Biol. Chem* **278**, 12522–12529.

Studier, F. W. und Moffatt, B. A (1986). *Journal of Molecular Biology* **189**, 113-130.

Swietnicki, W., Petersen, R., Gambetti, P., Surewicz W. K. (1997). *J Biol Chem.* **272**, 27517-27520.

Swietnicki, W., Petersen, R. B., Gambetti, P., Surewicz, W. K. (1998). *J Biol Chem.* **273**, 31048-52.

Swietnicki, W., Morillas, M., Chen, S. G., Gambetti, P., Surewicz, W. K. (2000). *Biochemistry* **39**, 424-431.

Taraboulos, A., Raeber, A. J., Borchelt, D. R., Serban, D., Prusiner, S. B. (1992). *Mol Biol Cell*. **3**, 851-63.

Tateishi, J., Kitamoto, T., Hoque, M. Z., Furukawa, H.. (1996). *Neurology* **46**, 532-7.

Tizzano, B., Palladino, P., De Capua, A., Marasco, D., Rossi, F., Benedetti, E., Pedone, C., Ragone, R., Ruvo, M. (2005). *Proteins*. **59**, 72-9.

Tobias, J.W., Shrader, T. E., Rocap, G., Varshavsky, A. (1991). *Science* **254**, 1374-1377.

Torrent, J., Alvarez-Martinez, M. T., Harricane, M. C., Heitz, F., Liautard, J. P., Balny, C., Lange, R.(2004). *Biochemistry* **43**, 7162-70.

Towbin, H., Staehlin, T. und Gordon, J. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.

Towbin, H. und Gordon, J. (1984). *J. Immunol. Meth.* **72**, 313.

Vanik, D. L., Surewicz, K. A. & Surewicz, W. K. (2004). *Mol. Cell* **14**, 139-45.

Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G. W, Taraboulos, A., Prusiner, S. B. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 14945-14949.

Viles, J. H., Cohen, F. E. Prusiner, S. B., Goodin, D. B., Wright, P. E., Dyson, H. J. (1999). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 2042-2047.

Von Bergen, M., Friedhoff, P., Biernat, J., Heberle, J., Mandelkow, E. M., Mandelkow, E. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5129-34.

Vorberg, I., Chan, K., Priola, S. A. (2001). *J Virol.* **75**, 10024-32.

Vorm, O., Mann, M. (1994). *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **5**, 955-958.

Watanabe, Y., Inanami, O., Horiuchi, M., Hiraoka, W., Shimoyama, Y., Inagaki, F., Kuwabara, M. (2006). *Biochem Biophys Res Commun.* **350**, 549-56.

Watt, N. T., Hooper, N. M. (2003). *Trends Biochem Sci.* **28**, 406-410.

Watzlawik, J., Skora, L., Frense, D., Griesinger, C., Zweckstetter, M., Schulz-Schaeffer, W. J., Kramer, M. L. (2006). *J Biol Chem.* **281**, 30242-50.

Weise, J., Crome, O., Sandau, R., Schulz-Schaeffer, W., Bähr, M., Zerr, I. (2004) *Neurosci Lett.* **372**, 146-50.

Weise, J., Sandau, R., Schwarting, S., Crome, O., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., Zerr, I., Bähr, M. (2006). *Stroke* **37**, 1296-1300.

Welker, E., Wedemeyer, W. J., Scheraga, H. A. (2001). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 4334-4336.

Wille, H., Zhang, G.F., Baldwin, M.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. (1996). *J Mol Biol.* **259**, 608-21.

Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A., Prusiner, S. B. (2002). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 3563-8.

Wiltfang, J., Arold, N., Neuhoff, V. (1991). *Electrophoresis* **12**, 352-66.

Wishart, D. S., Sykes, B. D. (1994). *Methods Enzymol.* **239**, 363-392.

Wong, B. S., Brown, D. R., Pan, T., Whiteman, M., Liu, T., Bu, X., Li, R., Gambetti, P., Olesik, J., Rubenstein, R., Sy, M. S. (2001). *J Neurochem.* **79**, 689-698.

Wopfner, F., Weidenhöfer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T. F., Werner, T., Schätzl, H. M. (1999). *J. Mol. Biol.* **289**, 1163-1178.

Wright, H. T. (1991). *Protein Eng.* **4**, 283-294.

Zahn, R., von Schroetter, C., Wuthrich, K. (1997). *FEBS Lett.* **417**, 400-4.

Zahn, R., Liu, A., Lührs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Garcia, F. L., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G., Wüthrich, K. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 145–150.

Zahn, R. (2003). *J Mol Biol.* **334**, 477-88.

Zandomenighi, G., Krebs, M. R., McCammon, M. G., Fandrich, M. (2004). *Protein Sci.* **13**, 3314-21.

Ziegler, J., Sticht, H., Marx, U. C., Müller, W., Rosch, P., Schwarzinger, S. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 50175-81.

Danksagungen

Herrn PD Dr. Walter Schulz-Schaeffer danke ich für die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung und für das Vertrauen, welches mir ermöglichte meine wissenschaftlichen Ideen zu entwickeln und zu verwirklichen.

Herrn Prof. Dr. Fritz danke ich für die stets interessierte und sehr freundliche Art, mit der er diese externe Arbeit betreut hat

Bei Dr. Michael Kramer bedanke ich mich für die zahlreichen wissenschaftlichen Gespräche, sowie für sein stets vorhandenes Interesse an meiner Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Arne Wrede, Dr. Erik Bahn, Dr. Uwe Hahmann, Dr. Christina Behrens, Wiebke Wemheuer, Nadine Rupprecht, Tatjana Pfander, Manuela Becker und Elke Pralle für das sehr gute Arbeitsklima, den regen Gedankenaustausch und den Spass bei der Arbeit.

Herzlicher Dank gilt auch meinen Eltern, ohne deren Hilfe mein Studium nicht möglich gewesen wäre und die mich in jeder Hinsicht immer unterstützt haben.

Lebenslauf

Jens Watzlawik

| | |
|-----------------|--|
| 03.06.1972 | geboren in Stadthagen |
| 1978-1982 | Besuch der Grundschule Lindhorst |
| 1982-1984 | Besuch der Orientierungsstufe Lindhorst |
| 1984-1991 | Besuch des Ratsgymnasiums in Stadthagen |
| 1991 | Abitur |
| 1991 | Immatrikulation an der Georg-August-Universität zu Göttingen im Studienfach Chemie (Diplom) |
| 1996-1997 | Experimentelle Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Göttingen unter der Anleitung von Prof. Dr. Tietze mit dem Thema „Radikalische und nichtradikalische Cyclisierungen“ |
| 1997 | Diplom im Studiengang Chemie |
| 1997-2002 | Studium der Biologie (LA/Gymnasien) an der Georg-August-Universität zu Göttingen |
| 2002 | 1. Staatsexamen im Studiengang LA/Gymnasien in den Fächern Biologie und Chemie |
| 10.2002-12.2006 | Beginn der Arbeit zur vorliegenden Dissertation am Institut für Neuropathologie der Universität Göttingen (PD Dr. W. Schulz-Schaeffer) |