

Biophysikalische Charakterisierung des Vorläufer- und Endzustandes von Fibrillen aus rekombinanten und natürlichen Prion- Proteinen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Jan Stöhr
aus Bottrop

Düsseldorf 2007

Angefertigt im

Institut für Physikalische Biologie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Betreuer:

Prof. Dr. D. Riesner

2. Gutachter:

Prof. Dr. D. Willbold

3. Gutachter:

Priv. Doz. Dr. med. Carsten Korth, Ph. D.

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2007

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie Zitate kenntlich gemacht habe.

Düsseldorf, den 21.09.2007

(Jan Stöhr)

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Riesner, der mir diese Arbeit überhaupt erst ermöglichte. Durch seine stetige Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit der freien Wahl von Kooperationspartnern trug er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Bei Prof. Willbold bedanke ich mich für die nette Kooperation im Bereich der Alzheimer-Erkrankung und seine Unterstützung des gesamten Instituts. Für eine ebenso nette wie kompetente Betreuung und Hilfestellung bei der Elektronenmikroskopie möchte ich mich bei Friedrich Kopp und Kay Jeruschke bedanken, die immer Geduld hatten und mir eine Menge ihrer Zeit opferten. Vielen Dank an unseren Kooperationspartner S. B. Prusiner, der es mir ermöglichte, in San Francisco zu arbeiten. Ein spezieller Dank gilt Holger Wille mit dem ich mich ständig austauschen konnte und der mir in vielen Situationen der Arbeit geholfen hat.

Danke auch an Heidi Gruber, die immer einen Ausweg wusste und mir in unzähligen Situationen geholfen hat.

Der gesamten Prion – Gruppe danke ich für die volle Unterstützung meiner Arbeit und der tollen Zeit in der Biophysik!

Meiner Sylvie danke ich für unseren gemeinsamen Weg und der grammatikalischen Auseinandersetzung mit dieser Arbeit.

Ein ganz großes „Danke“ geht an meine Eltern, meine Schwester, und die ganze Familie Borghardt, die immer zu mir standen und mich über Jahre hinweg unterstützten.

Danke auch an alle meine Freunde, die in der „forschungsfreien“ Zeit immer für mich da waren.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	IV
Verzeichnis der Abkürzungen.....	VI
1. Einleitung	1
1.1 Proteinfaltung.....	1
1.2 Amyloide Proteinfehlfaltungskrankheiten.....	4
1.3 Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE).....	6
1.3.1 Scrapie.....	8
1.3.2 Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	8
1.3.3 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD).....	9
1.4 Das Prion-Protein	10
1.4.1 Die Prion-Hypothese.....	10
1.4.2 Die zelluläre Isoform des Prion-Proteins (PrP ^C)	11
1.4.3 Die infektiöse Isoform des Prion-Proteins (PrP ^{Sc}).....	14
1.5 Modelle zur Replikation des Erregers.....	16
1.6 <i>In vitro</i> Konversion des Prion-Proteins	18
1.6.1 <i>De novo</i> Amplifikation von PrP ^{Sc} durch natürliche Prionen.....	19
1.6.2 Spontane <i>in vitro</i> Konversion.....	19
1.6.3 <i>In vitro</i> Konversion mit Natriumdodecylsulfat (SDS).....	20
1.7 Fragestellung	23
2. Material und Methoden.....	25
2.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	25
2.2 Verwendete Antikörper	26
2.3 Prion-Proteine.....	27
2.3.2 CHO-PrP ^C	27
2.3.3 Expression und Aufreinigung rekombinanter Prion-Proteine.....	27
2.3.3.1 Expression rekombinanter Prion Proteine	28
2.3.3.2 Aufreinigung rekombinanter Prion-Proteine.....	28
2.3.4 De und Renaturierung des Protein-Lyophilisates	31
2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung	32
2.4.1 Absorptionsmessung	32
2.4.2 Micro BCA TM -Test	32
2. 5 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie.....	33
2.5.1 Prinzip des Zirkulardichroismus.....	33
2.5.2 Messung des Zirkulardichroismus	34

2.6 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.7 Semi-Dry-Western-Blot	36
2.8 Immunologischer Proteinnachweis	36
2.9 Proteolyse mittels Proteinase K	37
2.10 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)	38
2.10.1 Auftragung der Probe auf die präparierten Netze und Negativ Kontrastierung	39
2.10.2 Immunogold-Markierung von Proteinaggregaten.....	40
2.11 Zentrifugationen	42
2.11.1 Differentielle Ultrazentrifugation.....	42
2.11.2 Analytische Ultrazentrifugation	42
2.11.2 .1 Gleichgewichtszentrifugationsanalyse (M-Lauf)	43
2.12 Analyse der Dimer Kontaktstellen.....	45
2.13 Thioflavin T Messung.....	45
2.14 Tierversuche	46
2.14.1 Verwendete transgene Mauslinie.....	46
2.14.2 Vorbereitung aggregierter Proteine für den Tierversuch.....	47
2.15 Herstellung von Nitrozellulosepartikeln.....	47
3. Ergebnisse.....	49
3.1 Konversion von rekombinantem PrP (90-231).....	49
3.1.1 Elektronenmikroskopische Analyse von amyloiden Fibrillen	49
3.1.2 Sekundärstrukturanalyse des Fibrillen-Intermediärzustandes mittels Zirkular- dichroismus-Spektroskopie.....	50
3.1.3 Analyse des Intermediärzustandes durch analytische Ultrazentrifugation.....	52
3.1.4 Kovalente Verknüpfung des Dimers und anschließende massenspektrometrische Analyse	55
3.1.5 Nachweis amyloider Fibrillen durch Thioflavin T- Bindung	58
3.1.6 Beschleunigung der Fibrillogenese durch Konzentrationserhöhung.....	60
3.1.7 Partielle Resistenz gegenüber der Proteolyse durch Proteinase K	62
3.1.8 Einfluss amyloider Keime auf die Konversion von recPrP(90-231).....	64
3.2 Konversion von PrP ^C aus CHO-Zellen (CHO-PrP ^C).....	66
3.2.1 Löslichkeitsanalyse von PrP ^C nach 7 wöchiger Inkubation.....	67
3.2.2 Elektronenmikroskopische Analyse der PrP ^C -Aggregate.....	68
3.2.3 Immuno-Elektronenmikroskopische Analyse der CHO-PrP ^C -Fibrillen	71
3.2.4 Infektiositätstests mit CHO-PrP-Fibrillen.....	74
4. Diskussion.....	77
4.1 Der metastabile Intermediärzustand als Vorstufe der amyloiden Aggregation des Prion-Proteins	78

4.1.1 Strukturelle Auswirkung von Denaturierungsmitteln und NaCl	80
4.1.2 Ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht als Vorstufe amyloider Fibrillen	84
4.1.3 Molekulare Kontaktstellen im „NaCl-freien“ und teildenaturierten Dimer	86
4.2 Ausbildung amyloider Fibrillen des rekombinanten Prion-Proteins	88
4.3 Fibrilläre Strukturen von PrP ^C aus CHO-Zellen	93
4.3.3 Tierversuche mit fibrillärem CHO-PrP ^C	97
5. Ausblick.....	101
6. Zusammenfassung	103
7. Literaturverzeichnis.....	105

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1.1: Faltungstrichter für Proteine unter Berücksichtigung der Fehlfaltung	3
Tab. 1.1: Übersicht einiger ausgewählter Amyloidosen	5
Tab. 1.2: Übersicht der bekanntesten Prion-Erkrankungen	7
Abb. 1.2: Struktur von PrP ^C :	12
Tab. 1.3: Gegenüberstellung der Eigenschaften von PrP ^C und PrP ^{Sc}	14
Abb. 1.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Strukturmodell von PrP27-30	15
Abb. 1.4: Prion-Replikationsmodelle	18
Abb. 1.5: <i>In vitro</i> Konversion mit SDS	21
Abb. 1.6: Modifiziertes SDS-Konversionssystem zur Ausbildung fibrillärer Proteinaggregate von verschiedenen Prion-Proteinen	22
Abb. 2.1.: Schematischer Ablauf der Präparation von „inclusion bodies“ aus E. Coli-Zellen	29
Abb. 2.2: CD-Spektren typischer Sekundärstrukturelemente	34
Abb. 2.3: Thioflavin T	46
Abb. 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von recPrP(90-231)-Aggregaten	50
Abb. 3.2: Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie.....	51
Abb. 3.3: Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie.....	52
Abb. 3.4: Sedimentation-Diffusion-Gleichgewicht-Zentrifugationsprofil	54
Tab. 3.1: Zusammenfassung der AUZ-Ergebnisse	55
Abb. 3.5: SDS-PAGE-Analyse des Monomer-Dimer-Gleichgewichts	56
Abb. 3.6: ESI-LC-MS-Übersichtsspektren.....	57
Abb. 3.7: Thioflavin T Fluoreszenz-Emissionsspektren	59
Abb. 3.8: Elektronenmikroskopische Aufnahme amyloider Fibrillen	60
Abb. 3.9: Amyloide Strukturen nach einer Inkubation von 7 Tagen	61
Abb. 3.10: Proteinase K-Analyse amyloider Aggregate	63
Abb. 3.11: Proteinase K-Analyse des α -helikalen Ausgangsmaterials	63
Abb. 3.12: Kinetik der Fibrillogenese nach Zugabe eines amyloiden Keims	65
Abb. 3.13: Elektronenmikroskopische Aufnahme der keiminduzierten Fibrillenbildung	66
Abb. 3.14: Löslichkeitsanalyse von CHO-PrP ^C nach einer Inkubationszeit von 7 Wochen	68
Abb. 3.15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CHO-PrP-Fibrillen	68
Abb. 3.16: „Alternative“ fibrilläre Strukturen des CHO-PrP	70
Abb. 3.17: Thioflavin T Assay von CHO-PrP ^C -Fibrillen	71

Abb. 3.18: Immunogold-Markierung der CHO-PrP-Fibrillen mittels des Antikörpers R2 (Epitop: 225-231)	72
Abb. 3.19: Immunogold-Markierung der CHO-PrP-Fibrillen mittels des Antikörpers EST123 (Epitop: 30-37)	73
Tab. 3.2: Übersicht der Tierversuche mit fibrillärem CHO-PrP und den korrespondierenden Kontrollen.....	75
Abb. 4.1 Sekundärstrukturen von rekombinanten Prion-Proteinen	79
Abb. 4.2: Vergleich des Konversionssystem mit und ohne NaCl	81
Abb. 4.3: Hypothetischer Bildungsweg von PrP ^{amyloid} aus einem Monomer-Dimer Gleichgewicht und unter Berücksichtigung des trimeren Modells von PrP ^{Sc}	85
Abb. 4.4: Schematische Darstellung der PK-resistenten Fragmente nach Konversion von recPrP(90-231) in amyloide Fibrillen	91
Abb. 4.5: Epitope der zum Immunogold-Markierung verwendeten Antikörper	95

Verzeichnis der Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
Å	Angstrom
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
Aβ	Amyloid-β-Peptid
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
ca.	zirka
CCD	Charge Coupled Device
CD	Zirkulardichroismus
CHO-PrP ^C	zelluläres Prion-Protein aus der "Chinese-Hamster-Ovary"-Kultur
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
CV	Säulenvolumen
d.h.	das heißt
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI-LC-MS-	Elektrospray-Ionisation-Liquid Chromatography-Mass-Spectrometry
et al.	et alii
fCJD	familiäre Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography
FSE	Feline Spongiforme Enzephalopathie
g	Gramm
GdnHCl	Guanidinium Hydrochlorid
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
iCJD	iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
Ig	Immunoglobulin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
Kap.	Kapitel
Kap.	Kapitel
KCl	Kaliumchlorid

kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
LB	lysogeny broth
mA	Milliampere
mBar	Millibar
MgCl	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NaPi	Natriumphosphat Puffer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	Nuklearmagnetische Resonanz
nt	Nukleotide
O.I.E.	World organisation for animal health
OD600	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
PAGE	Polyachrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMCA	Protein Misfolding Cyclic Amplification
PrP	Prion-Protein
PrP amyloid	amyloides Prion-Protein
PrP27-30	N-terminal verkürzte, infektiöse Form des Prion-Proteins
PrPC	zelluläre Isoform des Prion-Proteins
PrPSc	infektiöse Isoform des Prion-Protein ("scrapie-Isoform")
PVDF	Polyvinylidenfluorid
recPrP(90-231)	rekombinant exprimiertes Prion-Protein der Sequenz 90-231
resPrP	Proteinase K resistentes Prion-Protein
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
RP-HPLC	Reversed Phase High Pressure Liquid Chromatography
rpm	Umdrehungen/Minute
s.	siehe
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
sCJD	spontane Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEC	Größenausschlusschromatographie
SHaPrP	Syrian Hamster Prion-Protein
SOD	Superoxiddismutase
solPrP27-30	inaktiviertes PrP27-30
ss-NMR	Festphasen NMR
S-Wert	Sedimentationskoeffizient
Tab.	Tabelle
TBS	TRIS buffered saline
TBST	TRIS buffered saline Tween

TEMED	Tetramethylethyldiamin
ThT	Thioflavin T
TME	Transmissible Mink Enzephalopathie
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
vCJD	variante Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung
vgl.	vergleiche
w/v	Gewicht/Volumen
w/w	Gewichtsprozent
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Proteinfaltung

Proteine werden in der Zelle als ungefaltete Polypeptidkette synthetisiert, nehmen aber schon während bzw. kurz nach ihrer Synthese ihre native und damit funktionelle Struktur ein. Dabei handelt es sich um ein komplexes System, da jede Aminosäure in der Polypeptidkette Freiheitsgrade in den zwei freien Drehwinkeln („phi“ und „psi“) besitzt. Müsste jede Aminosäure alle möglichen Winkel durchlaufen, so würde die Faltung eines Proteins mittlerer Größe eine fast unendliche Zeitspanne in Anspruch nehmen (Dill *et al.*, 1997). Zuerst ging man davon aus, dass das entsprechende Protein auf seinem Weg -langsam, d.h. Aminosäure um Aminosäure- vom ungefalteten („random-coil“) zum nativ-gefalteten Zustand übergeht. Da dies wie vorher schon erwähnt nicht der Fall sein kann, mussten neue Modelle und Mechanismen zur Proteinfaltung formuliert werden. Im Folgenden werden mögliche Modelle der Proteinfaltung vorgestellt.

Das zentrale Dogma des Modul-Modells geht davon aus, dass die dreidimensionale, funktionelle Struktur eines Proteins über seine schnell faltenden, intrinsischen Sekundärstrukturelemente (α -Helix, β -Faltblatt oder random coil-Anteile) als Gerüst angenommen wird („*framework-model*“). Diese „frühen“ Sekundärstrukturelemente bilden also den Startpunkt für die weitere dreidimensionale Faltung. Das Modell scheint aber mittlerweile nicht mehr auf alle Proteine übertragbar zu sein, denn viele Sekundärstrukturelemente innerhalb eines vollständig gefalteten Proteins zeigen als isolierte kleine Peptide nicht mehr die gleiche Faltung. Somit scheint diese Theorie nicht allgemein zuzutreffen (Epand *et al.*, 1968) bzw. für größere Proteine nicht einfach übertragbar zu sein.

Die Theorie des „*hydrophoben Kollaps*“ der ungefalteten Peptidkette geht davon aus, dass die treibende Kraft hinter diesem Faltungsweg die Freisetzung von komplexierten Wassermolekülen ist. Hierbei wird der Entropiegewinn des Systems durch das freigesetzte Wasser als maßgeblich treibende Kraft für die Proteinfaltung gesehen. Um die Kraft aber voll entfalten zu können, müsste die Peptidkette völlig

entfaltet sein, sich also in einem Zustand befinden, in dem sich möglichst alle Aminosäuren unabhängig voneinander verhalten können. Heute weiß man aber, dass dafür sehr harsche denaturierende Bedingungen herrschen müssen. Da die meisten Proteine in ihrem „entfalteten“ Zustand eine schnelle Fluktuation von Sekundärstruktur zeigen, kann in der Regel von einer gewissen Minimalstruktur des Proteins ausgegangen werden (Dobson, 1992). Somit können die hydrophoben Kräfte allein die Proteinfaltung nicht bestimmen.

Als Minimalstruktur kann man eine Struktur definieren, die nur ein Produkt der Kräfte ist, die versuchen, die Lösungsmittelkontakte des Proteins zu minimieren und die dabei schon nahe der nativen Struktur sein kann (Daggett *et al.*, 2003). Das „*Nukleations-Kondensations-Modell*“ stellt eine Mischung aus den beiden vorherigen Modellen dar (Fersht *et al.*, 1992). Die beiden vorherigen Modelle implizieren ein teilgefaltetes Intermediat und lassen damit nicht zu, dass ein Protein nach einem einfachen Zwei-Zustands-Modell (ungefaltet oder gefaltet) seine dreidimensionale Struktur einnimmt. Daher musste ein weiteres Modell eingeführt werden, was auch diese einfache und sehr schnelle Faltung berücksichtigen kann. In diesem Fall stabilisieren weitreichende ionische und lokale hydrophobe Wechselwirkungen im Protein die (dazwischen liegenden) schwachen Kräfte zur Ausbildung der Sekundärstruktur. Die stabilisierten Sekundärstrukturelemente bedingen nun wieder die korrekte dreidimensionale Faltung des gesamten Proteins.

Die ersten beiden Mechanismen können als Extreme des „*Nukleations-Kondensations*“-Modell angesehen werden. Um alle Modelle der Faltung zu vereinigen, wird oft der „Faltungstrichter“ als Modellvorstellung (Leopold *et al.*, 1992) der Proteinfaltung angegeben mit einer Vielzahl von Faltungsintermediaten, dargestellt als lokale Minima, und einem globalen Minimum, welches die native Struktur darstellt, in der Mitte. Dieses Modell lässt unterschiedlichste Faltungsmöglichkeiten und -wege für ein einzelnes Protein zu. Das Protein kann nach dieser Vorstellung auf dem steilsten (kinetisch schnellsten) Weg oder über mehrere lokale Minima (Intermediate) und Maxima (Übergangszustände) auf einem nicht-direkten Weg falten (s. Abb.1.1).

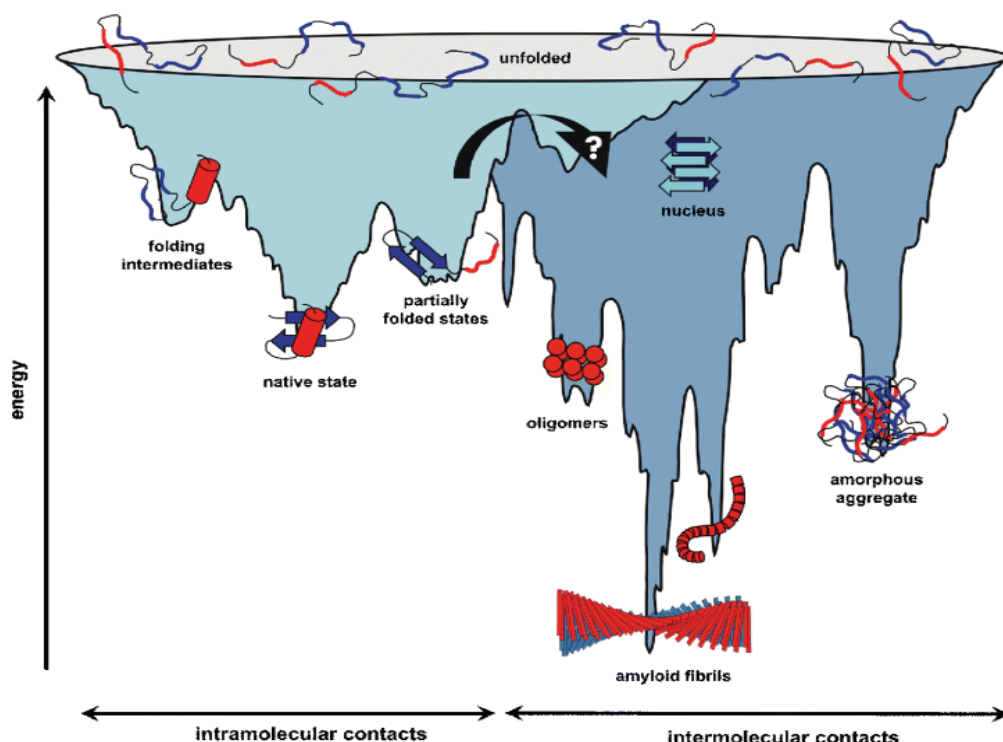


Abb. 1.1: Faltungstrichter für Proteine unter Berücksichtigung der Fehlfaltung
(aus Jahn *et al.*, 2005)

Zusätzlich zu den intrinsischen Kräften des Proteins, sich in seine korrekte, native Konformation zu falten, sind auch Faltungshelfer, sogenannte molekulare Chaperone, in der Zelle aktiv, um Fehlfaltungen zu verhindern (Young *et al.*, 2004). Diese Faltungshelfer binden nicht oder falsch gefaltete Proteine und fördern in ihrer Funktion die Rückfaltung zur funktionellen Struktur oder verhindern die Aggregation. Ist die Fehlfaltung nicht mehr reversibel, so können Proteine z.B. ubiquitiniert und dann durch das 26 S Proteasom degradiert werden (Pickart *et al.*, 2004).

Aber selbst Proteine, die schon ihren nativen Zustand der Faltung erreicht haben, können noch durch kleinere dynamische Veränderungen in ihrer Struktur wieder einen zur Aggregation neigenden Übergangszustand einnehmen. Dieser kann dann in der Zelle aggregieren. Die daraus resultierenden Aggregate sind dann wieder in der Lage weitere Proteine zu rekrutieren, wodurch die Fehlfaltungskaskaden ihren Lauf nehmen. Oft sind die proteinösen Ablagerungen mit Krankheiten assoziiert (Gegenstand des Kapitels 1.2).

Viele der heute bekannten Fehlfaltungen treten in Form von amyloiden Aggregaten auf. Amyloide Proteinaggregate zeichnen sich durch ihre fibrillären Unterstrukturen aus, deren molekulare Architektur durch einen hohen Anteil von β -Faltblättern in

einer sogenannten cross- β Quaternärstruktur bestimmt wird. Der spezielle Aufbau macht sie durch amyloid-spezifische Farbstoffe wie Congorot und Thioflavin T nachweisbar (Krebs *et al.*, 2005). Die cross- β Struktur ergibt sich aus der Anlagerung von β -Faltblättern senkrecht zur Fibrillenachse, welche sich wiederum kontinuierlich um diese winden (Nelson *et al.*, 2006). Die hier entstehende hochmolekulare Ordnung von Sekundärstrukturanteilen kann dann anhand von Beugungsmustern in der Streuung von Röntgenstrahlen an amyloiden Faserstrukturen nachgewiesen werden.

Obwohl diese Aggregate ein einheitliches Erscheinungsbild (Fibrillen) und eine vergleichbare Unterstruktur („cross- β “) zeigen, besitzen die meisten dieser Proteine keine konservierten Aminosäurebereiche, die an der Ausbildung der Amyloid-Kernstruktur beteiligt sind. Einige Proteine können nur *in vitro* in eine amyloide Erscheinungsform gefaltet werden, während natürlich auftretende Amyloide meistens mit Krankheiten assoziiert sind. Diese amyloiden Proteinefehlfaltungskrankheiten sind Gegenstand des nächsten Kapitels.

1.2 Amyloide Proteinefehlfaltungskrankheiten

Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, existiert eine große Gruppe von amyloiden Fehlfaltungskrankheiten, die unter dem zentralen Begriff Amyloidosen zusammengefasst werden. Trotz unterschiedlicher Symptome und beteiligter Proteine vereinigt diese Krankheiten eine Gemeinsamkeit: Das betroffene Gewebe ist durch proteinöse, amyloide Ablagerungen und Läsionen gekennzeichnet. Bereits 1854 färbte Virchow Aggregate in Gewebeschnitten mit Iod und Schwefelsäure an und ging aufgrund der positiven Färbeeigenschaft davon aus, dass es sich um Kohlenhydrate (Amylose) handelte. Aufgrund der Ergebnisse nannte er die Aggregate „amyloid“. Seine Annahme konnte aber dann später durch eine genauere Analyse widerlegt werden, und es wurde der proteinöse Charakter dieser Ablagerung nachgewiesen (Friedreich & Kékulé, 1859).

Amyloidosen werden von verschiedensten Proteinen verursacht und betreffen unterschiedliche Organe. Neben den systemischen Erkrankungen sind oft Proteine Gegenstand der Untersuchungen, die mit neurodegenerativen Krankheiten assoziiert sind (vgl. Tabelle 1.1). Auch hier durchschreiten unterschiedliche Proteine bzw. Proteinsequenzen einen Weg der Oligomerisierung und Aggregation, der schließlich

in der Ausbildung amyloider Aggregate resultiert. Man geht von einer Veränderung der molekularen Umgebung oder einer Mutation im Protein aus, die die native Struktur destabilisieren und damit ihre Fehlfaltungswahrscheinlichkeit erhöhen. Die angesprochenen Destabilisierungen der Struktur führen, nachdem der in Kap. 1.1 angesprochene höher energetische Intermediärzustand (lokales Maximum im Faltungstrichter) durchschritten wurde, zu einer Strukturkonversion mit anschließender Oligomerisierung der Proteine. Dies geschieht meist über kleinere (präfibrilläre) Oligomere, die dann zu ausgewachsenen Fibrillen aggregieren (Caughey *et al.*, 2003).

Tab. 1.1: Übersicht einiger ausgewählter Amyloidosen

(nach Taylor *et al.*, 2002; Soto, 2003; Caughey & Lansbury, 2003):

Krankheit	Amyloides Protein	Betroffene Organe
Amyotrophe Laterale Sclerose (ALS)	Superoxid-Dismutase	Gehirn
Chorea Huntington	Huntingtin	Gehirn
Diabetes Mellitus Typ II	Inselamyloid Polypeptid	systemisch
Diffuse Lewy body Demenz	α, β, γ -Synuclein	Gehirn
Insulin Amyloidose	Insulin	subkutan
Lysozym Amyloidose	Lysozym	systemisch
Morbus Alzheimer	A β	Gehirn
Morbus Parkinson	α, β, γ -Synuclein	Gehirn
Primäre systemische Amyloidose	Ig- γ , Ig- κ -Kette	systemisch
Sekundäre Systemische Amyloidose	Serum Amyloid	systemisch
Transmissible Spongiforme Enzephalopathien	Prion-Protein	Gehirn

Welche dieser Aggregat-Spezies die aktive, pathogene Wirkung entfaltet, ist zurzeit Gegenstand intensiver Forschung. So fand man Hinweise, dass kleinere oligomere Vorstufen eine porenartige Struktur bilden können, in der diese Proteine die

neurotoxische Wirkung entfalten können. Hier wurde gezeigt, dass die neurotoxischen A β -Spezies (A β 1-40 und 1-42), welche bei Morbus Alzheimer auftreten, in der Lage sind, Poren von der Größe eines Membrankanals zu bilden und bei Einlagerung in Membranen eine unspezifische Permeabilität hervorrufen. Die Zellen durchlaufen dadurch eine poreninduzierte Lyse und sterben nach kurzer Zeit ab. Wiederholte man diese Experimente mit nicht neurotoxischen A β -Fragmenten, so konnte diese Einlagerung und Permeabilitätssteigerung nicht beobachtet werden (Singer *et al.*, 2006). Andererseits wurden auch für voll entwickelte Fibrillen neurotoxische Wirkungen postuliert (Novitskaya *et al.*, 2006). Beide Aggregatspezies liegen auf ein und demselben Aggregationsweg und stehen daher miteinander im Gleichgewicht. So war es bisher schwierig, eine eindeutige Aussage über die neurotoxische Spezies zu treffen (Caughey *et al.*, 2003).

Unter den in Tabelle 1.1 aufgeführten Krankheiten nimmt die transmissible spongiforme Enzephalopathie eine Sonderstellung ein, da sie wie der Name besagt übertragbar („transmissible“) ist.

1.3 Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE)

Unter den neurodegenerativen Krankheiten der Säuger stellen die transmissiblen spongiformen Enzephalopathien (TSE) eine Ausnahme dar. Es handelt es sich um eine degenerative Erkrankung des Gehirns, die mit schwammartigen („spongiforme“) Veränderungen des neuronalen Gewebes einhergeht.

Die eigentlich einzigartige Eigenschaft dieser neurodegenerativen Erkrankung stellt ihre Übertragbarkeit („transmissible“) dar (vgl. Tab. 1.2). So kommen in diesem Fall zu den schon bekannten Ätiologien von neurodegenerativen Krankheiten, d.h. spontane oder genetisch bedingte, noch die Infektion als Ursache der TSE hinzu.

Das macht diese Klasse der Erreger zu einem besonderen Typ. Zu den TSE zählen unter anderem die Traberkrankheit (Scrapie, s. Kap. 1.3.1), die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE, s. Kap. 1.3.2) und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD, s. Kap. 1.3.3). Eine Übersicht über die bekanntesten TSE wird in Tabelle 1.2 gegeben.

Trotz der so breiten Diversität der Ursprünge dieser Krankheitsgruppe (vgl. Tab. 1.2) zeichnen sich TSE bei Säugern durch eine schwammartige („spongiforme“) Veränderung des Nervengewebes aus, die durch die Vakuolisierung des Neuropils verursacht wird. Resultat davon ist der Verlust von Neuronen und gleichzeitige

Vermehrung von Astrozyten und Mikrogliazellen (Masters *et al.*, 1991, Roberts *et al.*, 1992).

Tab. 1.2: Übersicht der bekanntesten Prion-Erkrankungen:

TSE-Krankheit	Wirt	Ätiologie
sporadische Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (sCJD)	Mensch	Somatische Mutation oder spontane Umwandlung von PrP ^C zu PrP ^{Sc}
iatrogene Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (iCJD)	Mensch	Infektion durch kontaminierte Wachstumshormonpräparate, medizinische Operationsbestecke, etc.
familiäre Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (fCJD)	Mensch	Keimbahnmutation im PrP-Gen
Neue Variante Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD)	Mensch	Infektion durch bovine Prionen ?
Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom (GSS)	Mensch	Keimbahnmutation im PrP-Gen
Fatale Familiäre Insomnie (FFI)	Mensch	Keimbahnmutation im PrP-Gen
Kuru	Mensch	Infektion durch rituellen Kannibalismus
Scrapie	Schaf, Ziege	Infektion von genetisch suszeptilen Tieren
Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	Rind	Infektion durch kontaminiertes Tiermehl
Feline Spongiforme Enzephalopathie (FSE)	Katze	Infektion durch kontaminiertes Tiermehl
Transmissible Mink Enzephalopathie (TME)	TME	Infektion durch kontaminiertes Tiermehl
Chronic Wasting Disease (CWD)	Hirsch und Elch	unbekannt

Neben morphologischen Veränderungen treten bei der Erkrankung an TSE die schon in Kap. 1.2 erwähnten proteinösen Ablagerungen auf, die zu einem gewissen Anteil amyloide Unterstrukturen besitzen (Jeffrey *et al.*, 1997). Die Erkrankungen sind geprägt durch eine lange, symptomlose Inkubationszeit, die von einem kurzen Krankheitsverlauf gekennzeichnet sind. So kann auf eine mehrere Jahrzehnte dauernde Inkubationszeit (bei menschlichen Varianten der Erkrankung) ein Krankheitsverlauf von nur wenigen Monaten bis hin zu 2 Jahren folgen (Collinge *et al.*, 1994). Die gegenüber der Inkubationszeit kurze symptomatische Phase ist durch Bewegungs- und Koordinationsstörungen (Ataxien) bis hin zu Demenzen gekennzeichnet und verläuft stets tödlich.

1.3.1 Scrapie

„Scrapie“, auch bekannt als „Traberkrankheit“ wurde erstmals 1759 in einem Lehrbuch (Leopold, 1759) beschrieben, und ist somit die am längsten bekannte TSE. 1898 wurde erstmals eine pathologische Veränderung des Gehirngewebes im Zusammenhang mit dieser Krankheit festgestellt (Cassirer, 1898). Vermutete man schon seit der Entdeckung der Krankheit ihren infektiösen Charakter, so konnte der experimentelle Beweis dafür erst 1936 erbracht werden (Cuille & Chelle, 1936).

Da Scrapie-Erreger die ersten TSE-Erreger waren, die auf Maus (Chandler, 1965) und Hamster (Kimberlin *et al.*, 1975) als Modellsysteme für die Erforschung der Krankheit übertragbar waren, hatten sie für die Wissenschaft eine besondere Bedeutung.

1.3.2 Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)

Die wohl bekannteste aller TSE ist die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE). Diese TSE wurde zwischen 1985 und 1986 erstmalig in England als „Bovine Spongiforme Enzephalopathie“ diagnostiziert. Durch die Ähnlichkeit des neuropathologischen Bildes und vergleichbarer Proteinablagerungen in den Gehirnen erkrankter Rinder (Hope *et al.*, 1989; Wilesmith, 1988) wurde BSE als TSE klassifiziert. Die in den Folgejahren aufgetretene Epidemie ist einzigartig in der Geschichte der TSE, da bis heute 185.000 Rinder weltweit an BSE erkrankten (O.I.E., 2007). Den größten Anteil von ca. 180.000 Fällen verzeichnete man davon in Großbritannien. In der Kernzeit der Epidemie (1992) wurden bis zu 36.000 Tiere in einem Jahr positiv auf BSE getestet.

Als Hauptursache der epidemieartigen Verbreitung wird die Verfütterung von Tiermehl an den Rinderbestand in Großbritannien angesehen. Die Herstellung des Tiermehls wurde Anfang der 70er Jahre umgestellt, und es wird angenommen, dass dies zu einer unzureichenden Sterilisierung, bezogen auf den TSE-Erreger, führte, so dass es bei Verfütterung möglicherweise zur Infektion gekommen ist. Da das Tiermehl sowohl Schlachtabfälle von Schafen als auch von Rindern enthielt, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden, ob Erreger des Schafes (Scrapie, vgl. Kap. 1.3.1) oder des Rindes Ursprung der Epidemie waren. Mittlerweile verzeichnet man einen Rückgang an Neuerkrankungen von den oben erwähnten 36.000 auf 100-200

Fälle pro Jahr. Der Grund dafür scheint in dem Verbot der Verfütterung von Tier- und Knochenmehl sowie breit angelegten BSE-Tests zu liegen.

1.3.3 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, erstmals beschrieben von den beiden deutschen Neurologen Creutzfeldt und Jakob im Jahre 1920, stellt die Hauptgruppe der humanen TSE dar (Creutzfeldt, 1920; vgl. auch Tabelle 1.2). In 80-95 % der Fälle handelt es sich um die spontane Form der Krankheit (sCJD, vgl. Tab.1.2). Die Inzidenz dieser sehr seltenen, neurologischen Erkrankung liegt bei einem Fall pro 1 Millionen Einwohner pro Jahr. Die spontane CJD zeichnet sich dadurch aus, dass sie, wie viele spontane neurodegenerative Krankheiten, erst im höheren Alter (~65 Jahre) vermehrt auftritt (Collinge *et al.*, 1994).

Neue Aufmerksamkeit auf CJD lenkte das Auftreten der ersten Fälle einer varianten CJD-Erkrankung (vCJD) während und nach der Zeit der BSE-Epidemie, die bei jüngeren Patienten (< 45 Jahre) auftrat (Will *et al.*, 1996). Nach Transmission von BSE auf Primaten zeigten neuropathologischen Untersuchungen, dass diese Läsionsmuster im Hirngewebe dieser Primaten denen von vCJD-Patienten mehr ähnelten als denen von sCJD-Patienten (Lasmézas *et al.*, 1996). Aufgrund dieser Ergebnisse schlussfolgerte man, dass der Ursprung der vCJD-Infektionen im Verzehr von kontaminierten Fleischprodukten liegen könnte. Analoge Infektionsversuche und darauf folgende histopathologische Untersuchungen des Nervengewebes in den korrespondierenden Tiermodellen zu bovinen und humanen TSE stützen diese Theorie (Hill *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 1997).

1.4 Das Prion-Protein

1.4.1 Die Prion-Hypothese

Auf der Suche nach dem Scrapie-Erreger wurde die ungewöhnliche Natur des infektiösen Agens schon 1966 durch T. Alper festgestellt (Alper *et al.*, 1966). In Strahlungsexperimenten, die jeden herkömmlichen und damals bekannten Erreger aufgrund Nukleinsäure schädigender Wirkung inaktiviert hätten, konnte die Infektiosität der Scrapie-Proben nicht vermindert werden. Hier kam erstmals die Frage auf, ob der Erreger der Traberkrankheit sich ohne Nukleinsäuren replizieren könnte (Alper *et al.*, 1967). Da diese Annahme aber einen Paradigmenwechsel in der Biologie von Krankheitserregern zu Folge gehabt hätte, blieb diese Theorie lange unbeachtet.

Systematische Untersuchungen und Aufreinigung der Infektiosität aus Hirnen infizierter Hamster, durchgeführt durch die Arbeitsgruppe um S. B. Prusiner konnten die frühen Ergebnisse von T. Alper bestätigen. Alle Methoden, die Nukleinsäuren inaktivieren und auf diese aufgereinigten Proben angewandt wurden, konnten die Infektiosität nicht vermindern. Wurden aber proteindenaturierende, also strukturauflösende Bedingungen gewählt, so wurde auch gleichzeitig die Infektiosität vermindert bzw. eliminiert (McKinley *et al.*, 1981). Diese Ergebnisse veranlassten Prusiner im Jahr 1982, einen neuen Erreger-Typ zu definieren. Er nannte den TSE-Erreger „**proteinaceous infectious particle**“, kurz **Prion** (Prusiner, 1982).

Für die Charakterisierung eines Erregers ist es wichtig, ihn in ausreichend reiner Form isolieren zu können. Dabei machte man sich eine neben der Infektiosität herausragende Eigenschaft, die partielle Resistenz gegenüber proteolytischer Verdauung durch die Proteinase K, von Prionen zu Nutze (McKinley *et al.*, 1983; s. Abb. 1.3 A). Als Hauptbestandteil der infektiösen Proben konnte ein Protein identifiziert werden (Prusiner *et al.*, 1984). Teilsequenzierung und Klonierung des Proteins und anschließende DNA Vergleiche zeigten, dass alle untersuchten Spezies dieses Protein codieren und exprimieren, unabhängig davon, ob sie die mit diesem Erreger infiziert waren oder nicht (Bolton *et al.*, 1988; Oesch *et al.*, 1985).

Da der Term „Prion“ für die infektiösen Präparate verwandt wurde, wurde das neu entdeckte Protein, in Analogie zum Erreger, Prion-Protein (PrP) genannt. In Kombination mit den bis dahin erfassten biophysikalischen Eigenschaften des

Erregers und seiner zellulären Variante wurde die Prion-Hypothese formuliert. In dieser Hypothese werden zwei strukturelle Isoformen des Prion-Proteins benannt. Das wirtseigene Prion-Protein kommt demnach in einer nicht infektiösen, zellulären Form („cellular isoform“ Prion-Protein: PrP^C) vor und als Bestandteil des Erregers zusätzlich in einer krankheitsassoziierten Scrapie-Isoform („Scrapie Isoform“ des Prion-Protein: PrP^{Sc}).

Systematische Untersuchungen an hochaufgereinigten Scrapie-Proben konnten Nukleinsäuren unter 20 nt (Kellings *et al.*, 1992; Riesner *et al.*, 1993; Kellings *et al.*, 1994; Safar *et al.*, 2005) als Bestandteil des Erregers ausschließen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass „knockout“ Mäuse, die dieses Protein nicht exprimieren, Prionen nicht propagieren können (Bueler *et al.*, 1993). So wurde dann die Prion-Hypothese Form formuliert. In dieser Formulierung ist das Prion-Protein in der fehlgefalteten Form nicht nur notwendige, sondern auch ausreichende Bedingung für die Infektion eines Organismus. Einen ersten direkten Beweis der Prion-Hypothese wurde von Legname *et al.* (2004) erbracht. In diesen Experimenten wurde nicht infektiöses rekombinantes Prion-Protein in eine fibrilläre Form überführt und in transgene Mäuse inokuliert. Diese Mäuse entwickelten neurologische Dysfunktionen und replizierten den Erreger, was in weiteren Tierversuchspassagen gezeigt werden konnte (s. Kap. 1.6).

1.4.2 Die zelluläre Isoform des Prion-Proteins (PrP^C)

Das zelluläre Prion-Protein ist ein 33-35 kDa großes Glykoprotein, welches über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol(GPI)-Anker (Stahl *et al.*, 1987) auf der Oberfläche von Zellmembranen verankert ist. Es ist in geringen Konzentrationen von Detergenzien löslich und zeigt in spektroskopischen Untersuchungen einen hohen Anteil an α -helikaler Sekundärstruktur (42 %) mit einem geringen Anteil von β -Faltblättern (3 %) (Pan *et al.*, 1993; Riek *et al.*, 1996; James *et al.*, 1997; vgl. Abb. 1.2 und Tab. 1.3). Diese Untersuchungen sind ausschließlich an der globulären Domäne (Aminosäuren: 121-231) des rekombinanten Prion-Proteins durchgeführt worden. Vorläufige Untersuchungen (1d-NMR; Hornemann *et al.*, 2004) an zellulären, eukaryotischen Prion-Proteinen, aufgereinigt aus Hirnen gesunder Rinder, konnten die schon zuvor an rekombinanten Prion-Proteinen bestimmten Strukturen bestätigen. Dies lässt die Vermutung zu, dass die posttranslationalen

Glykosylierungen keine Auswirkung auf die Struktur haben. Da es für die richtige Faltung von PrP (im Gegensatz zu Enzymen) keinen Aktivitäts- oder Funktionstest gibt, konnte bisher nicht bestätigt werden, ob die unter NMR-Spektroskopie Bedingungen erhaltene Struktur (pH 4,5-5,5 und fehlende Membranverankerung) wirklich mit der *in vivo*- Struktur von PrP^C übereinstimmt.

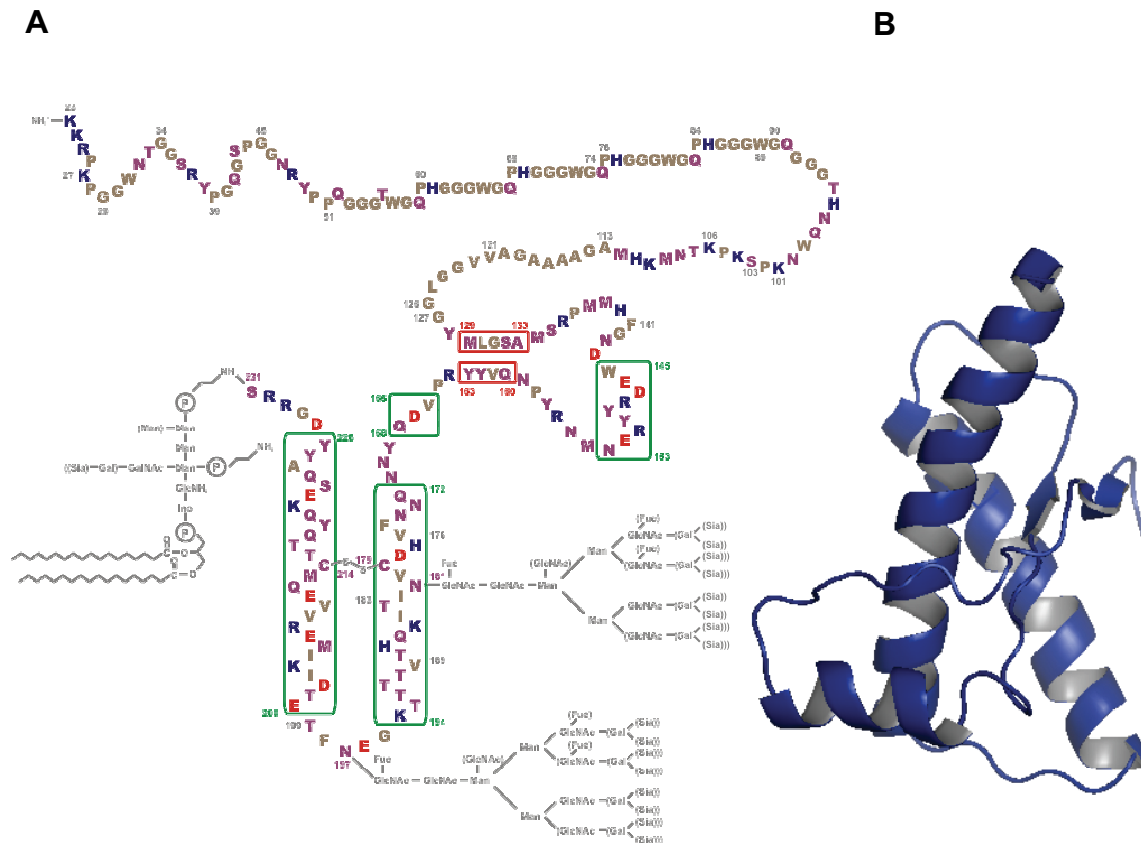


Abb.1.2: Struktur von PrP^C

Primärstruktur (A)(mit den posttranslationalen Modifikationen; Dumpitak, 2003) und Tertiärstruktur ermittelt aus NMR-Experimenten am rekombinanten PrP des syrischen Hamsters (B) (James *et al.*, 1997).

Während seiner Biogenese wird PrP^C kotranslational in das Lumen des Endoplasmatischen Retikulums sekretiert, was durch eine 22 Aminosäuren lange N-terminale Signalsequenz vermittelt wird. Als Signal für das Anhängen des GPI-Ankers dient eine C-terminale Sequenz von 23 Aminosäuren. Beide Sequenzabschnitte werden nach erfolgreichem Transport und Modifikation vom Protein abgespalten. Als letzte Modifikationen werden zwei N-verbundene Zuckerketten angehängen, bevor das Protein an der Außenseite von Plasmamembranen präsentiert wird (Harris, 2001; s. Abb. 1.2).

Nach der Analyse der PrP-spezifischen mRNA in verschiedenen Gewebetypen fand man die meisten Kopien in neuronalem Zellgewebe. Neuronen der Säuger besitzen die größte Menge an PrP^C. Aber auch in fast allen anderen Gewebetypen von Säugetieren kommt das Protein, wenn auch in kleineren Mengen, vor (Kretzschmar *et al.*, 1986).

Immuno-histochemische und immuno-elektronenmikroskopische Studien zeigten, dass PrP^C in Hirnregionen meist in präsynaptischen Mikrodomänen lokalisiert ist (Fournier *et al.*, 2000). Wie die meisten GPI-verankerten Proteine, findet man PrP^C in sogenannten Lipid-„rafts“. Diese stellen Lipidmikrodomänen dar und sind reich an Sphingolipiden und Cholesterol (Vey *et al.*, 1996; Naslavsky *et al.*, 1997).

Das Prion-Protein kommt, wie genetische Analysen zeigten, in allen untersuchten Säugetieren vor. Erstaunlich ist die sehr hohe Sequenzhomologie zwischen den Spezies von 85-97 %. Dies spricht für eine hohe Sequenzkonservierung und verstärkt die Annahme einer Relevanz in physiologischen Prozessen. Daher war es umso erstaunlicher, dass die ersten PrP-defizienten Mäuse keinen letalen Phänotyp sondern eine normale Entwicklung zeigten (Bueler *et al.*, 1992).

In späteren Analysen mit spezifischen Verhaltenstests konnten Veränderungen des zirkadianen Rhythmus bei PrP^C-defizienten Tieren nachgewiesen werden (Tobler *et al.*, 1996). Dieser Befund könnte einige Symptome menschlicher Prionerkrankungen (FFI und sCJD) mit einem Verlust der Funktion des Prion-Proteins erklären (Landolt *et al.*, 2006).

Es gibt auch Forschungsergebnisse zu weiteren möglichen Funktionen des Prion-Proteins. So konnte man zeigen, dass das Prion-Protein über mehrere sich wiederholende Sequenzmuster (sog. Oktarepeats), die reich an Histidinen sind, sehr effizient Kupfer binden kann (s. Abb. 1.2). Deshalb wurde vorgeschlagen, dass das Prion-Protein an der Regulation des Kupferhaushaltes der Zelle mitwirkt (Brown *et al.*, 1997). Aber diese Ergebnisse der kupferbindenden Funktion *in vivo* (Brown, 2003) sind bisher umstritten (Waggoner *et al.*, 2000). Desweiteren konnten dem PrP^C auch Funktionen der Superoxiddismutasen (SOD) zugesprochen werden, welche aber nur maximal auf 10-30 % der Aktivität von bisher gefundenen SODs kommen (Brown *et al.*, 1999).

1.4.3 Die infektiöse Isoform des Prion-Proteins

Da die Primärstrukturen von PrP^C und PrP^{Sc} gleich sind, soll in diesem Kapitel überwiegend auf die Sekundär- und Tertiärstruktur sowie auf die geänderten biochemischen Eigenschaften der infektiösen Isoform eingegangen werden.

Eine wichtige Eigenschaft des infektiösen Prion-Proteins ist die partielle Resistenz gegen die proteolytische Verdauung durch Proteinase K (Prusiner *et al.*, 1983; McKinley *et al.* 1983). Dieser Unterschied zwischen den beiden Isoformen wurde auch für das erste experimentelle Protokoll benutzt, mit dem hochreine PrP^{Sc}-Isolate hergestellt werden konnten. Nach dieser Aufreinigungsmethode isoliertes PrP^{Sc} ist N-terminal verkürzt und bildet kurze amyloide Fibrillen, die sogenannten „Prion-rods“ (vgl. Abb. 1.4.A). Bei der Verkürzung des Prion-Proteins bis ungefähr zur Aminosäure 90 (orientiert an der Nomenklatur des Syrischen Goldhamsters) entsteht ein 27-30 kDa großes Fragment, welches auch PrP27-30 genannt wird.

Tab. 1.3: Gegenüberstellung der Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}

Eigenschaft	PrP ^C	PrP ^{Sc} / PrP27-30
Infektiosität	Nicht infektiös	infektiös
Sekundärstruktur	β-Faltblatt: 3 %	β-Faltblatt: 54 %
	α-Helix: 42 %	α-Helix: 21 %
	random coil: 23 %	random coil: 16 %
	β-turn: 32 %	β-turn: 9 %
Verdauung durch Proteinase K	wird vollständig abgebaut	C-terminal resistent
Löslichkeit	löslich in milden Detergenzien	unlöslich
Aggregationszustand	monomer	oligomer

Vergleicht man nun die Strukturen von PrP^C und PrP^{Sc}, so kann man die Bildung von PrP^{Sc} als eine Konversion von einem vornehmlich α-helikalen Protein zu einem unlöslichen, β-Faltblatt-reichen Protein ansehen. PrP^{Sc} besitzt einen α-helikalen Anteil von ca. 21 % und einen β-Faltblatt Anteil von 54 % (Pan *et al.*, 1993; vgl. Tab. 1.3). Studien, die diese Umfaltung wieder umkehrten, zeigten, dass mit verminderter β-Struktur und gesteigerter Löslichkeit auch die Infektiosität zurückging (Riesner *et al.*, 1996).

Die Unlöslichkeit des PrP^{Sc}s verhinderte bisher die atomare Strukturaufklärung der infektiösen Isoform mit den Mitteln der Röntgenbeugung und NMR. Jedoch gelang es ein Modell von PrP^{Sc} zu formulieren, welches auf computergestützter Auswertung von Elektronenmikroskopie-Daten (bei einer Auflösung von $\sim 7\text{\AA}$) basiert (Govaerts *et al.*, 2004; Wille *et al.*, 2002). Die Daten wurden aus den vorher beschriebenen infektiösen Präparationen erhoben. Darin finden sich mindestens zwei ultrastrukturelle Spezies von PrP27-30: Die schon vorher beschriebenen „prion-rods“ und 2-D-Kristalle (Abb. 1.3 A und B). Nach dem aus Kristallaufnahmen rekonstruiertem Strukturmodell, besteht eine kristalline Untereinheit aus einem PrP^{Sc}-Trimer, dessen linksgängige β -Helices nach innen zeigen (Abb. 1.3 C und D). Durch Stapelung der trimeren Untereinheiten, lässt sich auch ein Modell für Prion-rods (amyloide Fibrillen; s. Abb. 1.3 E) darstellen.

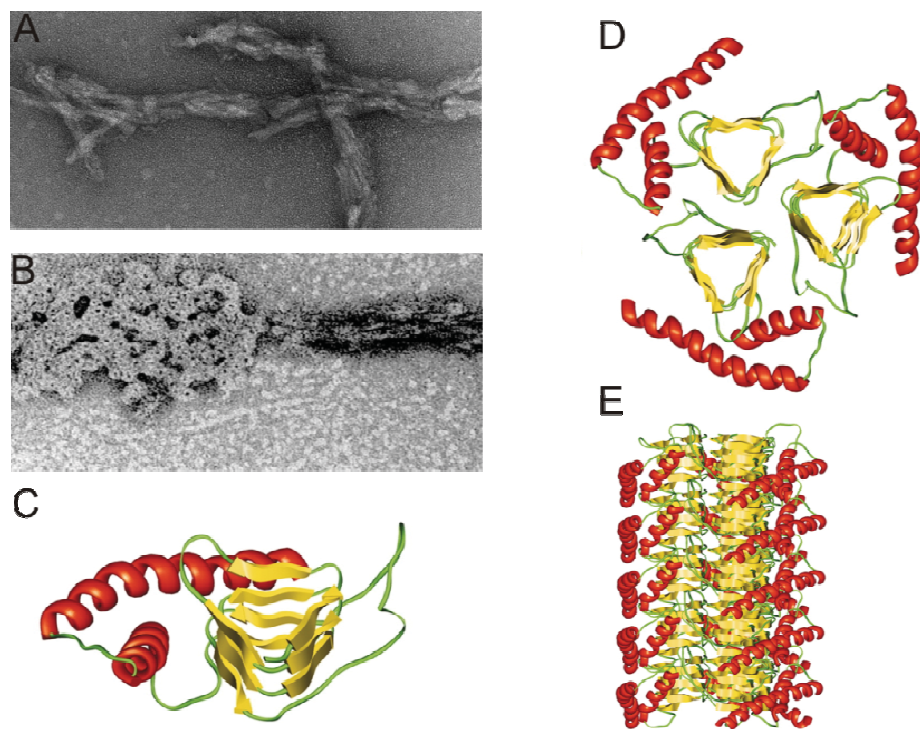


Abb. 1.3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen und Strukturmodell von PrP 27-30

A: PrP 27-30-„rods“; B: PrP27-30 Kristalle (links) und „rods“ (rechts); C: Modelle der monomere Untereinheit des PrP27-30 Moleküls und D: Trimere Einheitszelle des PrP 27-30 Kristalls; E: Fibrillenmodell (Abbildungen: A: Dr. H. Wille; B: Wille *et al.*, 2002; C-E: Govaerts *et al.*, 2004).

1.5 Modelle zur Replikation des Erregers

Im Gegensatz zu herkömmlichen auf Nukleinsäuren basierenden Erregern stellen Prionen ein völlig neues Infektionsprinzip dar. Es mussten neue auf Proteinkonformationsänderung basierte Modelle zur Replikation einer Proteinstruktur formuliert werden. In dem von S.B. Prusiner formulierten „protein-only“-Mechanismus (Prusiner *et al.*, 1990) repliziert der Erreger sich selbst, indem er andere Prion-Proteine strukturell rekrutiert. Dies äußert sich in einer Amplifikation des Erregers, in der das neu entstandene Prion wiederum autokatalytisch PrP^{C} in PrP^{Sc} umwandeln kann. Die „Information“ für diese Konversion liegt einzig und allein in der dreidimensionalen Struktur des PrP^{Sc} .

Die für diesen Vorgang formulierten Modelle müssen die verschiedenen Ätiologien der Prion-Erkrankungen ineinander vereinen können. So müssen spontane, genetisch bedingte und durch Infektion hervorgerufene Amplifikation des Erregers berücksichtigt werden. Ein über den Mechanismus hinausgehendes, quantitatives Modell sollte auch die lange Inkubationszeit mit dem kurzen symptomatischen Krankheitsverlauf erklären können.

Im folgendem werden drei Replikationsmodelle vorgestellt: Das Modell der „keiminduzierten Aggregation“ (Jarret & Lansbury, 1993; Come *et al.*, 1993), das „Heterodimermodell“ (Cohen *et al.*, 1994; Cohen & Prusiner, 1998) und das „kooperative Prusiner-Modell“ (Eigen, 1996).

Das Modell der **keiminduzierten Aggregation** orientiert sich am Mechanismus der linearen Kristallisation. Dieser Mechanismus stützt sich dabei auf Vorstellungen, die auch schon für andere Amyloid-bildende Krankheiten und Prozesse formuliert wurden. Dieses Modell geht davon aus, dass das Gleichgewicht der Initialreaktion (Konversion von PrP^{C} zu PrP^{Sc}) auf der Seite des PrP^{C} liegt. Die ersten strukturellen PrP^{Sc} -Oligomere sind noch instabil. Erst wenn die Intermediate zu einem stabilen Nukleus gewachsen sind, wäre der Zerfall der Aggregate langsamer als die Neubildung und der Erreger könnte wachsen (s. Abb. 1.4 A). Die hiermit postulierte erste stabile Zwischenstufe würde die kleinste infektiöse Einheit darstellen. Eine der Konsequenzen dieses Modells wäre z. B., dass kein stabiles monomeres PrP^{Sc} existieren könnte.

In der Betrachtung von Prusiner und Cohen (Cohen *et al.*, 1994; Cohen *et al.*, 1998) wird neben den beiden bekannten Isoformen von PrP (PrP^{C} und PrP^{Sc}) eine weitere eingeführt: PrP^* . Dieses PrP^* stellt ein strukturell destabilisiertes Intermediat dar, welches im Gleichgewicht mit PrP^{C} steht, wobei dieses auf der Seite des PrP^{C} liegt. PrP^{Sc} würde in diesem Modell nicht direkt mit der PrP^{C} -Konformation wechselwirken, sondern mit der intermediären Struktur von PrP^* . Dieser erste Kontakt bildet dann ein Heterodimer (**Heterodimermodell**), welches durch die konvertierende Eigenschaft von PrP^{Sc} in ein PrP^{Sc} -Homodimer überführt werden würde. Die Dissoziation des Homodimers könnte dann neue Keime für die weitere Konversion freisetzen. Damit diese Konversion eintritt, muss das Gleichgewicht zwischen PrP^{Sc} und PrP^{C} auf der Seite des PrP^{Sc} liegen, damit PrP^{Sc} seine katalytische Wirkung entfalten kann.

Unter Berücksichtigung des vorangegangenen Modells hat Eigen (Eigen, 1996) berechnet, dass die lineare Betrachtung von Cohen und Prusiner, im spontanen Fall der Krankheit, einen unglaublich langsamen Prozess zur Folge haben müsste, um die geringe Inzidenz (1 Fall/Millionen Einwohner) der spontanen Erkrankungen erklären zu können. Um aber innerhalb der Lebensspanne eines Organismus im Falle einer Infektion die Krankheit ausbilden zu können, müsste dann wiederum die katalytische Wirkung von PrP^{Sc} extrem hoch sein. Daher schlug er einen kooperativen autokatalytischen Mechanismus vor, in dem mehrere PrP^{Sc} -Moleküle auf eine Art und Weise die Konversion unterstützen, wie man ihn von allosterischen Enzymen kennt. Der katalytische Effekt eines einzelnen PrP^{Sc} -Moleküls könnte dann immer noch gering sein, da erst die kooperative Wirkung (**Kooperatives Prusiner-Modell**) mehrerer Moleküle die Konversion katalysieren könnte.

In allen hier vorgestellten Modellen stellen die exogene Prionen (s. Abb. 1.4) im Fall der Infektion die erste stabile PrP^{Sc} -Einheit dar und können dann autokatalytisch repliziert werden.

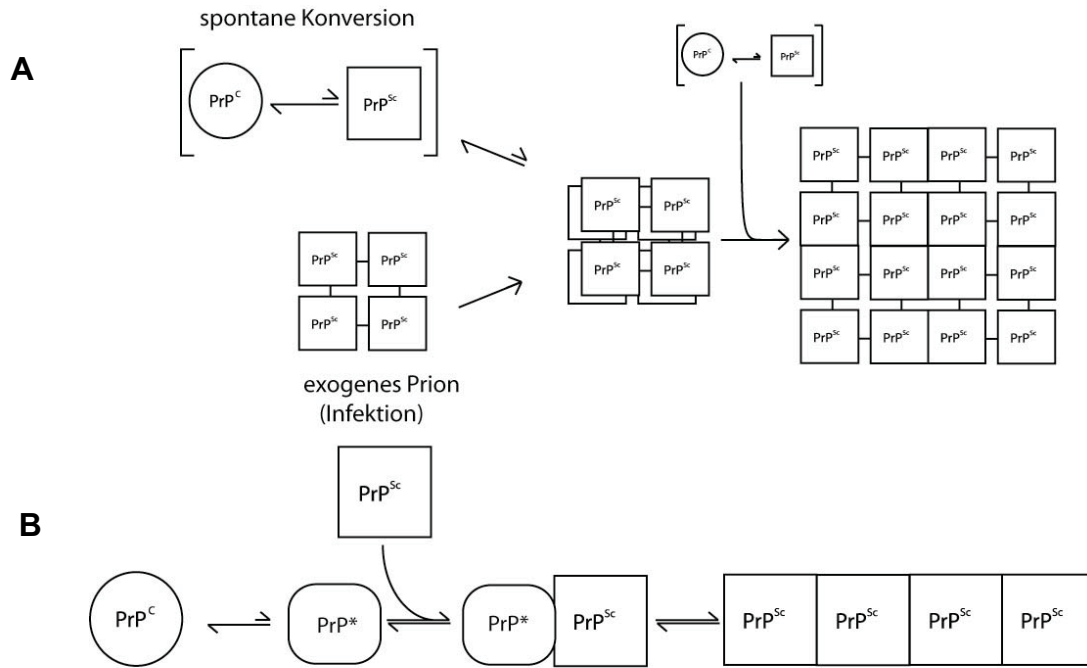


Abb. 1.4: Prion-Replikationsmodelle:

A: Modell der „keiminduzierten Aggregation“ (Jarrett *et al.*, 1993); B: „Heterodimer-Modell“ (verändert nach Cohen & Prusiner, 1998).

1.6 *In vitro* Konversion des Prion-Proteins

Seit der Formulierung der „protein-only“ Hypothese, nach welcher der Erreger eine strukturelle Isoform des PrP^C darstellt, ist versucht worden, diese Struktur *in vitro* zu rekonstituieren. Betrachtet man die Literatur genauer, so muss man zu dem Ergebnis kommen, dass die einzigen Merkmale in der Prion-Biologie, die mit der Infektiosität zweifellos korrelieren, Unlöslichkeit und ein erhöhter Anteil von β -Strukturen sind. Diese Merkmale konnten relativ schnell *in vitro* nachgestellt werden (Mehlhorn *et al.*, 1996), so war die Infektiosität der verschiedenen Ansätze nicht nachweisbar (Post *et al.*, 2000) bzw. wurden negative ausgefallene Infektiositätsstudien nur selten veröffentlicht (Leffers *et al.*, 2005).

Die Rekonstitution der Infektiosität *in vitro* stellt den endgültigen Beweis der Prion-Hypothese dar. In den letzten Jahren haben sich zwei Hauptstrategien zur Generierung von *de novo* Infektiosität entwickelt. Zum einen wurde versucht, die Amplifikationswirkung eines PrP^{Sc} -Keims nachzustellen oder zum anderen die Konversion von PrP^C (oder rekombinantem PrP) zu PrP^{Sc} ohne Keim spontan nachzustellen. Beide Strategien sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

1.6.1 *De novo* Amplifikation von PrP^{Sc} durch natürliche Prionen

In der Literatur finden sich einige, einander ähnelnde Protokolle, die die katalytische Wirkung von natürlichen Keimen auf Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc}-ähnlichen Aggregaten nutzen (Saborio *et al.*, 2001; Deleault *et al.*, 2003). Nach der Konversion wurde neu gebildetes PrP^{Sc} von PrP^C aufgrund der erhöhten PK-Resistenz von PrP^{Sc} differenziert und immunologisch quantifiziert (Caughey *et al.*, 1995). Da zuerst nur die Resistenz gegen PK-Verdauung der neu gebildeten PrP-Isoform, nicht aber deren Infektiosität, nachgewiesen wurde, bezeichnete man dieses Produkt auch als **resistentes PrP** oder auch **resPrP**.

Erst eine Weiterentwicklung dieser Verfahren zu einer zyklischen Prozedur („protein misfolding cyclic amplification“ (PMCA); Saborio *et al.*, 2001) durch die Soto-Gruppe konnte zeigen, dass die neu gebildeten resPrP-Moleküle selbst auch Konversionspotential besitzen. Dazu wurden PrP^{Sc}-enthaltende Hirnhomogenate infizierter Tiere mit Hirnhomogenaten gesunder Tiere inkubiert. Serielle Amplifikations- und Verdünnungszyklen wurden angewandt, um eine hohe Amplifikationseffizienz erzielen zu können (Castilla *et al.*, 2005b). Durch dieses zyklische Verfahren konnte dann rechnerisch ausgeschlossen werden, dass im letzten Zyklus noch infektiöses Startmaterial vorhanden ist. Tierversuche mit diesen Proben zeigten dann die Generation von *de novo* Infektiosität (Castilla *et al.*, 2005a). Der Schwachpunkt dieser Methode ist allerdings, dass die „Protein-only“-Hypothese mit diesem Ansatz nicht zu beweisen ist, da die Generierung von *de novo* Infektiosität innerhalb von Zellhomogenaten durchgeführt wird, und somit alle Zellbestandteile als essentielle Kofaktoren in Betracht gezogen werden müssen.

Diesen Beweis kann nur ein vergleichbares System mit hoch aufgereinigten Substanzen erbringen. Diese Ansätze zeigten weder die Amplifikationsraten des PMCA-Systems, noch die generierte Infektiosität (Deleault *et al.*, 2005; zur Übersicht: Supattapone, 2004).

1.6.2 Spontane *in vitro* Konversion

Mittlerweile sind viele Konversionssysteme, die rekombinante Prion-Proteine (recPrP) in eine PrP^{Sc}-ähnliche Konformation bringen konnten, veröffentlicht worden (Jackson *et al.*, 1999; Swietnicki *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2003). Diese Systeme stellen

den spontanen Fall der Krankheit nach, da hier kein Keim zur Konversion hinzugegeben wird. Die dabei entstandenen Aggregate erreichten einige, aber nicht alle PrP^{Sc}-Eigenschaften. Da davon ausgegangen wird, dass die spontane Formation von PrP^{Sc} zumindest eine partielle Strukturauflösung von PrP^C benötigt, wurden die meisten Konversionsreaktionen mit Protein-denaturierenden Chemikalien (Post *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1999; Rezaei *et al.*, 2002) oder auch physikalischen Methoden wie z. B. hohen Druck katalysiert (Torrent *et al.*, 2003).

Das erste und bisher einzig bekannte Konversionssystem, welches synthetische Infektiosität erzeugen konnte, geht auf die Arbeiten von Baskakov *et al.* (Baskakov *et al.*, 2002) zurück. In diesen Experimenten wurde rekombinantes murines Prion-Protein der Sequenz 89-230 mit Hilfe von Harnstoff und Guanidinium Hydrochlorid (GdnHCl) in eine fibrilläre Form gebracht. Die so entstandenen Fibrillen zeigten dann in transgenen Mäusen, die nur das korrespondierende, verkürzte PrP-Fragment der Sequenz 89-230 überexprimierten, einen sehr geringen Infektionstiter (Legname *et al.*, 2004; Legname *et al.*, 2005). Mit diesem System konnte gezeigt werden, dass die fibrilläre Erscheinungsform mit der generierten Infektiosität korreliert. Aber auch in diesem Ansatz ist der endgültige und unanfechtbare Beweis der Prion-Hypothese erst erbracht, wenn die so generierten Aggregate in der Lage sind, Wildtyp-Tiere mit dem der natürlichen Infektiosität vergleichbaren Titer infizieren zu können.

1.6.3 *In vitro* Konversion mit Natriumdodecylsulfat (SDS)

Auch in unserer Arbeitsgruppe ist ein *in vitro* Konversionssystem etabliert, welches nun näher vorgestellt werden soll. Dieses Konversionssystem basiert auf dem anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) (Riesner *et al.* 1996, Post *et al.* 1998). SDS stellte sich als Detergenz heraus, welches in geringer Konzentration die Konformation des Prion-Proteins (PrP) verändert und sich chemisch gesehen membranähnlich verhält (Post *et al.*, 1998). Auch von anderen Arbeitsgruppen (Stefani *et al.*, 2003) wird SDS heute als membranähnlich bezeichnet und zur Strukturkonversion von Proteinen genutzt (Xiong *et al.*, 2001).

Untersuchungen an rekombinantem PrP verschiedener Länge ergaben folgendes Bild. Bei Variation der SDS-Konzentration zwischen 0,2 % und 0,005 % zeigt PrP verschiedene reversible Konformationsübergänge (s. Abb. 1.5). Die aggregierte

Form von recPrP, die dieses System produziert, zeigt aber weder amyloide Fibrillen noch Infektiosität (Post *et al.*, 1998).

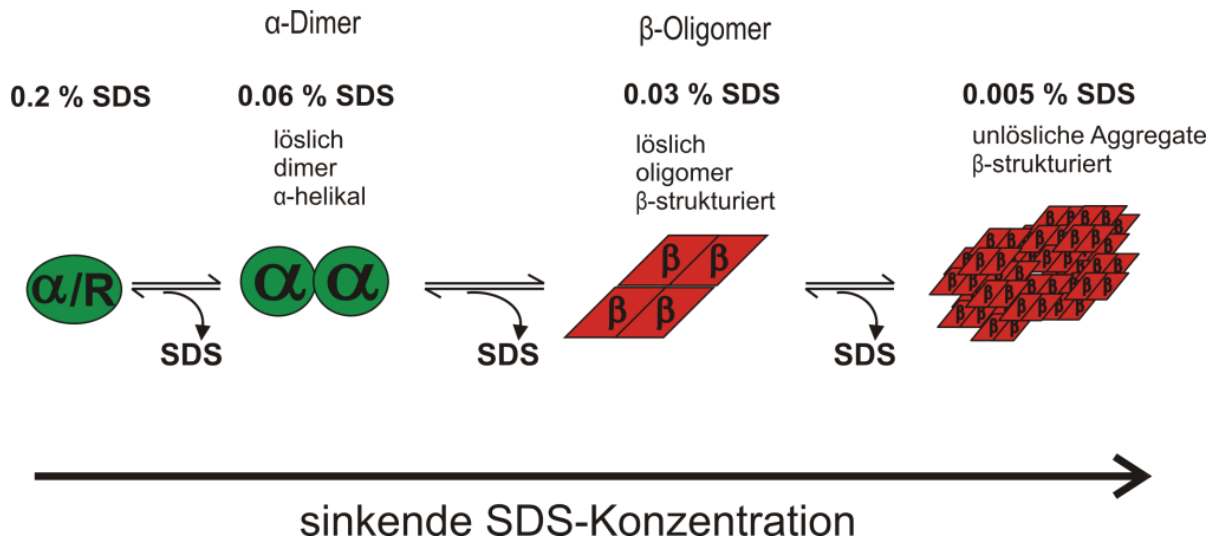


Abb. 1.5: In vitro Konversion mit SDS

Dargestellt sind die unter verschiedenen SDS Konzentrationen eingestellten Sekundärstrukturen mit dem daraus resultierendem Grad der Oligomerisierung.

In nachfolgenden Arbeiten konnte das SDS-System durch die Zugabe von NaCl soweit modifiziert werden, dass amyloide Fibrillen aus solubilisierten PrP²⁷⁻³⁰ (solPrP²⁷⁻³⁰, Aminosäuresequenz: 90-231) und natürlichem PrP^C (SHaPrP^C, Aminosäuresequenz: 23-231) entstehen (Leffers *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Zugabe von 250 mM NaCl, die Ausbildung amorpher Aggregate verminderte und nun auch amyloide Fibrillen entstehen. In einer auf diesen Erkenntnissen aufbauende Diplomarbeit (Stöhr, 2003) konnte dieses System zur Ausbildung amyloider Fibrillen auf das rekombinante Prion-Protein der Sequenz 90-231 (recSHaPrP(90-231)) übertragen werden. Um dies zu erreichen, musste für jede in dem System benutzte PrP-Form (s Abb. 1.6), eine bestimmte optimale SDS-Konzentration gefunden werden. Inkubation dieser Ansätze von mindestens fünf Wochen bei 37°C resultierte dann bei allen verwendeten Prion-Proteinen in der Ausbildung fibrillärer Aggregate (Leffers *et al.*, 2005; Stöhr 2003). In Abb. 1.6 kann dies anhand der dort aufgelisteten Bedingungen für die verschiedenen Prion-Proteine nachvollzogen werden.

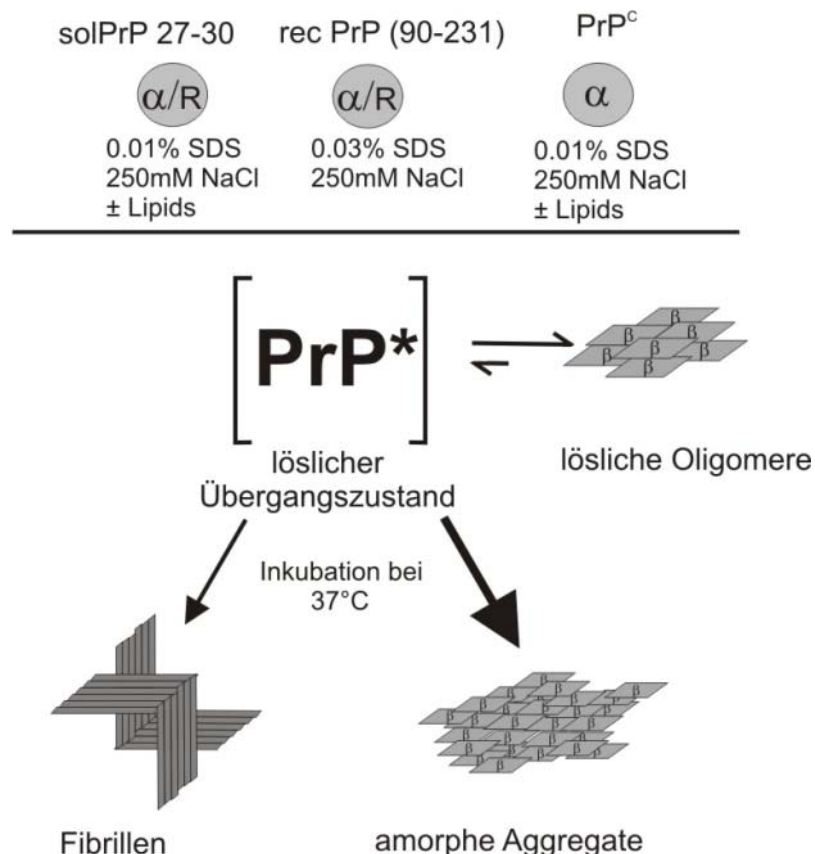


Abb. 1.6: Modifiziertes SDS-Konversionssystem zur Ausbildung fibrillärer Proteinaggregate von verschiedenen Prion-Proteinen

(Abb. nach Leffers *et al.*, 2005)

Die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen fibrillären Strukturen aus natürlichem PrP (solPrP27-30 und SHaPrP^C) wurden im Tierversuch auf ihre Infektiosität hin untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 500 Tagen wurden diese Versuche ohne ein eindeutiges Ergebnis abgebrochen. Vergleicht man diesen Ansatz mit dem von Legname *et al.* (2004), so muss in Betracht gezogen werden, dass die inokulierte Menge an fibrillären Strukturen in den erfolgreichen Rekonstitutionsexperimenten (Legname *et al.*, 2004) um den Faktor 2000 höher als in denen von Leffers *et al.* war. Auch unter der Annahme, dass die Infektiosität der in unserer Gruppe generierten Fibrillen vergleichbar mit denen aus der Publikation von Legname *et al.* war, so wären die durchgeführten Infektiositätstests aufgrund der geringen Menge an inokulierten Fibrillen sehr wahrscheinlich negativ ausgefallen.

1.7 Fragestellung

Aus den hier vorgestellten Vorarbeiten ergaben sich Ziele, die im Folgenden aufgeführt werden:

- 1.) Aus den früheren Arbeiten war bekannt, dass natürliches PrP^C, aufgereinigt aus den Gehirnen nicht infizierter Hamster, unter bestimmten Bedingungen (Abb. 1.6) zu einem kleinen Teil (10-20 %) zu Fibrillen aggregiert. Dieses Material ist allerdings nur in sehr geringen Mengen verfügbar und geht mit einem hohen „Bedarf“ an Versuchstieren einher. Daher sollte dieses System auf das besser verfügbare PrP^C aus einer CHO-Zellkultur übertragen werden. Aufgrund der natürlichen posttranslationalen Modifikationen des PrP^C aus einer eukaryotischen CHO-Zellkultur ist dieses Protein dem natürlichen PrP^C am ähnlichsten und bietet das beste Substrat für die Konversionsstudien.
- 2.) Die aus der Konversionsreaktion erhaltenen Aggregate aus CHO-PrP^C sollten im Tierversuch auf ihre Infektiosität hin untersucht werden. In diesem Ansatz steht im Vordergrund, die Ausbeute an Fibrillen zu steigern und somit die Menge an fibrillären Strukturen für die Bioassays zu erhöhen.
- 3.) Aufgrund der langsamen Konversionsreaktion des recSHaPrP(90-231) ist es möglich, die löslichen, aber metastabilen Intermediate in dem Konversionssystem genauer zu charakterisieren. Die detaillierte Kenntnis der Konversion von PrP hin zu amyloiden Fibrillen soll einen genaueren Einblick in die ersten stabilen bzw. metastabilen Intermediate der Konversion geben. Dies ist für das Verständnis der Konversion des Prion- Proteins essentiell.
- 4.) Die auf diesem Weg generierten Fibrillen sollen genauer auf ihre biophysikalischen Eigenschaften hin analysiert werden. Im Vordergrund steht die Vergleichbarkeit der generierten Fibrillen mit denen der synthetischen Prionen und PrP^{Sc}.

2. Material und Methoden

Alle verwendeten Chemikalien wurden bei den üblichen Herstellern für Laborchemikalien bezogen und entsprechen, wenn nicht anders angegeben, dem Reinheitsgrad „pro analysi“. Zum Ansetzen von Lösungen wurde hochreines „Milli-Q-Wasser“, im Folgenden als $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ bezeichnet, verwendet. Dieses wurde von der Hausanlage mit nachgeschaltetem Wasseraufarbeitungssystem (EPA Est. 41237-MA-1; Millipore GmbH, Neu Isenburg) gefiltert. Alle angesetzten Lösungen wurden durch 0,2 μm bzw. 0,45 μm oder für die elektronenmikroskopisch genutzten Lösungen 0,1 μm Membranfilter (Schleicher und Schuell, Dassel) steril filtriert.

2.1 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

10 % w/v Albumin, Bovine Fraktion V

(SIGMA ,BSA fraction V);

in 50 mM Tris Puffer, 0,9 % NaCl (pH 7)

50 mM TRIS Puffer + 0,9 % NaCL (TBS) (pH 7)

0,1 M Ammonium Acetat

0,01 M Ammonium Acetat

2 % (w/w) Uranyl Acetat in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$

2 % (w/w) Ammoniummolybdat in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$

HEPES (N- (2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2- ethansulfonsäure)

10 mM Na-HEPES/NaOH, pH 7.2

NaP_i (Natriumphosphatpuffer)

100 mM Na_2HPO_4

100 mM NaH_2PO_4

wurde durch Titration auf den pH-Wert von 7,2 eingestellt.

TBST (Tris Buffered Sodium Tween)

10 mM Tris/HCl pH 8,0

150 mM NaCl

0,01 % Tween 20

NaAc (Natrium-Acetat-Puffer)

1 mM Na-Acetat/Essigsäure pH 4,0

PBS (Phosphatpuffer)

0,2 g/l KCl

0,2 g/l KH₂PO₄

8 g/l NaCl

1,15 g/l Na₂HPO₄

PBS wurde von der Firma PAA Laboratories (Pasching, Österreich) bezogen.

LB-Medium

10 g/l Trypton

10 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

LB-Medium wurde mit NaOH auf pH 7 eingestellt.

10 % SDS (w/v)

10 %iges SDS wurde von der Firma Sigma-Aldrich bezogen

2.2 Verwendete Antikörper

Folgende Antikörper wurden uns von der Arbeitsgruppe Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt:

Antikörper	Spezifität	Epitop im Prion Protein	Verwendung
EST_123	Maus, Hamster	30-37	Immunogoldlabel (EM)
R1	Maus, Hamster	225-231	Immunologischer Proteinnachweis
R2	Maus, Hamster	225-231	Immunogoldlabel (EM)

2.3 Prion-Proteine

In dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen Prion-Proteinen gearbeitet (recPrP(90-231) und CHO-PrP^C). Obwohl alle PrP in dieser Arbeit die Sequenz des Hamster-Prion-Proteins tragen, so sind verschieden lange und modifizierte Konstrukte verwendet worden. Zum einen handelt es sich dabei um ein rekombinantes Konstrukt (Sequenz des syrischen Goldhamsters 90-231; recPrP(90-231)), sowie um ein eukaryotisch exprimiertes Prion-Protein der natürlichen Volllänge (Sequenz 23-231; CHO-PrP^C).

2.3.2 CHO-PrP^C

Transfizierte Chinesische Hamster Ovarien (CHO)-Zellen wurden von dem Labor von S. B. Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt (Blochberger *et al.* 1997). Die Aufarbeitung von PrP^C aus CHO-Zellkulturen wurde in unserer Arbeitsgruppe nach einem Protokoll der Arbeitsgruppe von S. B. Prusiner optimiert (Elfrink & Riesner, 2004). Der Vorteil dieses Systems liegt darin begründet, dass CHO-Zellen, als eukaryotisches System, in der Lage sind, das exprimierte PrP^C posttranslational durch Verknüpfung des GPI-Ankers und der N-Glykosylierungen zu modifizieren. Präparationen von CHO-PrP^C wurden nach dem Protokoll von Dr. K. Elfrink präpariert (Elfrink *et al.*, 2007).

2.3.3 Expression und Aufreinigung rekombinanter Prion-Proteine

Für die Expression von rekombinanten Prion-Proteinen wurde ein E. Coli Stamm (BL21) verwendet, der das Prion Protein der Sequenz des PK-resistenten Kerns des infektiösen Hamster-Prion-Protein exprimiert (vgl. Kap. 1.4.2, Aminosäuren: 90-231). Dieser Stamm enthält das Plasmid zur Herstellung des gewünschten Prion-Proteins. Darüberhinaus beinhaltet dieser Stamm eine über das Plasmid vermittelte Ampicillin Resistenz zur selektiven Aufzucht in einem Ampicillin haltigen LB-Medium. Da die Expression des Prion-Proteins unter der Kontrolle eines Lac-Operons steht kann dieser E. coli-Stamm Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)-induziert zur Expression des Prion-Proteins angeregt werden.

2.3.3.1 Expression rekombinanter Prion Proteine

Dabei wurde zuerst in einem kleineren Volumen LB-Medium (10-20 ml) über Nacht eine Vorkultur aus den bei -70°C gelagerten Bakterienstocks bei 37°C zum Wachstum gebracht. Mit dieser Kultur konnten dann die Expressionsansätze (in LB-Medium) angesetzt werden. Zu diesem Zweck wird 1 Volumenprozent des späteren Expressionsansatzes der Vorkultur zur Anzucht der Hauptkultur verwendet. Diese Hauptkultur wird dann bis zu einer OD₆₀₀ von 0.7 wachsen gelassen. Erst bei dieser Zelldichte wird die Expression mit Hilfen von 1 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) induziert und das PrP für weitere 5 Stunden bei 32°C exprimiert.

2.3.3.2 Aufreinigung rekombinanter Prion-Proteine

Bei der Expression unlöslicher Proteine in *E. Coli* Stämmen werden diese in Form von dicht gepackten inclusion bodies in der Zelle abgelagert. Proteine in diesen inclusion bodies sind nicht natürlich gefaltet und können neben intra- auch intermolekulare Disulfidbrücken bilden. Daher kann bei diesem Expressionsprodukt nur ein vollkommen denaturierendes Aufreinigungsprotokoll verwendet werden. Dieses Protokoll ist nach Mehlhorn *et al.* (Mehlhorn *et al.*, 1996) verändert worden. Für die erste Extraktion der PrP-haltigen inclusion bodies müssen die Zellen aufgeschlossen werden. Dies wurde bei diesem Protokoll mittels chemischer und enzymatischer Lysis der Bakterienzellen vorgenommen. Dazu wurden in einem ersten Schritt die Zellen bei 3000 rpm aus dem LB- Medium abzentrifugiert, so dass ein festes Zellpellet entsteht. Zur weiteren Trennungen von löslichen Proteinen und LB-Medium Rückständen werden diese Zellen nochmals in 25 mM TrisHCl/5 mM EDTA (pH 8) resuspendiert und in einem weiteren Schritt nochmals bei 3000 rpm abzentrifugiert. Diese Zellen konnten nun bei -70°C zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Die Lysis der Zellen wird mit einer Kombination aus Lysozym, DNase I und Triton X 100 (siehe Aufreinigungsschema Abb. 2.1) vollzogen. Alle unter Abb. 2.1 zusammengefassten Schritte, dienen zur Präparation der unlöslichen inclusion bodies. Wie vorher schon beschrieben liegen die Prion-Proteine in den inclusion bodies teilweise vernetzt und in unlöslicher Form vor. Um sie für weitere chromatographische Schritte vorzubereiten, müssen diese Proteine solubilisiert werden. Zur Auflösung der Struktur der inclusion bodies müssen reduzierende und

solubilisierende Bedingungen geschaffen werden. Das geschieht mit einer Kombination aus 8 M Guanidinium Hydrochlorid (GdnHCl) und dem Reduktionsmittel Dithiothreitol (100 mM). Somit kann nach dieser Solubilisierung und einem weiteren Zentrifugation (30.000g für 30 min) gewährleistet werden, dass die gelösten Proteine im Überstand als monomeres Protein und ohne intra- und intermolekularen Disulfidbrücken vorliegen (diese können wieder bei -70°C gelagert werden).

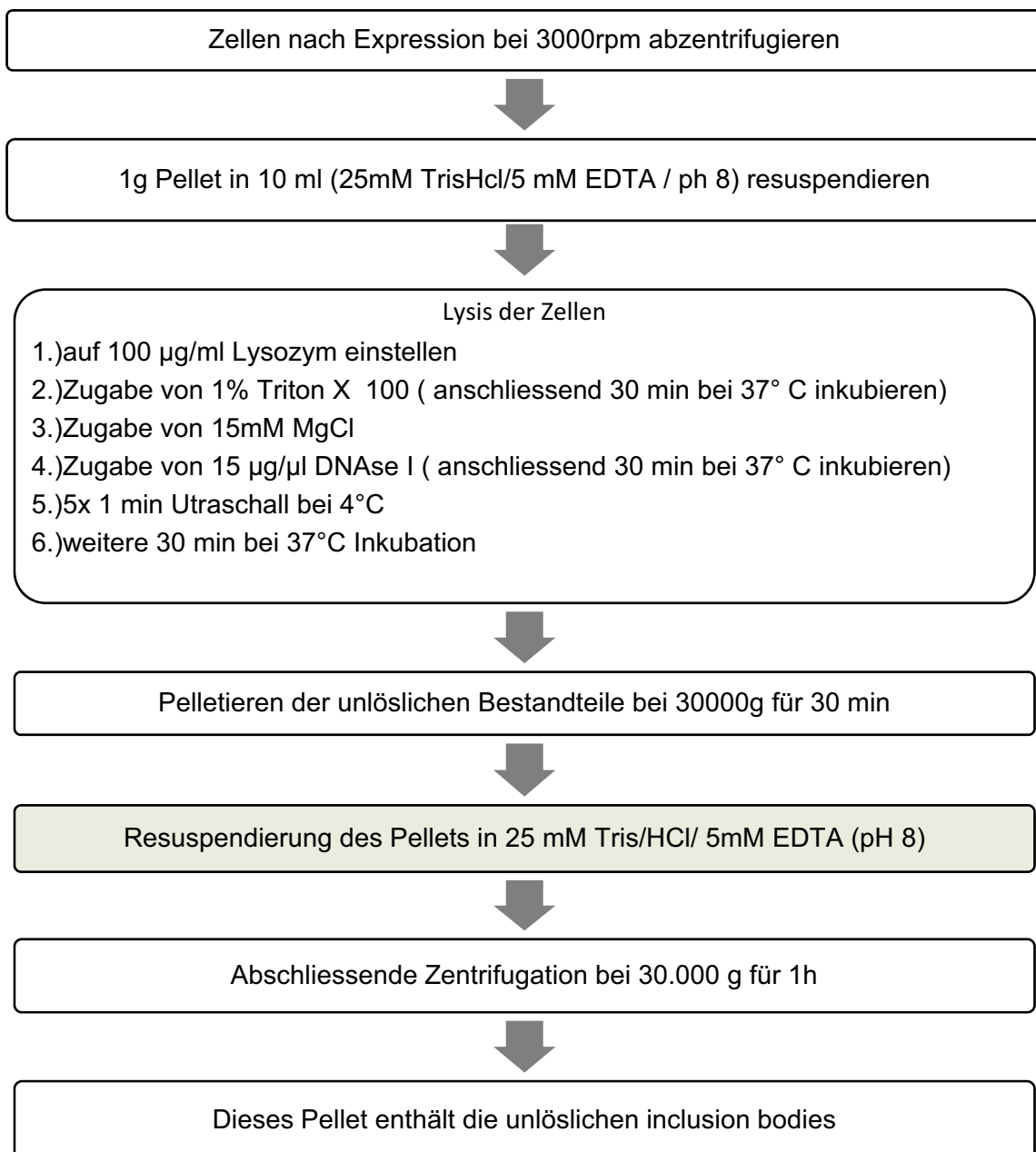


Abb. 2.1.: Schematischer Ablauf der Präparation von „inclusion bodies“ aus E. Coli-Zellen

Die weitere Aufreinigung erfolgt über zwei chromatographische Säulen-Systeme. Zuerst wird das solubilisierter Protein durch eine Größenausschluss Chromatographie („size exclusion chromatography“; SEC) nach Molekulargewicht und in einem weiteren Schritt, der „reversed-phase-high-pressure-liquid-chromatography“ (RP-HPLC), nach Hydrophobizität aufgetrennt.

Die SEC-Säule (Amersham Bioscience, XK26/60“Prep-Grade“, Säulenmaterial Superdex 200), angeschlossen an ein „Äkta-Prime“(Amersham Bioscience)-FPLC („fast performance liquid chromatography“; Flussrate: 4,4 ml/min)-System wird vor der Auftrennung des Protein-Solubilisats mit 350 ml (= 1 Säulenvolumen (CV)) 10 mM NaPi-Puffer (pH 7,2; 0,45 µm steril filtriert) und mit 700 ml (2CV) 6 M GndHCl (12,5 mM Tris/HCl, pH 8; 0,45 µm steril filtriert) equilibriert. Danach wird das Solubilisat (0,45µm steril filtriert) über das Injektionsventil auf die Chromatographie-Säule gegeben und mit 6 M GndHCl (12,5 mM Tris/HCl, pH 8) als Laufpuffer der Größe nach aufgetrennt. Die verschiedenen Fraktionen wurden mit einer SDS-PAGE und nachfolgenden Western-Blot charakterisiert und recPrP enthaltende Fraktion zur weiteren Aufreinigung mittels RP-HPLC vereinigt.

Da vor der SEC die Proteine vollkommen reduziert, d.h. ohne intakte Disulfidbrücke, vorlagen muss diese nun vor der RP-HPLC wieder geschlossen werden. Dies wird in einer 24 stündigen Inkubation des Eluates mit 1 mM Gluthathiol (oxidierte Form) erreicht. Für die Aufreinigung mittels RP-HPLC nutzt man die verschiedenen Hydrophobizitäten der zu trennenden Substanzen, wobei bei der reversed-phase-chromatographie die mobile Phase (Laufpuffer) polarer als die stationäre Phase (hier: C₄-Säulenmaterial) ist. Die unpolare C₄-Säule besitzt ein Kohlenstoffgehalt von 2 % und ist speziell für die Trennung von hydrophoben Biomolekülen, wie z. B. Membranproteinen entwickelt worden. Als mobile Phase wird ein Gradient zwischen Acetonitril (ACN) und H₂O_{deion.} eingesetzt. Dabei ist von Bedeutung, dass sich die Polarität im Verlauf des Gradienten ändert. Die Elutionskraft des Gradienten hängt von der Polarität des Lösungsmittels ab, um so unpolarer die mobile Phase ist desto höher ist die Elutionskraft. Den Anfang des Gradienten bildet zunächst 100 % H₂O_{deion.} mit einer Polarität von >1,11 [E₀, ε₀]. Nach 10 min wird mit Acetonitril ein Gradient gegenüber dem H₂O_{deion.} aufgebaut. ACN besitzt eine Polarität von 0,65 [E₀, ε₀]. So wird durch einen steigenden ACN-Anteil eine sinkende Polarität im Gradienten verursacht, der zu einer erhöhten Elution führt. Dadurch werden die in der aufgetragenen Probe enthaltenden Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen

Hydrophobizitäten aufgetrennt. Typischerweise verteilt sich das rekombinante Protein auf zwei verschiedenen Peaks, die zu unterschiedlichen Zeiten eluieren und somit auch eine unterschiedliche Hydrophobizität besitzen. Der hydrophobere, spätere, Peak beinhaltet die reduzierte Form des recPrP(90-231). Somit ist gewährleistet, dass die reduzierte und oxidierte Form des recPrP getrennt voneinander aufgereinigt werden können. Danach wird unter Vakuum die oxidierte Form des recPrPs lyophilisiert und kann so bei -70°C gelagert werden.

2.3.4 De- und Renaturierung des Protein-Lyophilisates

Um die benötigten Versuchsbedingungen, vergleichbare Ausgangsstruktur und Puffer Bedingungen zu gewährleisten, wurde das Lyophilisat, welches neben dem Protein auch Acetonitril und Trifluoressigsäure (TFA; 0,01 %) enthielt, denaturiert und wieder renaturiert. Hierbei wurde gleichzeitig ein Pufferwechsel zu 1 mM NaAc pH 4,0 durchgeführt. Das Aufreinigungsprotokoll entspricht einer Modifizierung des Protokolls von Mehlhorn und Kollegen (Mehlhorn *et al.* 1996), welches auf die Messvoraussetzungen hin optimiert wurde (Jansen, 1998). Ca. 1 mg des Lyophilisats wurde in 200 µl H₂O_{deion.} gelöst. Um die Konzentration zu bestimmen, wurde eine 1:100-Verdünnung in H₂O_{deion.} hergestellt und die Absorption bei 280 nm gemessen ($\epsilon_{280\text{nm}} = 2,472$ für rPrP(90-231)). Nachfolgend wurde die Proteinlösung auf 5 mg/ml eingestellt. Zur vollständigen Denaturierung des Proteins wurde das Vierfache Volumen 8 M GdnHCl (Endkonzentration ca. 6 M) zugegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Renaturierung erfolgte durch schnelles Verdünnen der Lösung mit 25 mM Tris/5 mM EDTA pH 8 zu einer 1:10-Verdünnung. Anschließend wurde die Proteinlösung in Centricon-Zentrifugen-Filtereinheiten mit einem Ausschlussvolumen von 10 kDa (Amicon Inc., Beverly, USA) aufkonzentriert. Das Aufkonzentrieren erfolgte durch Zentrifugation mit 7500 x g im GA10 Rotor (Beckman, Palo Alto, USA). Die Centricon-Filtereinheiten wurden so lange zentrifugiert, bis die Proteinlösung auf ein Volumen von ca. 40 µl (Endpunkt-Volumen der Filtereinheit) eingeeengt war. Dann erfolgte ein Pufferwechsel, indem man das Konzentrat dreimal mit 2 ml NaAc pH 4,0 auffüllte und jeweils bis zum Endpunkt-Volumen aufkonzentrierte. Von dem Konzentrat wurde die Konzentration bestimmt (s. Kap. 2.4), dann aliquotiert und bei -70° C gelagert und für die Versuche eingesetzt.

Typischerweise wurden die PrP-Lösung durch Einstellung der Lösungen auf 0,2 % SDS/10 mM HEPES pH 7,2 und einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml eingestellt.

2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

2.4.1 Absorptionsmessung

Die Konzentration von Proteinlösungen kann über die Absorption auf zwei Arten bestimmt werden. Einmal wurden die Lösungen im Spektralphotometer bei 280 nm gemessen und die Konzentration über den Extinktionskoeffizienten von $\epsilon_{280\text{nm}} = 2,4724$ für rPrP (90-231) (Mehlhorn *et al.*, 1996) mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes bestimmt. Hierbei wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin genutzt. Zur Messung wurde das Spektralphotometer DU 640 (Beckman, Palo Alto, USA) verwendet.

2.4.2 Micro BCATM-Test

Die Proteinkonzentrationsbestimmung mit Hilfe des Micro BCATM-Testes (Pierce, Rockford, Illinois, USA) beruht auf einer quantitativen kolorimetrischen Methode. In alkalischer Umgebung reduzieren Proteine Cu^{2+} zu Cu^{1+} . Zwei BCA-Moleküle bilden dann mit Cu^{1+} einen Chelatkomplex, der bei einer Wellenlänge von 562 nm absorbiert. Eine 1:1 Mischung aus Proteinlösung und Reaktionslösung wird zunächst für eine Stunde bei 60° C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Absorption bei 562 nm gemessen. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, erstellt man mit einer BSA-Verdünnungsreihe eine Eichgerade und liest daran die Konzentration der unbekannten Proteinlösung ab.

Lösungen:

Micro BCATM Reagenz A: Natriumcarbonat, Natriumdicarbonat, Natriumtartrat, 0,2 N NaOH

Micro BCATM Reagenz B: 4 %ige Bichinchonin-Säure (BCA)

Micro BCATM Reagenz C: 4 %ige Kupfersäure in Pentahydratwasser

Albuminstandard: 2 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) in 0,9 %iger Kochsalzlösung, 0,05 % Natriumazid

Reaktionslösung: 25 Teile Micro BCA™ Reagenz A,
 24 Teile Micro BCA™ Reagenz B,
 1 Teil Micro BCA™ Reagenz C

2. 5 Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie

2.5.1 Prinzip des Zirkulardichroismus

Beim Zirkulardichroismus (CD) wird die Wechselwirkung von optisch aktiven Substanzen mit circular polarisiertem Licht ausgenutzt. Hat eine Substanz verschiedene Extinktionskoeffizienten für links- und rechtszirkular polarisiertes Licht, so ist ein CD-Effekt messbar. Der Unterschied $\Delta \epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$ ist die eigentliche Messgröße. Es wird aber meist die Elliptizität (θ) (s. Gl. 2.1) angegeben.

$$\theta(\lambda) = \ln 10 \times \frac{180}{2\pi} \times (\epsilon_L - \epsilon_R) \times c \times d$$

mit d: Schichtdicke

c: Konzentration

ϵ_L : Extinktionskoeffizient der linkszirkularpolarisierten Komponente

ϵ_R : Extinktionskoeffizient der rechtszirkularpolarisierten Komponente

Gl. 2.1: Berechnung der Elliptizität

Die Abhängigkeit der Elliptizität von der Wellenlänge des Lichtes ergibt das CD-Spektrum. Bei der UV-CD-Spektroskopie von Proteinen im fernen UV-Bereich wird der CD-Effekt durch die asymmetrische Sekundärstruktur verursacht. Typische Proteinsekundärstrukturelemente bilden jeweils charakteristische CD-Spektren aus (s. Abb. 2.2).

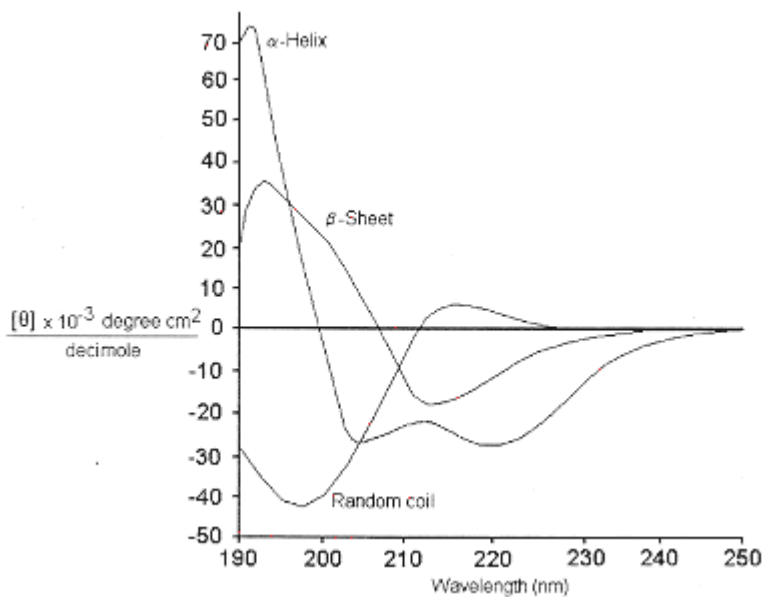


Abb. 2.2: CD-Spektren typischer Sekundärstrukturelemente

Gezeigt werden α -helikale-, β -Faltblatt und „random-coil“- Beispielspektren (nach Greenfield & Fasman *et al.*, 1969).

2.5.2 Messung des Zirkulardichroismus

Die CD-Spektren wurden mit einem Spektralpharimeter J-715 (Jasco® Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt) aufgenommen, welches zu Beginn jeder Messreihe mit Ammonium-d-Campher-10-Sulfat geeicht wurde. Bei der Verwendung von Mikroküvetten (Helma, Müllheim) reichten 150 μl als minimales Probenvolumen mit einer Proteinkonzentration von 100-150 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Die Spektren wurden mit einer Aufnahmegeschwindigkeit von 50 nm/min und einer Auflösung von 1 nm bei Raumtemperatur im Bereich von 195–260 nm aufgenommen. In Küvetten mit einem kürzeren Lichtweg ist die Messung bis hin zum fernen UV-Spektrum möglich. In Mikroküvetten waren Messungen nur bis 195 nm auswertbar, da hier die Absorption des NaCl die Messung zu tieferen Wellenlängen ($\leq 195 \text{ nm}$) verhinderte. Es wurden jeweils 10 Spektren pro Probe aufgenommen und gemittelt. Jede Messung wurde gegen das entsprechende Pufferspektrum korrigiert. Während der Messungen wurde die Probekammer mit Stickstoff gespült um die Ozonproduktion im Messraum zu vermindern.

2.6 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer denaturierenden, diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (1989) in einer Hoefer SE 600 Gelelektrophoresekommer von Pharma Biotech (San Francisco, USA) mit vertikalen Plattengelen. Zunächst wurde ein 15 %iges Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und ein 5 %iges Sammelgel auf das Trenngel geschichtet. Die Proben wurden 1:4 mit SDS-PAGE-Auftragspuffer (4x) gemischt und 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte für 30 Minuten bei 180 V und dann für zwei bis drei Stunden bei 300 V oder alternativ bei 30 V über Nacht. Zur Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteine wurde ein Proteinstandard aufgetragen.

Acrylamid-Stammlösung (30 : 0,8)

30 % Acrylamid

0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid

Die Lösung wurde für mindestens 30 Minuten mit Amberlite MB3 gerührt, um die freie Acrylsäure zu binden, und anschließend filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

10 x Gelelektrophoresepuffer nach Laemmli

0,25 M Tris/HCl pH 8,3

1,9 M Glycin

Bei der Elektrophorese wurde eine 1:10-Verdünnung eingesetzt, der anschließend SDS bis zu einer Endkonzentration von 0,1 % zugesetzt wurde.

Trenngel

380 mM Tris/HCl, pH 8,8

15 % Acrylamid/Bisacrylamid (30 : 0,8)

0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)

0,1 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)

0,1 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)

Sammelgel

124 mM 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

5 % Acrylamid/Bisacrylamid (30 : 0,8)

0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)

0,1 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)

0,1 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)

2.7 Semi-Dry-Western-Blot

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine nach dem Semi Dry-Western-Blot-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran (Millipore GmbH, Neu Isenburg, Deutschland) mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen werden. Dazu wurde das Gel zuvor 15 min in 1 x Lämmli- Puffer gewaschen. Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung in Ethanol getränkt und anschließend zusammen mit sechs Chromatographiepapieren (Whatman 3 MM Chr) ebenfalls in 1 x Lämmli-Puffer geschwenkt. Der Aufbau in der Semi-Dry Electrophoresis Transfer Cell (Biorad, München, Deutschland) wurde wie folgt vorgenommen: „Anode“-3x Whatman, PVDF-Membran, Gel, 3x Whatman-„Kathode“. Der Transfer erfolgte für 50min bei 1,5 mA/cm² und maximal 25 V. Die Detektion erfolgte durch einen immunologischen Proteinnachweis (s. Kap. 2.8).

2.8 Immunologischer Proteinnachweis

Zunächst wurden freie Bindeplätze für Proteine auf der Membran durch Schwenken der Membran in 5 % Milchpulver (Frema-Reform, DE-VAU-GE, Lüneburg) in TBST-Puffer für eine Stunde (optional ü. N.) blockiert. Die geblottete Membran wurde dann kurz mit TBST-Puffer gewaschen. Für den spezifischen Proteinnachweis wurden primäre Antikörper (AK) in einer Verdünnung von 1:10000 in TBST-Puffer verwendet. Die Membran wurde zwei Stunden (optional ü. N. bei 4°C) in Primärantikörper-Lösung bei Raumtemperatur geschüttelt. Dann wurde zwei mal zehn Minuten mit TBST-Puffer gewaschen, um ungebundenen Erstantikörper zu entfernen. Danach wurde Zweitantikörper-Lösung („Goat-anti-Human“, Jackson Immunoresearch, USA) für ein bis zwei Stunden auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur

geschüttelt. Daraufhin erfolgte dreimaliges Waschen mit TBST-Puffer für je zehn Minuten, um die Membran von ungebundenem Zweitantikörper zu befreien.

Der Nachweis erfolgte durch eine Chemolumineszenzreaktion. Hierzu wurde die Membran für eine Minute mit dem ECL-Detektions-Reagenz (Amersham, Buckinghamshire, GB) benetzt. Hierbei wird eine Peroxidase-katalysierte Oxidation von Luminol im alkalischen Medium induziert. Luminol zeigt bei alkalischer Oxidation mit H_2O_2 eine starke Lumineszenz. Die Lumineszenz wurde bei einer Expositionszeit von 20 Sekunden bis zehn Minuten mit Röntgenfilmen (Kodak-X-OMATTM, Sigma, St. Louis, USA) detektiert.

2.9 Proteolyse mittels Proteinase K

Zur Bestimmung des Proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH) resistenten Anteils der generierten Aggregate wurden die Proben auf folgende, für die Proteolyse mittels Proteinase K optimierten, Puffer- und Salzbedingungen eingestellt:

50 mM Tris HCl pH 8,0

100 mM NaCl

2,5 mM EDTA

Für einen Proteolyse Ansatz wurde nach der Konversionsreaktion je 3 μg des Ansatzes mit den angegebenen Mengen von Proteinase K versetzt (w/w).

Durch die Zugabe der Proteinase K (PK) in dem jeweils angegebenen Konzentrationsverhältnis wurde die Proteolyse initiiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und über die Dauer von einer Stunde. Die Proteolyse wurde durch die Zugabe von Auftragspuffer (und einer Zugabe von 2M Harnstoff (Endkonzentration)) und anschließendem Erhitzen auf 95°C für mindestens 10 Minuten gestoppt. Die Detektion der Proteinase K-resistenten Abschnitte wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot detektiert.

2.10 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Der Elektronenstrahl wird durch eine stromdurchflossene und dadurch aufgeheizte, haarnadelförmig gebaute Kathode erzeugt und durch eine an eine Anode angelegte Hochspannung abgesaugt. Diese Beschleunigungsspannung beträgt typischerweise 50-400 kV. Je höher sie ist, desto geringer ist die Wellenlänge der Elektronenstrahlung und desto höher das Auflösungsvermögen. Allerdings wird die Auflösung in der Elektronenmikroskopie weniger durch diesen Faktor als vielmehr durch die Qualität der Linsensysteme, vor allem aber durch die Herstellungstechnik des Präparats begrenzt. Moderne Geräte erreichen Auflösungen von 0,2-0,3 nm, bei biologischen Objekten sind aber nur selten Auflösungen unter 2 nm (bzw. 1 nm) zu erreichen. Die förderliche Vergrößerung liegt damit in der Größenordnung von maximal 200.000x. Der beschleunigte Elektronenstrahl tritt durch eine Bohrung am Boden der Anode hindurch, sein Weg kann nunmehr analog dem eines Lichtstrahls im Lichtmikroskop verfolgt werden. Die Linsensysteme bestehen aus stromdurchflossenen Spulen, die um sich herum ein elektromagnetisches Feld erzeugen. Der Strahl wird als erstes durch einen Kondensor gebündelt. Er tritt dann durch das Objekt hindurch, an dem er partiell abgelenkt wird. Der Grad der Ablenkung hängt von der Elektronendichte der Atome im Präparat ab. Je höher deren Atommasse ist, desto stärker ist die Ablenkung. Da biologische Objekte zum überwiegenden Teil aus Atomen niedriger Ordnungszahlen (C, H, N, O) bestehen, erzeugen sie einen nur geringen Kontrast. Die Präparate müssen daher in der Regel durch spezielle Kontrastmittel (Schwermetallsalze, z. B. Ammoniummolybdat oder Uranylacetat bzw. Phosphorwolframsäure) behandelt werden, damit ein ausreichender Kontrast entsteht. Sie dürfen zudem nicht viel dicker als 100 nm sein, denn durch Elektronenabsorption wird die Temperatur erhöht. Die wiederum kann zur Zerstörung des Objekts führen. Nach Durchtritt durch das Objekt werden die gestreuten Elektronen von einem Objektiv gesammelt; es entsteht dadurch ein Zwischenbild, das anschließend durch ein weiteres Linsensystem (hier Projektiv genannt) nachvergrößert wird. Das dabei entstehende Bild wird auf einem fluoreszierenden Schirm sichtbar gemacht und kann auf einem photographischen Film oder mittels angeschlossenen CCD (Charge-Coupled-Device)-Kamera dokumentiert werden. Der Schwärzungsgrad (Grauschattierungen) spiegelt die Elektronendichte (= Atommassenunterschiede) im durchstrahlten Präparat wieder.

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden EM-Aufnahmen wurden mit einem Zeiss EM 910 und einem Philips-Tecnai (G-Serie)–Transmissionselektronenmikroskop aufgenommen.

2.10.1 Auftragung der Probe auf die präparierten Netze und Negativ-Kontrastierung

Wie unter 2.10 erwähnt bestehen Proteine hauptsächlich aus Atomen mit einer geringen Elektronendichte. Dies hat zur Folge, dass der vom TEM emittierte Elektronenstrahl fast ungehindert durch das Protein treten würde und es zu fast keiner Abbildung kommen würde.

Deshalb ist bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Proteinaggregaten das Verfahren der Negativkontrastierung von großem Nutzen. Es lagern sich die Schwermetallionen an die eigentlichen Strukturen an. Im Elektronenmikroskop ist demnach nicht die Aggregatstruktur selbst, sondern deren Umgebung durch hohen Kontrast gekennzeichnet.

Die zur Elektronenmikroskopie verwendeten Nickel-Netze (200 Mesh, Nickelnetze mit Formvar und Kohle beschichtet, PLANO GmbH; Wetzlar) müssen vor ihrer Verwendung noch zur besseren Benetzung behandelt werden. Die kolloidiale Kohleschicht verliert schnell nach der Aufbringung ihre Ladung und ist somit hydrophob. Die Adsorptionseffizienz und die Qualität der Färbung sind von den Ladungseigenschaften der Trägerfilmoberfläche abhängig. Zur besseren Benetzung mit der Probe, was gleichzeitig einer homogenen Verteilung auf dem Netz entspricht, müssen diese Netzoberflächen wieder an Hydrophilität gewinnen. Die Netzen (mit Trägerfilmen) werden deshalb vor der Adsorption der Probe einer Glimmentladung ausgesetzt. Dabei wird in einer Vakuumkammer bei einem Partialdruck von ca. 0,01 mBar zwischen zwei Elektroden eine Wechselspannung angelegt (60 sec.). Dadurch werden die Restmoleküle in der Kammer ionisiert. Diese Radikale induzieren in der oberen Kohleschicht eine Ladung, die sie für kurze Zeit an der Luft hydrophil werden lässt. So behandelte Netze sollten möglichst bald (innerhalb einer Stunde) verwendet werden, da die Ladung exponentiell wieder abnimmt.

Zur Probenauftragung werden 5-10 µl einer Probe auf ein Netz aufgebracht und 1-5 Minuten zur Adsorption auf dem Netz inkubiert. Die Inkubationszeit variiert mit der Proteinkonzentration und stellt einen persönlichen Erfahrungswert dar. Hierbei sollte eine ausgewogene Inkubationszeit verwendet werden, in der genügend Protein, aber so wenig wie möglich Artefakte auf das Netz gelangen. Die Flüssigkeit wird dabei nicht vom Netz abgesogen, sondern erst einmal mit 0,1 M Ammoniumacetat (NH₃Ac) und 0,01 M NH₃Ac gewaschen um mögliche negative Wechselwirkungen des Probenpuffers mit dem Kontrastmittel zu vermeiden. Danach werden die Proben mit dem eigentlichen Negativkontrast versehen. Dies wurde in dieser Arbeit ausschließlich mit dem Salz Ammoniummolybdat (2 % w/v jeweils frisch steril filtriert) durchgeführt. Dazu wurde das Netz zweimal (mit adsorbierter Probe) für einige Sekunden mit dem Kontrastmittel behandelt. Anschließend musste die noch verbleibende Feuchtigkeit mit einem Filterpapier abgezogen werden um den Färbeprozess zu stoppen.

Danach können die Trägernetze mit den Proben in sogenannten „Gridboxen“ verwahrt werden. Diese Proben haben dann eine Haltbarkeit von ca. einem Jahr.

2.10.2 Immunogoldmarkierung von Proteinaggregaten

Um Proteine innerhalb einer möglichen Mischung aus verschiedenen Proteinen in der Elektronenmikroskopie identifizieren oder gleichförmige Aggregate aus verschiedenen Proteinen auseinander halten zu können werden diese Probe der Immunogoldmarkierung unterzogen. Hierzu werden Proteine (oder deren Aggregate) mit den entsprechenden Primär-Antikörpern markiert. Dieser Antikörper kann dann durch ein System von spezifischen Sekundär- und mit kolloidalem Gold (5nm Durchmesser) gekoppelten Tertiärantikörper markiert werden. Dieser Tertiärantikörper kann universeller verwendet werden, da die Spezifität durch den Sekundär- und Primärantikörper vermittelt wird. Daher können verschiedenen Kombinationen aus Sekundär und Primärantikörper verwendet werden, ohne dass der mit Gold markierte Antikörper gewechselt werden muss.

Danach trägt das markierte Aggregat neben dem negativen Kontrast auch noch einen Antikörper mit Goldpartikel. Da das Gold eine hohe Elektronendichte aufweist wird es später in der mikroskopischen Betrachtung als schwarzer Punkt wahrgenommen und markiert somit das Aggregat.

Zuerst einmal müssen dazu die Proben auf das Netz aufgebracht werden. Dies geschieht nach der unter 2.10.1 beschriebenen Methode. Da in diesem Fall aber das Trägernetz einer längeren Behandlung unterzogen wird, wurde die Adsorptionszeit auf mindestens 5 Minuten erhöht um Materialverluste der eigentlichen Probe bei der nachfolgenden Behandlung durch eine gesteigerte Adsorption auszugleichen. Auch wird der Färbeschritt erst am Ende des Prozesses durchgeführt.

Für die nachfolgenden Schritte wird das Nickelnetz mit der adsorbierten Probe auf einem jeweils 50 µl umfassenden Tropfen flottieren/inkubieren gelassen. Dabei hält die Oberflächenspannung der Tropfen die Netze auf der Oberfläche. Nach der Probenadsorption werden auf diese Weise folgende Wasch- und Fixierungsschritte durchgeführt:

- 1.) 0,1 M Ammonium Acetat
- 2.) 0,01 M Ammonium Acetat
- 3.) 2 x 2 %iges Uranyl Acetat (dient der zusätzlichen Fixierung der Probe)
- 4.) H₂O_{deion.}
- 5.) TBS

In Analogie zum bekannten Western-Blot-Verfahren (siehe 2.7) muss die Oberfläche, nach der Adsorption der Probe, vor der Antikörperbehandlung mit einem anderen Protein blockiert werden. Dies geschieht mit einer 3 %igen BSA (in TBS)-Lösung. Diese BSA-Lösung wurde vor der Verwendung einem 100000 x g Spin (1h) unterzogen um mögliche BSA-Aggregate zu pelletieren und monomeres BSA zu erhalten. Nach dieser Zentrifugation wird daher nur der lösliche, monomere Überstand benutzt und das Pellet verworfen. Die Blockierung der freien Flächen auf dem Trägernetz erfolgt für 90 Minuten in einer Feuchtigkeitskammer um das Austrocknen der Tropfen und Netze zu verhindern.

Nach dieser Behandlung werden die Netze wiederum in eine Feuchtigkeitskammer gegeben, in der sie mit dem primären (PrP-spezifischen) Antikörper (humanisierte Anti-Prion Antikörper s. 2.2) in den jeweils angegebenen Verdünnungen (v/v) in 0,1 % BSA in TBS über Nacht bei 4°C inkubiert (alternativ auch 2h bei 25°C). Neben den Antikörper enthaltenden Ansätzen, wurde immer ein Ansatz ohne primären Antikörper (nur 0,1 % BSA in TBS) inkubiert um später das Ausmaß des unspezifischen Labels beurteilen zu können. Um nun den primären, nicht gebundenen Antikörper vom Netz zu entfernen, werden die Netze 5-mal für eine Minute in einem Tropfen 0,1 % BSA in TBS gewaschen, bevor sie mit dem sekundären Antikörper in Kontakt kommen.

Nach diesem Schritt folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (1,3 mg/ml; Rabbid-anti-Human; Jackson Lab, USA) in einer Verdünnung von 1:100 für 1h bei Raumtemperatur. Danach erfolgte wieder ein Waschschrift von 5 x 1 Minute in 0,1 % BSA in TBS um nun die Probe mit dem tertiären Antikörper mit 5 nm großen Goldpartikeln zu markieren (Verdünnung: 1:20 in 0,1 % BSA in TBS; Goat anti Rabbid IgG, 5 nm gold, Ted Pella, USA). Dazu wurden wieder die Netze für 30 minuten inkubiert, erneut 5 x 1 Minute in 0,1 % BSA gewaschen um darauf folgend noch mit Negativkontrast wie folgt versehen zu werden:

1.) TBS

2.) H₂O_{deion.}

3.) 2x 2 % Ammoniummolybdat

Danach wurde die restliche Feuchtigkeit auf dem Netz mit Filterpapier abgesogen und die Netze für die elektronenmikroskopische Betrachtung in einer Aufbewahrungsbox gelagert.

2.11 Zentrifugationen

2.11.1 Differentielle Ultrazentrifugation

Die Löslichkeit eines Proteins kann durch differentielle Ultrazentrifugation bestimmt werden. Hierzu wurden die Proben für eine Stunde bei 100.000 x g (42.000 rpm in den TLA-45 Rotoren) bei 25° C in der Beckman Optima TM TL Ultrazentrifuge Beckman, Palo Alto, USA)

zentrifugiert. Laut Hjelmeland (Hjelmeland *et al.*, 1984) gelten Partikel, die sich anschließend im Überstand befinden, als löslich.

2.11.2 Analytische Ultrazentrifugation

Die analytische Ultrazentrifugation (AUZ) ist eine klassische Methode der Biochemie und Molekularbiologie, die mit den Fortschritten in der Datenanalyse einhergehend wieder häufiger Anwendung findet. Im Zuge der neuen Möglichkeiten für die Datenanalyse durch Computerprogramme, nimmt die Bedeutung der AUZ für die Proteinforschung zu. Die analytische Ultrazentrifugation ist eine Absolutmethode und

bietet die Möglichkeit eine Population von Molekülen in einem Gesamtgemisch anhand ihres Verhaltens im Zentrifugalfeld zu untersuchen und zu charakterisieren.

Über das Sedimentationsverhalten eines Moleküls können verschiedene Charakteristika bestimmt werden. Über das Verhalten im Zentrifugalfeld können nicht nur der Sedimentationskoeffizient bestimmt werden, sondern auch der Diffusionskoeffizient, das Molekulargewicht, sowie Informationen über die räumliche Gestalt des Moleküls erhalten werden. Es werden zwei grundsätzliche experimentelle Ansätze unterschieden, denen beiden die Messung der Konzentration eines Moleküls als Funktion der radialen Position als Grundlage der Auswertung dient. Das klassische Experiment in der AUZ ist der Sedimentationsgeschwindigkeitslauf (Sedimentation Velocity; kurz SV oder S-Lauf). Aus einem homogenen Gemisch wird durch die Zentrifugalkraft eine synthetische Grenzschicht aus sedimentierenden Molekülen erzeugt.

Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz ist die Gleichgewichtszentrifugation (Sedimentation Equilibrium; kurz SE-oder M-Lauf), bei der eine homogene Probe zentrifugiert wird, bis sich ein zeitunabhängiges Gleichgewicht von Sedimentation und Rückdiffusion einstellt. Aus dem so entstandenen Konzentrationsprofil kann dann das Molekulargewicht des Moleküls bestimmt werden. Dabei fließt der Formfaktor nicht in die Berechnung des Sedimentations- und Diffusionsverhalten ein (siehe auch Gleichung 2.2). Daher kann in dieser Methode das Molekulargewicht eines Proteins oder Proteinkomplexes sehr genau bestimmt werden.

2.11.2 .1 Gleichgewichtszentrifugationsanalyse (M-Lauf)

Die Gleichgewichtszentrifugation nutzt die Tatsache aus, dass Moleküle bei der Zentrifugation nicht nur der Sedimentation unterliegen, sondern auch der Diffusion, die entgegen des Konzentrationsgradienten wirkt. Wird die beschleunigende Kraft klein genug gewählt, stellt sich nach einer Zeit ein Gleichgewicht aus Sedimentation und Diffusion ein, dieses Gleichgewicht wird als zeitunabhängiges Konzentrationsprofil aufgezeichnet.

Durch Kombination der Svedberg-Gleichung mit dem ersten Fick'schen Gesetz der Diffusion wird ein mathematischer Zusammenhang zwischen Sedimentation und

Diffusion geschaffen. Daraus ergibt sich, dass der Gleichgewichtszustand eine Funktion der Molekülmasse m ist:

$$m = \frac{2RT}{(1 - \rho\bar{v})\omega^2} \times \frac{d(\ln c)}{dr^2}$$

m : Molekülmasse

R : Gaskonstante

T : Temperatur

c : Konzentration

R : Radius

ω : Winkelgeschwindigkeit

$\bar{v}$: partielles spezifisches Volumen

P : Dichte des Lösungsmittels

GI. 2.2: Gleichgewichtszustand als Funktion der Molekülmasse

Diese mathematische Formel beinhaltet, dass im Gleichgewichtszustand für r^2 die Konzentration $c(r)$ eine e-Funktion ist: $c(r) = c_0 e^{m\alpha(r^2 - r_0^2)}$

c : Konzentration

r : Radius

m : Masse des Moleküls

wobei α definiert ist als:

$$\alpha = \frac{(1 - \rho\bar{v})\omega^2}{2RT} \times m$$

α : Steigung nach Linearisierung

ρ : Dichte des Lösungsmittels

$\bar{v}$: partielles spezifisches Volumen

ω : Winkelgeschwindigkeit

R : Gaskonstante

T : Temperatur

m : Masse des Moleküls

GI 2.3: Konzentrationsprofil in Abhängigkeit von Molekülmasse und Winkelgeschwindigkeit

Über die Lösung dieser Gleichung kann aus dem Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion, durch eine lineare Auftragung des natürlichen Logarithmus der Konzentration gegen den Radius, eine Steigung ermittelt werden,

über die das Molekulargewichts m berechnet. Die Auswertung, der in einem M-Lauf unter verschiedenen Geschwindigkeiten ermittelten Konzentrationsprofile in der Zelle, wird mittels der Software „Ultrascan“ (Demeler and Saber 1998) analysiert und ausgewertet.

2.12 Analyse der Dimer Kontaktstellen

Quervernetzung und anschließende Analyse der Kontaktstellen im Dimer sind nach dem Protokoll von Kaimann *et al.* (Kaimann 2006, Kaimann *et al.*, 2007) von Fr. Dr. Kaimann durchgeführt worden.

2.13 Thioflavin T Messung

ThT weist durch die Bindung an amyloide Proteinstrukturen charakteristische Änderungen seines Fluoreszenzspektrums auf. Diese zeigen sich durch batho- und hyperchrome Verschiebungen der Fluoreszenz des ThT/Amyloid-Komplexes gegenüber dem freien Farbstoff (LeVine, III 1993).

Die amyloiden Fibrillen zugrunde liegende Sekundärstruktur ist durch ein großes Maß an β -Faltblättern charakterisiert. Diese legen sich in der hoch geordneten Faser im 90°-Winkel zur Faserachse an und laufen dann aufsteigend um die Faserachse herum und bilden die sogenannte cross-beta Struktur (Abb. 2.3). Durch diese Struktur bilden sich parallel zur Faserachse kleine Kanäle aus, in die nach Krebs *et al.* Thioflavin T Moleküle interkalieren können. ThT wäre dann von den Seitenketten des β -Faltblatts umgeben, wodurch es zur Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten und dem ThT Molekül kommt. Diese spezifische Interaktion erlaubt es Thioflavin T zur Identifizierung von Fibrillen zu nutzen (LeVine, III 1993; Naiki *et al.* 1989). Da alle β -Faltblätter Kanäle enthalten, in denen sich ThT einlagern kann, könnten auch sie zu ThT-positiven Fluoreszenzsignalen führen. Nicht in fibrillären Strukturen vorkommende β -Faltblatt Strukturen besitzen allerdings nicht die geordnete Wiederholung der Reste wie dies bei Fibrillen der Fall ist (Krebs *et al.* 2005). Auch die Anzahl der β -Stränge ist hier kleiner. Aus diesem Grund führt die Beimischung von ThT zu einem nativen β -faltblattreichen Protein lediglich zu einer leicht erhöhten Fluoreszenz (LeVine, III 1999). Die Messungen wurden in einem

Fluoreszenzreader Safire²™ (Tecan Trading AG, Schweiz) unter Verwendung von 96-well-Platten (Nunc GmbH, Wiesbaden) durchgeführt. Bei allen Messungen wurden Emissionsspektren mit einer Auflösung von 2 nm bei einer Excitationswellenlänge von 455 nm und einer Spaltweite von 2,5 nm aufgenommen. Die weiteren Geräteeinstellungen sind für jede Messung angegeben. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur (Einzelmessungen) oder 37°C (kinetische Messung) durchgeführt, vor jeder Messung wurde der Probenträger für 30 s linear bei mittlerer Intensität geschüttelt.

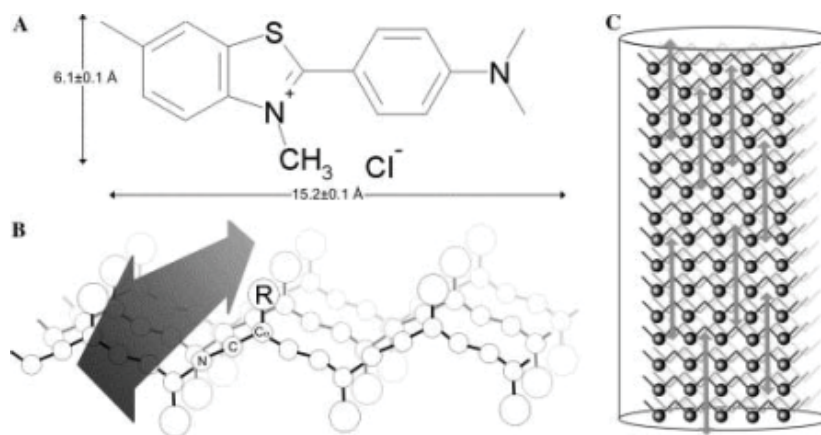


Abb. 2.3 : Thioflavin T

A: Struktur von Thioflavin T, B: Anlagerung von ThT an beta-Faltblätter, C: Interkalation von mehreren ThT-Molekülen an eine fibrilläre Struktur (aus Krebs *et al.* 2005).

2.14 Tierversuche

2.14.1 Verwendete transgene Mauslinie

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden je 30 µl der zu untersuchenden Probe in transgene Mäuse intrazerebral inokuliert. Die verwendete Mauslinie Tg (SHaPrP+/+) 7 PrnP 0/0 überexprimiert PrP^C des Syrischen Goldhamsters (SHaPrP^C) ca. 8fach verglichen mit Syrischen Goldhamstern (Scott *et al.* 1997). Diese Mäuse exprimieren das transgene Konstrukt des Hamsters ohne Hintergrund-Expression des Maus Prion-Proteins.

2.14.2 Vorbereitung aggregierter Proteine für den Tierversuch

Die fibrillär aggregierten CHO-PrP^C-Proben wurden einer 100.000g (1h)-Zentrifugation unterzogen. Das resultierende Pellet wurde dann in 40 µl einer 5 %igen (w/v)-BSA in PBS-Lösung resuspendiert und bis zur intracerebralen Inokulation (je 30 µl) bei -80°C gelagert. In einem alternativen Ansatz dieser Proben wurde vorher das fibrilläre PrP^C an Nitrozellulosepartikel (s. Kap. 2.15) gebunden (Bindung erfolgte über 1h bei Raumtemperatur) und dann auf eine Endkonzentration von 5 % (w/v) in PBS eingestellt. Als Kontrolle dienten jeweils die nicht aggregierten Proben des CHO-PrP^Cs. Jeder Ansatz beinhaltete 12 µg CHO-PrP^C/Tier und pro Reihe (Konversionsansatz mit und ohne Nitrozellulose, α -helikales Ausgangs-material) wurden 4 Tiere verwendet. Alle Tierversuche sind in der Tierversuchs-anstalt des Labors von Dr. S. B. Prusiner (IND, UCSF, San Francisco, USA) durchgeführt worden.

2.15 Herstellung von Nitrozellulosepartikeln

Zur Kopplung der CHO-PrP^C Proben an makromolekulare Partikel für den Tierversuch, sollten die entstandenen Aggregate an Nitrozellulosepartikel gekoppelt werden. Diese Partikel wurden nach einem Protokoll von Steinitz und Tamir (Steinitz and Tamir 1995) hergestellt. Zur Bindung der Proteine wurden diese für 60 min bei Raumtemperatur unter leichter Agitation inkubiert bevor sie dann bei -80°C weggefroren und erst zur Inokulation wieder aufgetaut wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Konversion von rekombinantem PrP (90-231)

Die Grundlage dieser Arbeit stellt das unter 1.7 eingeführte *in vitro* Konversionssystem dar. Hierzu wird rekombinantes Prion-Protein des Segments 90-231 nach der Aufreinigung in 0,2 % (w/v) SDS in 10 mM HEPES (pH 7,2) teildenaturiert. Die Konversion zu amyloiden Fibrillen wird durch das Verdünnen von SDS auf 0,03 % SDS und die parallele Zugabe von 250 mM NaCl (Leffers *et al.* 2005; Stöhr 2003) initiiert. Dieser Zustand ist zunächst löslich, kann deshalb auch als metastabiler Intermediärzustand bezeichnet werden. Dieser ist aufgrund der anfänglichen Löslichkeit für verschiedene spektroskopische Analysen zugänglich. Während einer Inkubation des Ansatzes für mindestens 5 Wochen unter ständigem Schütteln bei 650 rpm und einer Temperatur von 37°C bilden sich fibrilläre Proteinaggregate, welche elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden können. Der Intermediärzustand (der auch als „präamyloid“ bezeichnet werden kann) so wie auch die entstandenen Fibrillen werden im Folgenden näher charakterisiert.

3.1.1 Elektronenmikroskopische Analyse von amyloiden Fibrillen

Im Folgenden wird eine Analyse der in diesem Konversionssystem nach 5-6- wöchiger Inkubationszeit gebildeten fibrillären Ultrastrukturen durchgeführt. Dazu wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Pelletfraktion nach einer Zentrifugation bei 100.000g (1h) und anschließender Negativkontrastierung durchgeführt (Kap. 2.10.1).

Alle der in Abb. 3.1 gezeigten Ultrastrukturen zeichnen sich durch eine laterale Anlagerung der von 8 bis 15 nm breiten Fibrillen aus. Diese Fasern bilden die kleinste fibrilläre Untereinheit der hier gezeigten Überstrukturen. Amyloide Aggregate sind definiert als unverzweigte, fibrilläre Struktur mit einem Durchmesser von 8-15 nm. Es muss erwähnt werden, dass in einigen der gezeigten Anordnungen (Abb. 3.1 B,C) der Eindruck einer Verzweigung der Fasern entsteht. Jedoch handelt es sich stets um die Auflösung lateraler Anordnungen einzelner Fibrillen (Abb. 3.1). Neben diesen

fibrillären Strukturen wird aber immer wieder ein nicht quantifizierter Anteil kleinerer amorpher Aggregate in den Proben detektiert (Daten nicht gezeigt).

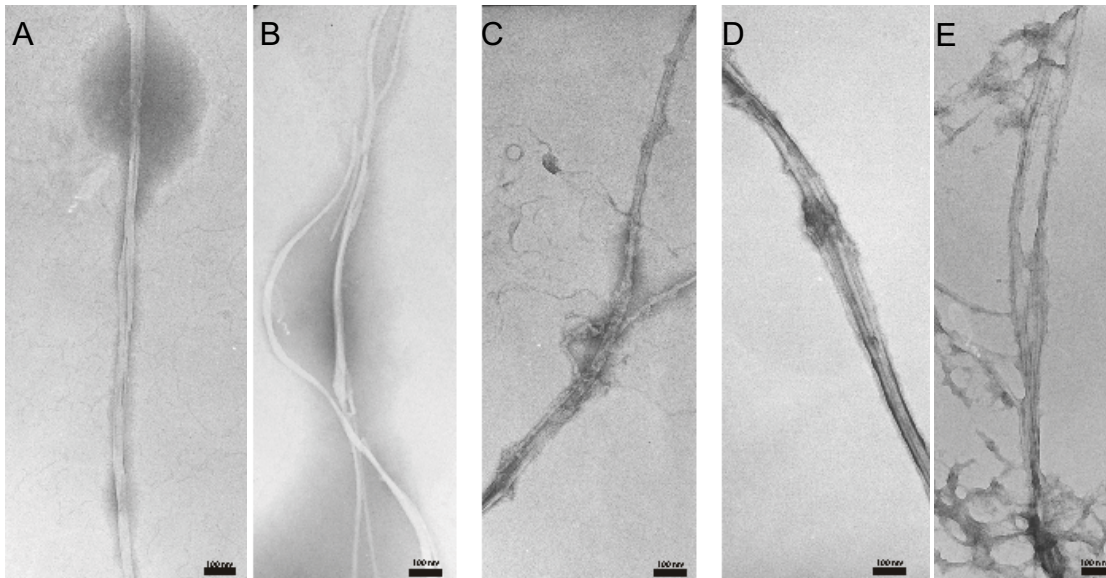


Abb. 3.1: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von recPrP(90-231)-Aggregaten

Bilder zeigen fibrilläre Strukturen bei 40 ng/ μ l/ 0,03 % SDS/250 mM NaCl/ 10 mM HEPES (pH 7.2) nach 5 (A) und 6 Wochen (B-E) Inkubationszeit (Balken entsprechen 100nm).

So kann man davon ausgehen das die in Abb. 3.1 gezeigten Fibrillen die natürliche Bandbreite der fibrillären Strukturen des recPrP(90-231) im Konversionssystem darstellen. Im Folgenden soll nun der metastabile Intermediärzustand analysiert werden, der zu den hier gezeigten amyloiden Strukturen aggregiert.

3.1.2 Sekundärstrukturanalyse des Fibrillen-Intermediärzustandes mittels Zirkulardichroismus-Spektroskopie

Mit der Zirkulardichroismus(CD)-Spektroskopie war es möglich, die Sekundärstrukturanalyse des Ausgangszustandes von PrP der Fibrillogenese zu untersuchen. Da sich die beiden unter Kapitel 1.6 beschriebenen Konversionssysteme lediglich in der Zugabe von NaCl unterscheiden, wurde zum Vergleich auch die NaCl-freie Probe (bei gleicher SDS Konzentration) einer Sekundärstrukturanalyse unterzogen. Dafür wurde rekombinantes Prion-Protein der Sequenz 90-231 (recPrP(90-231)) auf 0,03

% SDS/10 mM HEPES (pH 7.2) verdünnt und jeweils mit und ohne Zugabe von 250 mM NaCl für 24h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die CD-Spektren im Wellenlängenbereich von 250-190 nm gemessen und miteinander verglichen (Abbildung 3.2).

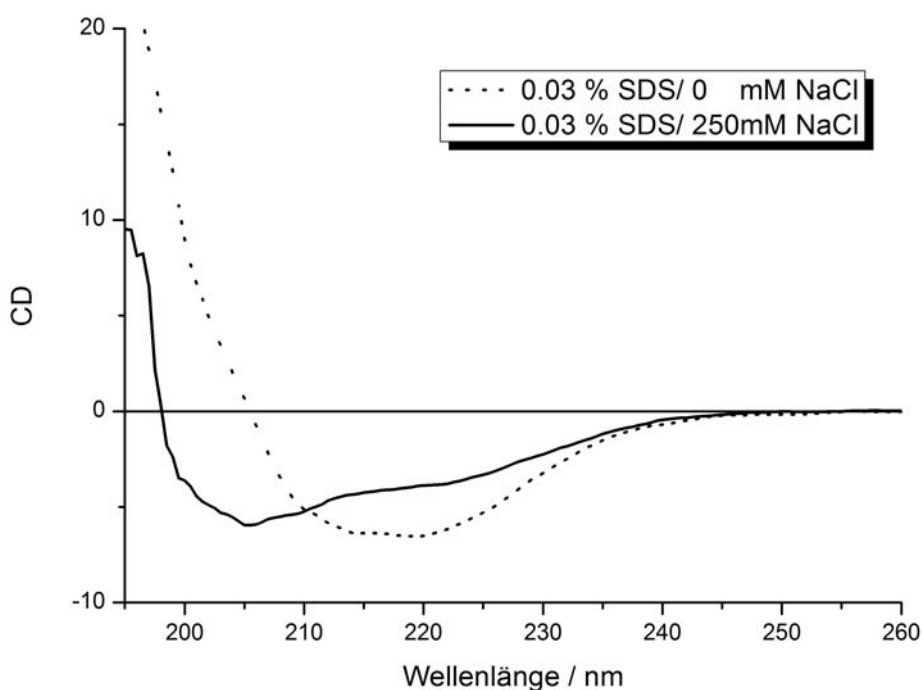


Abb. 3.2: Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie

Jeweils 100 ng/μl des recPrP(90-231) wurden bei 37°C und einer SDS-Konzentration von 0,03 % SDS/250 mM NaCl (Linie) und 0,03 % SDS/ kein NaCl (Punkte) inkubiert. Nach 24h Inkubation wurden die CD-Spektren aufgenommen.

Wie an den Spektren erkennbar ist, hat die Zugabe des NaCl starke Auswirkungen auf die Sekundärstruktur. Ohne die Zugabe von NaCl wird im recPrP(90-231) eine β -faltblattreiche (Abb. 3.2: unterbrochene Linie) Struktur induziert. Diese Sekundärstruktur zeigt in der Analyse mittels CD-Spektroskopie ein für β -faltblattreiche Proteinstrukturen charakteristisches Spektrum mit einem lokalen Minimum bei 218 nm und einem Nulldurchgang bei ca. 205 nm. Die Induktion der beschriebenen Struktur unter Verwendung sehr geringer Mengen von SDS ist auch schon aus früheren Arbeiten bekannt (Leffers *et al.* 2004). Die Zugabe von NaCl bewirkt, dass recPrP(90-231) eine α -helikale Struktur mit deutlichen random-coil Anteilen annimmt. Dies äußert sich durch ein signifikant verändertes CD-Spektrum. Es zeigt ein lokales Minimum bei 220nm und ein absolutes Minimum bei 205nm. Desweiteren ist der Null-

durchgang zu kürzeren Wellenlängen (198nm) verschoben. Die Struktur von recPrP(90-231) in 0,03 % SDS/250 mM NaCl ist vergleichbar mit Sekundärstrukturspektren von recPrP bei höheren (0,06/0,2 % SDS; Abb. 3.3) SDS-Konzentrationen ohne Zugabe von NaCl wie zum Vergleich in Abbildung 3.3 dargestellt. Der präamyloide Übergangszustand sowie die gezeigten Sekundärstrukturen von recPrP bei höheren SDS-Konzentrationen zeigen ein absolutes Minimums bei 207 nm und können daher als teildenaturiert mit α -helikalen Strukturanteilen angesehen werden.

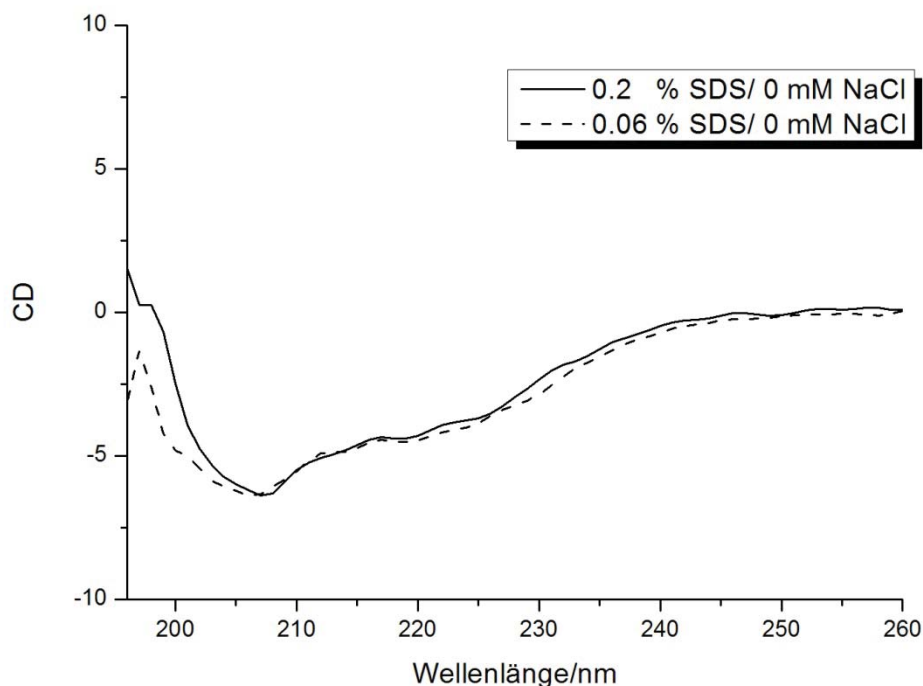


Abb. 3.3: Sekundärstrukturanalyse mittels CD-Spektroskopie

Jeweils 100 ng/ μ l des recPrP(90-231) wurden bei 37°C und einer SDS-Konzentration von 0.2 % SDS (Linie) und 0.06 % SDS (Punkte) inkubiert. Nach 24h Inkubation wurden die CD-Spektren aufgenommen.

3.1.3 Analyse des Intermediärzustandes durch analytische Ultrazentrifugation

Mittels der Analytischen Ultrazentrifugation ist es möglich, Molekülmassen zu bestimmen. Man wählt daher vorteilhaft, die Methode der Sedimentation-Diffusions-Gleichgewichts-Zentrifugation bei vorgegebenen Drehzahlen. Unter diesen Bedingungen bildet sich bei den Drehzahlen ein Gleichgewicht zwischen Sedimentations-

und Diffusionskraft aus. Da sich im stationären Zustand Sedimentation und Diffusion im Gleichgewicht befinden und beide Parameter in gleicher Weise von der Form des Moleküls abhängen, kann das Molekulargewicht im Gegensatz zur Bestimmung aus dem Sedimentationskoeffizienten (S-Wert) allein, ohne den Einfluss des Formparameters berechnet werden (s. Kapitel 2.11.2.1).

Der im vorherigen Kapitel strukturell charakterisierte Ausgangszustand ist für diese Analyse analog eingestellt worden.

Für die folgende Analyse des Intermediärzustandes wurde das vorinkubierte recPrP bei jeweils 15.000; 23.300; 27.000; und 31.600 rpm zentrifugiert, bis sich bei jeder Drehzahl das Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Diffusion des PrPs eingestellt hat. Die Abb. 3.4.A zeigt die Konzentrationsprofile innerhalb der Messzelle für die unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten. Die Daten wurden im Anschluss an die Messung mit der AUZ-Software „ULTRASCAN“ (Demeler *et al.*, 1998) analysiert und ausgewertet. Mit der Analytiksoftware versucht man, die Daten unter Vorgabe verschiedener Modelle der Oligomerisierung und unter Verwendung der mathematischen Beschreibung von Diffusion und Sedimentation (s. Kap 2.11.2.1, Formel 2.2) an die gemessenen Werte anzugleichen. Für den sogenannten „Datenfit“ wird das Molekulargewicht variiert, bis die Abweichung der errechneten von den gemessenen Werten minimiert wurde.

Die Qualität der an die Messdaten angeglichenen theoretischen Werte wird dann in dem unter 3.4.B ($r^2 - r_{\text{ref}}^2$) dargestellten Graphen angegeben, welcher die quadratische Abweichung der erfassten Messwerte von den theoretisch ermittelten Werten repräsentiert. Die Datenanalyse zeigte, dass in dem gewählten Ansatz ein Gleichgewicht zwischen zwei verschiedene recPrP-Spezies mit Molekulargewichten von jeweils 22 kDa (zu 33.3 %) und 35.2 kDa (zu 66.6 %) vorliegen. Das theoretische Molekulargewicht (MW) des rekombinanten Prion Proteins liegt bei 16,243 KDa. Multimere Komplexe des Prion Proteins können also nur ein Vielfaches dieses Molekulargewichtes besitzen. Die Differenz der gemessenen Molekulargewichte zu den theoretisch möglichen können daher nur gebundene SDS-Moleküle sein. Aus dieser Betrachtung ergibt sich, dass der Intermediärzustand der Fibrillogenese ein Monomer (33.3 %) - Dimer (66.6 %)- Gleichgewicht darstellt (s.Tab.3.1). Unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes von SDS (MW: 288,58 Da) lässt sich grob abschätzen, dass ein Dimer ca. 10 und ein Monomer ca. 20 SDS-Moleküle bindet.

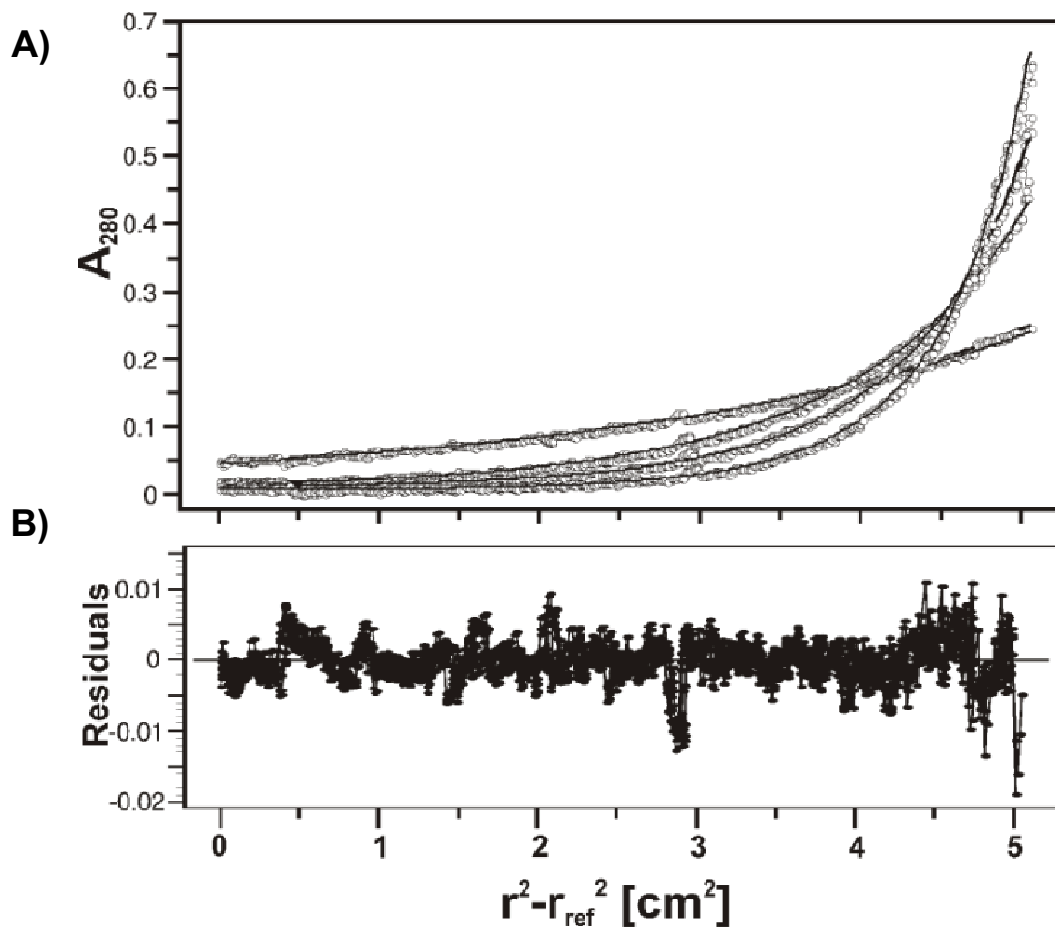


Abb. 3.4: Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichts-Zentrifugationsprofil

Die Proben wurden bei einer SDS Konzentration von 0,03 % SDS und einer Salzkonzentration von 250 mM NaCl für eine Woche inkubiert und anschließend mit Hilfe der AUZ analysiert. A) Konzentrationsprofile der einzelnen Messläufe nach Einstellung des Gleichgewichtes, B) Abweichung der gemessenen Daten zu den errechneten ($r^2 - r_{ref}^2$, s. Text).

Analog zu den Sekundärstrukturanalysen wurde der Vergleichsansatz (0,03 % SDS/ 40 ng/μl / 10 mM HEPES pH 7.2) ohne die Zugabe von NaCl einem Gleichgewichtslauf unterzogen. Dabei stellte sich heraus, dass schon bei der niedrigsten Drehzahl keine Protein-spezifische Absorption in der Küvette zu detektieren war. Dieser Umstand lässt sich durch die Unlöslichkeit des Proteins erklären, die durch die unter 3.2 gezeigte β -faltblattreiche Sekundärstruktur induziert wird. So pelletieren selbst unter der geringsten Drehzahl der Molekulargewichtsanalyse (15.000 rpm) die nach einer Woche gebildeten (sehr wahrscheinlichen amorphen) Aggregate vollständig. Auf die Darstellung dieser Daten wird hier verzichtet, da hier nur ein leerer Graph (vgl. Abb. 3.4.A) gezeigt werden könnte. Daher entziehen sich hochmolekulare amorphe Agg-

regate, aber auch Fibrillen dieser Art der Molekulargewichtsanalyse, da sie selbst bei der geringsten Drehzahl bereits pelletieren.

Tab. 3.1: Zusammenfassung der AUZ-Ergebnisse

(Bedingungen: 10 mM HEPES (pH7.2) / 0,03 % SDS/250 mM NaCl, 40 ng/μl).

	Monomer	Dimer
Theoretische MW	16,2 KDa	32,4 KDa
Gemessenes MW	22 KDa	35,2 KDa
Anzahl gebundener SDS-Moleküle	~ 20	~ 10
Verteilung	33,3 %	66,6 %

3.1.4 Kovalente Verknüpfung des Dimers und anschließende massenspektrometrische Analyse

Im vorherigen Kapitel wurde beschrieben, dass ein Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren des Prion-Proteins unter den hier beschriebenen Bedingungen vorliegt. Dieses Gleichgewicht stellt den löslichen Intermediärzustand der Fibrillenbildung im Konversionssystem dar. Da ein Dimer von PrP unter anderen Bedingungen bereits früher in Bezug auf die molekularen Kontaktstellen der Untereinheiten charakterisiert werden konnte, sind vergleichbare Untersuchungen am hier identifizierten Dimer von besonderem Interesse. Unter der Verwendung eines chemischen Quervernetzlers („Crosslinker“: 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid Hydrochlorid (EDC)) mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse der chemisch fixierten Kontaktstellen sollten mögliche Interaktionspositionen analysiert werden. Die folgenden Daten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Kaimann für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Hierfür wurde durch ein in unserer Gruppe etabliertes Verfahren zur kovalenten Verknüpfung von dimeren Prion-Proteinen mit nachfolgender Analyse der molekularen Kontaktstellen genutzt (Kaimann *et al.*, zur Publikation eingereicht). Für diese Analyse wurde recPrP(90-231) für 24 h unter den beschriebenen Bedingungen zur Fibrillenbildung inkubiert. Die Proben wurden mit dem bivalenten Crosslinker EDC ver-

setzt und die Reaktion für weitere 2h inkubiert. Anschließende Auftrennung in einer SDS-PAGE, d.h. unter denaturierenden Bedingungen, mit darauffolgender Coomassie-Färbung ermöglichten den Nachweis des quervernetzten Dimers.

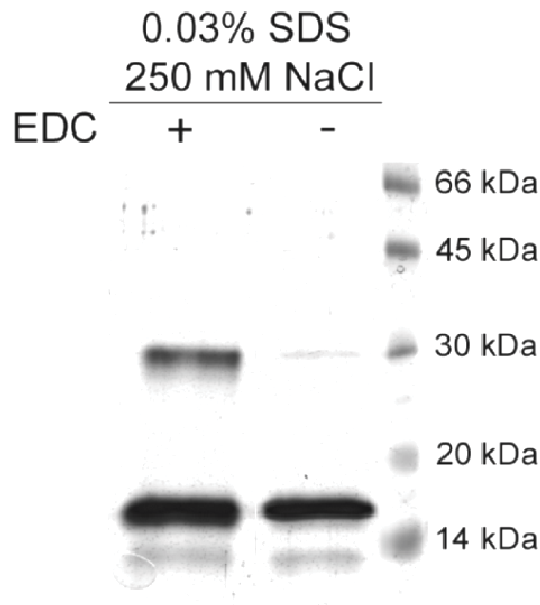


Abb. 3.5: SDS-PAGE-Analyse des Monomer-Dimer-Gleichgewichts

RecPrP(90-231) bei 0.03 % SDS /250 mM NaCl/10 mM NaP_i nach einer Inkubationszeit von 24 h mit (+) oder ohne (-) dem kovalenten Quervernetzer EDC behandelt und durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Färbung nachgewiesen.

In Abbildung 3.5. ist der Vergleich zwischen unbehandelter (Abb. 3.5 „-“) und mit EDC versetzter Probe (Abb. 3.5 „+“) gezeigt. Das durch den kovalenten Crosslinker verbundene Dimer mit der Bande auf Höhe von ca. 30 kDa (theoretisches Molekulargewicht von 32 KDa) kann in der denaturierenden Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nachgewiesen werden. Auch ist in beiden Ansätzen die zu erwartende monomere PrP-Bande (ca. 16 KDa) zu sehen. Somit ist diese kovalente Verknüpfung und Auftrennung gleichzeitig ein komplementärer Nachweis des im vorherigen Kapitel beschriebenen Gleichgewichts. Betrachtet man die Bandenstärke in Abb. 3.5 so fällt auf, dass das vorher ermittelte Gleichgewicht zwischen Dimer und Monomer (66 %:33 %) umgekehrt scheint. Daher sollte erwähnt werden, dass dieser Analyse eine chemische Reaktion zugrunde liegt, die nicht zu 100 % abläuft oder die Dimere noch andere Kontaktstellen besitzen, die nicht kovalent verknüpft worden sind. Somit muss davon ausgegangen werden, dass ein Teil der in Lösung vorhandenen Dimere in der denaturierenden SDS-PAGE dissoziiert sind und somit als Monomere detek-

tiert werden. Beide Banden der Quervernetzungsreaktion wurden jeweils aus dem Gel ausgeschnitten, entfärbt und noch in der Gelmatrix einer Proteolyse mit Trypsin (12-16 h bei 37°C) unterzogen. Nach Elution, der durch diesen proteolytischen Schritt generierten Peptidfragmente, konnten diese in einer ESI-LC-MS-Kopplung untersucht werden. Die gemessenen Spektren des EDC-behandelten Monomers und Dimers sind in Abbildung 3.6 A)+B) gezeigt.

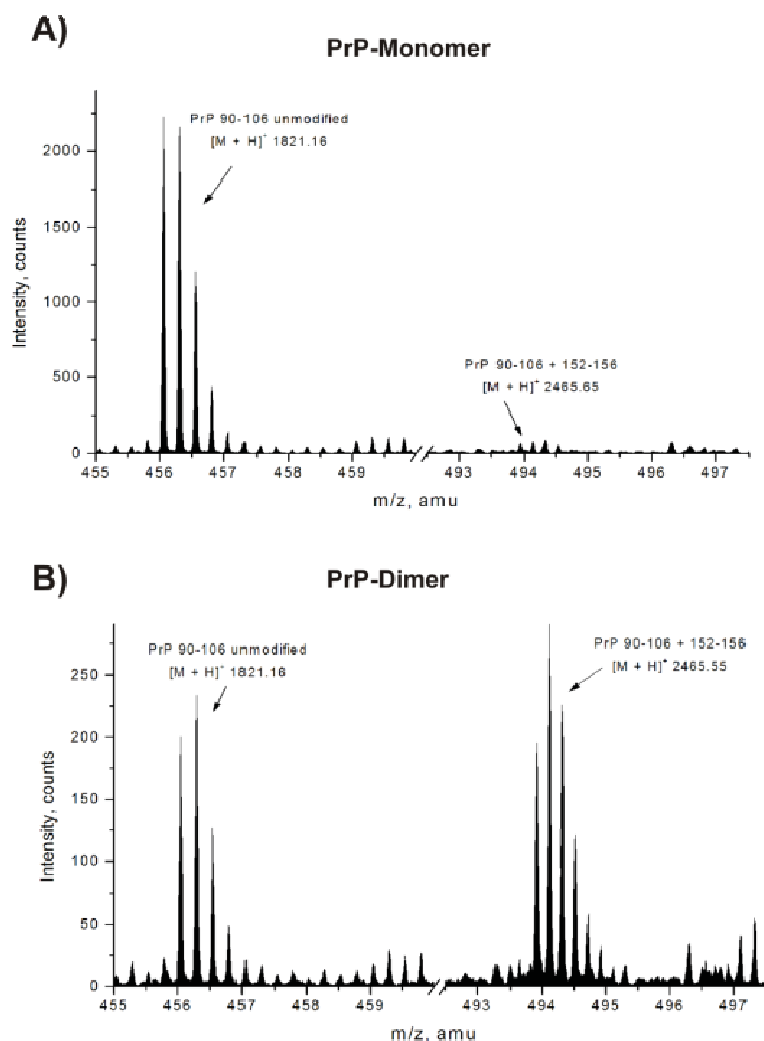


Abb. 3.6: ESI-LC-MS-Übersichtsspektren

Nach Gelelution und anschließender Proteolyse durch Trypsin wurden die „Banden“ des A) Monomers und B) Dimers der mit EDC behandelten Proben massenspektrometrisch untersucht (vgl. Abb. 3.5/„+EDC“).

Aufgrund der spezifischen Erkennungssequenzen für einen proteolytischen Schnitt durch Trypsin, können nur diskrete PrP-Fragmente entstehen, die daher schon theoretisch vorhersagbar sind. Jedes Fragment, welches nicht von der theoretisch vorhergesagten Masse abweicht, kann als durch den Crosslinker unmodifiziert angesehen

hen werden. Diese Fragmente waren demnach auch nicht an der Ausbildung der Kontaktstelle des Dimers beteiligt bzw. beinhalteten nicht die spezifischen Aminosäuren (Salzbrücken) für diese Reaktion. Abb. 3.6 stellt nur die für die Kontaktstellenanalyse relevanten Abschnitte des Spektrums dar. Die Auftrennung und darauf folgende Sequenzierung der detektierten Peptidfragmente mittels der Tandem-Massenspektrometrie (ESI-MS/MS-Kopplung) wurde durch die vorherige Etablierung dieses Analyseverfahrens für ein anderes Dimer (Kaimann, 2006; Kaimann *et al.*, zur Publikation eingereicht) erheblich erleichtert. Die aus der tryptischen Behandlung von Monomer- und Dimerbande erhaltenen Peptidspektren zeigen deutliche Unterschiede. In den Proben des Monomers konnten nur sehr geringe Mengen (Intensitäten) eines kovalent verbundenen Peptids detektiert werden. Dies spricht für einen sehr geringen Anteil bzw. nur kurzlebige **intramolekulare** Kontaktstellen innerhalb der monomeren PrP-Einheit des amyloid ausbildenden Gleichgewichts. Im Gegensatz dazu wurde in der Dimer Probe eine sehr klare Kontaktstelle zwischen 2 Peptidsequenzen gefunden. Diese **intermolekulare** Kontaktstelle besteht zwischen dem N-terminalen Sequenzabschnitt der Aminosäuren 90-106 und dem Abschnitt 152-156. Da sie nur in den Präparationen der dimeren SDS-PAGE-Bande gefunden wurde, ist sie spezifisch für das hier detektierte Dimer.

Daraus lässt sich folgern, dass in der monomeren Einheit innerhalb des Gleichgewichts keine intramolekularen Kontaktstellen entstehen oder, falls doch, diese nur sehr kurzlebig sind. Im Dimer hingegen lässt sich eine klare Kontaktstelle erkennen, die zwischen dem N-Terminus (Fragment 90-106) des PrPs und dem mittleren Sequenzabschnitt (Fragment 152-156) des rekombinanten PrPs zu finden ist.

3.1.5 Nachweis amyloider Fibrillen durch Thioflavin T- Bindung

Neben der elektronenmikroskopischen Analyse können Fibrillen mit Hilfe der Thioflavin T (ThT) Bindung auf ihren amyloiden Charakter hin untersucht werden. Wie unter Kap. 2.17 detailliert erläutert, kann der Farbstoff Thioflavin T amyloide von nicht-amyloiden Strukturen unterscheiden. Die durch Thioflavin T angefärbten Fibrillen zeigen bei einer Anregungswellenlänge von 455 nm die typischen Fluoreszenzeigenschaften von amyloiden Aggregaten.

Für den Amyloid-Nachweis wird ein Teil der zu untersuchenden Probe mit Thioflavin T versetzt. Unabhängig von der Proteinkonzentration im eigentlichen Konversionsansatz wird in der anschließenden Messung eine Gesamt-konzentration des PrPs von 10 ng/ μ l und einer Thioflavin T-Konzentration von 5 μ M eingestellt. Bei einer festen Excitationswellenlänge von 445 nm wird dann ein Fluoreszenz-Emissionsspektrum aufgenommen. Um die Fluoreszenzsignale der Amyloidsignale und Hintergrund in Relation setzen zu können wurde auch eine nicht fibrilläre Proteinkontrolle gleicher Konzentration untersucht. Als geeignete Kontrolle diente recPrP(90-231) bei 0,06 % SDS/250 mM NaCl, welches parallel für 5 Wochen inkubiert wurde, da unter diesen Bedingungen keine amyloiden Strukturen gebildet werden.

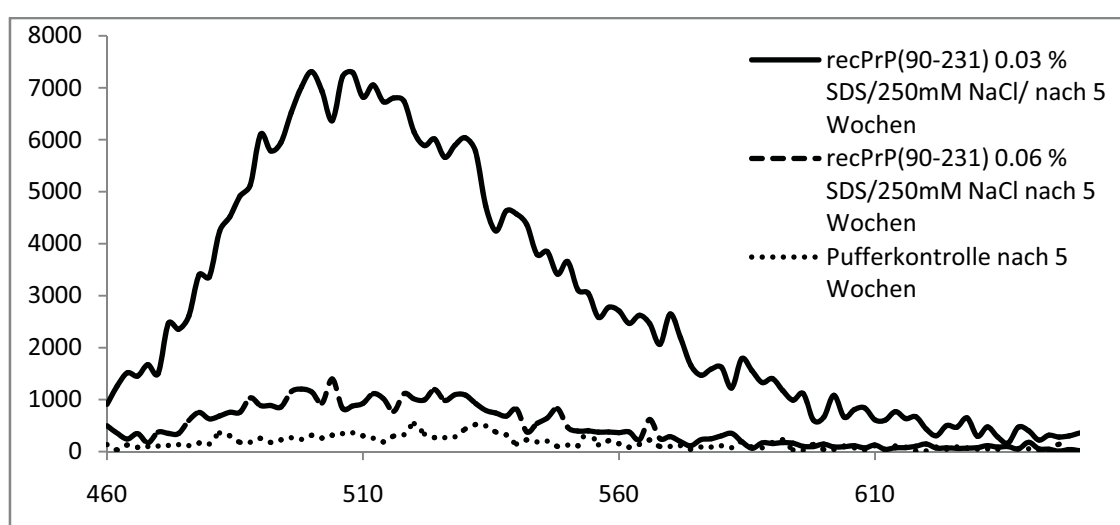


Abb. 3.7: Thioflavin T Fluoreszenz-Emissionsspektren

Bei Zugabe von 5 μ M ThT zu amyloiden Fibrillen bei 0,03 % SDS/250 mM NaCl (150 ng/ μ l nach 5 Wochen) (durchgezogene Linie); Proteinkontrolle bei 0,06 % SDS/250 mM NaCl (150 ng/ μ l nach 5 Wochen) (unterbrochene Linie) und Puffer (gepunktete Linie), dargestellt in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) als Funktion der Wellenlänge.

Die fibrilläre Ultrastruktur der Probe unter 0,03 % SDS ist in Abb. 3.8 parallel zu dem ThT-Test elektronenmikroskopisch nachgewiesen worden. Die detektierte Fluoreszenz wird in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) als Funktion der Wellenlänge dargestellt (Abb. 3.7). Die durch Thioflavin T angefärbten PrP-Fibrillen des Konversionsansatzes (0,03 % SDS/250 mM NaCl, 150 ng/ μ l recPrP(90-231), nach 5 wöchiger Inkubation) zeigen bei einer Anregungswellenlänge von 455 nm die typischen Fluoreszenzeigenschaften von amyloiden Aggregaten. Sie setzten sich, bei gleicher Konzentration, mit einem 6-8fach höheren Fluoreszenzsignal von nicht amyloiden Proteinkontrollen innerhalb dieses Testes deutlich ab. Aufgrund dieser Eigenschaft können die entstandenen Fibrillen eindeutig als amyloide Fibrillen charakterisiert werden.

Darüber hinaus kann der hier gewählte Ansatz klar zwischen fibrillären und nicht fibrillären Proben diskriminieren. Die Proben wurden weiterhin auf ihre Ultrastruktur mit Hilfe der Elektronenmikroskopie charakterisiert (Abb. 3.8).

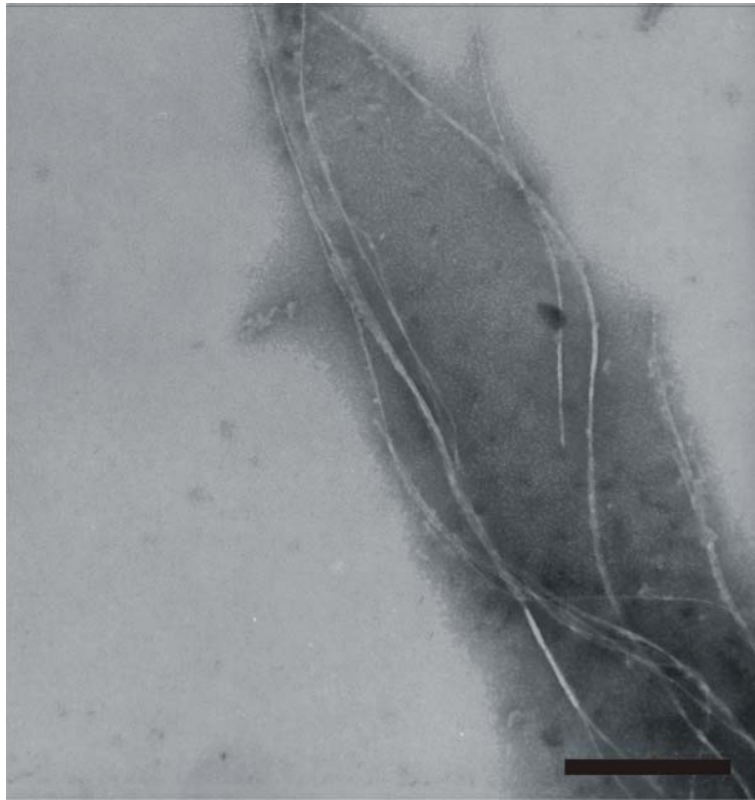


Abb. 3.8: Elektronenmikroskopische Aufnahme amyloider Fibrillen

Nach der ThT-Analyse wurde ein Aliquot aus der vorher mittels ThT-Fluoreszenz analysierten Probe elektronenmikroskopisch untersucht (Abb. 3.7 durchgezogenes Spektrum; Balken=0.5 μm).

3.1.6 Beschleunigung der Fibrillogenese durch Konzentrations- erhöhung

Das zuvor in dieser Arbeit analysierte Konversionssystem generiert amyloide Fibrillen nach einer Inkubationszeit von mindestens 5 Wochen. Eine der Fragestellungen dieser Arbeit war, ob diese lange Inkubationszeit durch weitere Modifikation des Systems beschleunigt werden kann. Da die zuvor verwendeten Pufferbedingungen (0,03 % SDS/ 10 mM HEPES/ 250 mM NaCl) Fibrillen generierten, wurde zunächst die recPrP Konzentration von vorher maximal 40-150 ng/ μl (vgl. Abschnitt 3.1.1/5) auf 300 ng/ μl erhöht und elektronenmikroskopisch analysiert (Abb. 3.9).

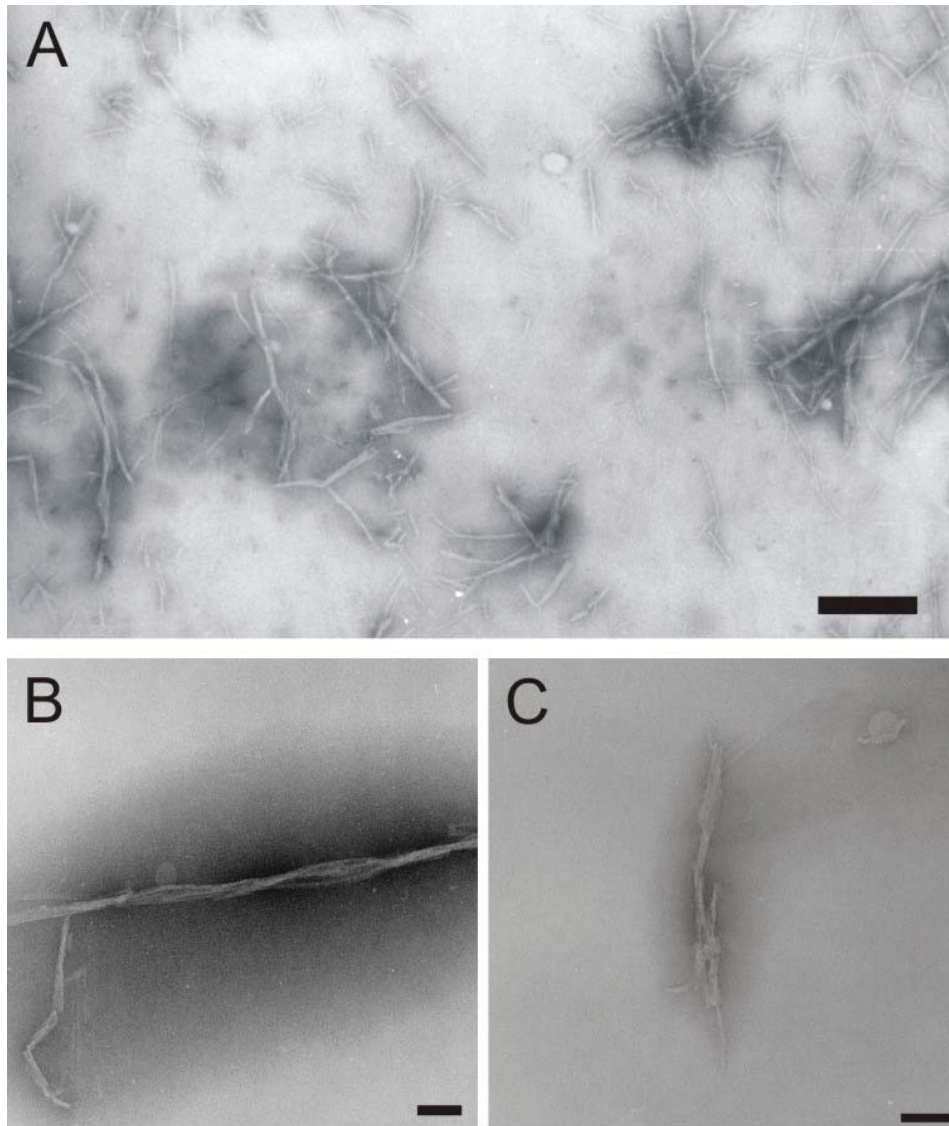


Abb. 3.9: Amyloide Strukturen nach einer Inkubation von 7 Tagen

300 ng/ μ l recPrP(90-231) wurden bei 0,03 % SDS; 10 mM HEPES (pH 7.2); 250 mM NaCl für 7 Tage bei 37°C inkubiert und anschließend analysiert; A): Übersichtsaufnahme (Balken = 0,5 μ m), B+C): Detailaufnahme typischer fibrillärer Strukturen (Balken = 100nm).

In Ansätzen mit diesen hohen PrP-Konzentrationen bildeten sich nun schon nach 7-tägiger Inkubation bei 37°C (650 rpm) amyloide Fibrillen aus, wie elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen (Abb. 3.9). Die Mehrzahl dieser Aggregate besteht aus amyloiden Fibrillen, welche vergleichbare Ultrastrukturen zu den vorher gezeigten Ansätzen aufweisen (Abb. 3.1/8).

Durch die Konzentrationserhöhung des PrPs auf 300 ng/ μ l konnte die Fibrillogenese von mindestens 5 Wochen auf 7 Tage verkürzt werden.

3.1.7 Partielle Resistenz gegenüber der Proteolyse durch Proteinase K

Eine der bekanntesten Eigenschaften von PrP^{Sc} ist die Ausbildung einer partiellen Resistenz gegenüber der Degradation durch die Proteinase K (PK) (vgl. Kap. 1.4.3). Spezifisch für die Resistenz ist, dass nur ein 67 Aminosäuren umfassender Teil des N-terminalen Abschnittes des PrP^{Sc}s abgebaut wird und der verbleibende Anteil als sogenanntes PrP27-30 intakt und weiterhin infektiös bleibt. Das hier beschriebene Konversionssystem basiert auf der Verwendung von rekombinanten PrP(90-231), welches dem PK-resistenten Sequenzabschnitt von PrP27-30 entspricht. Unter der Annahme, dass die entstandenen Aggregate die PrP^{Sc}-Struktur besitzen wäre davon auszugehen, dass die Aggregate nach Behandlung mit Proteinase K ungekürzt aus dieser Reaktion hervorgehen. Um dies zu überprüfen wurden die im Konversionssystem generierten Fibrillen auf ihre Beständigkeit gegenüber der Proteolyse mit Proteinase K hin untersucht.

Für den proteolytischen Assay wurden jeweils 3 µg der PrP-Aggregate auf Pufferbedingungen (50 mM Tris HCl pH 8.0; 100 mM NaCl; 2,5 mM EDTA) eingestellt, unter denen die Proteinase K sehr effizient Proteine lysieren kann (Post 1998). Als weit verbreiteter Standard für die Proteolyse von PrP^{Sc} existiert nur die Präparationsbedingung von PrP27-30 aus Hirnhomogenaten (McKinley *et al.*, 1991). Für den hier vorliegenden Ansatz wurden Bedingungen gewählt (bezogen auf das PK zu PrP-Verhältnis), die in der Literatur (Bocharova *et al.*, 2005) für Untersuchungen von PK-Resistenz in *in vitro*-Experimenten verwendet wurden. Die gewählten Verhältnisse von Proteinase K zum Prion-Protein (w/w; 1:20 und 1:50) stellen jedoch keinen standardisierten Ansatz für den Test dar.

Zur Charakterisierung der resistenten PrP-Fragmente musste ein Antikörper gewählt werden, der am absoluten C-terminalen Ende des Prion-Proteins bindet. Daher wurde der Antikörper R1 (Epitop: 225-231) verwendet, der gewährleistet, dass nur am N-Terminus verkürzte oder ungekürzte Fragmente detektiert werden können.

Die Verdauung wurde durch die Zugabe von Proteinase K initiiert und nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37°C mit der Zugabe von SDS-PAGE-Auftragspuffer und durch Erhitzen auf 95°C (für 10 min) gestoppt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 3.10 dargestellt.

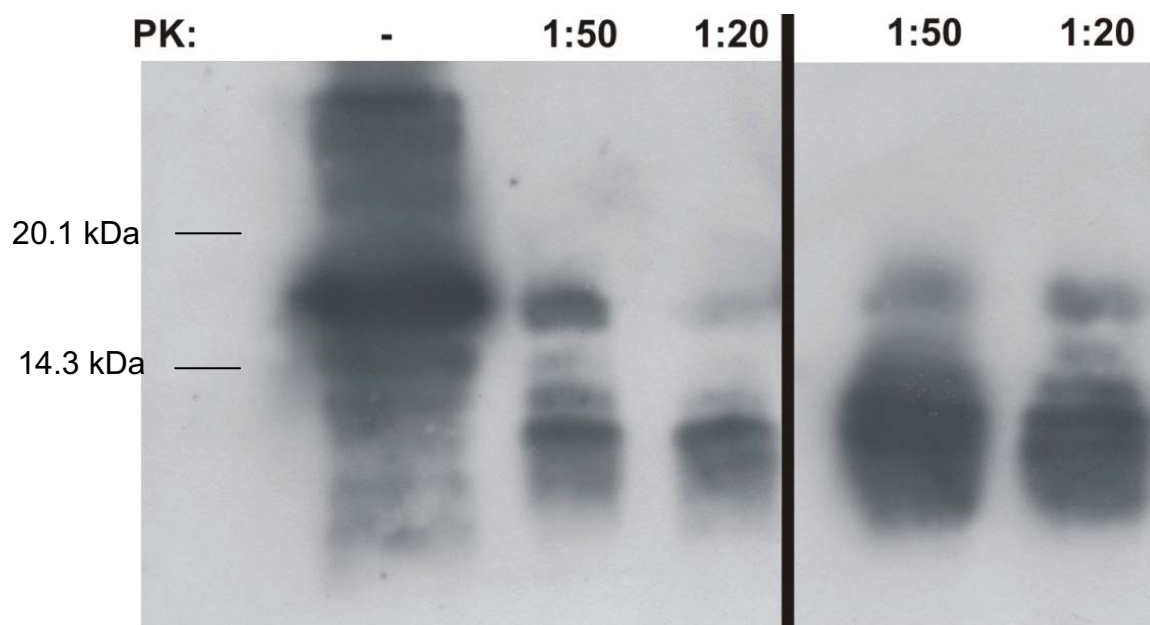


Abb. 3.10: A: Proteinase K-Analyse amyloider Aggregate

Die amyloide Probe wurde für 1h bei 37°C unter verschiedenen Pk-PrP Verhältnissen (PK:PrP 1:20/1:50[w/w] und ohne PK (-)) inkubiert und mit SDS-PAGE und Western Blot (Erstantikörper R1) analysiert, I und II zeigen zwei unabhängige Ansätze

Unter den gewählten Bedingungen konnte wie in Abb. 3.10 eine partielle PK-Resistenz der amyloiden Proben nachgewiesen werden. Unter vergleichbaren Bedingungen können bei α -helikalem Ausgangsmaterial des recPrP(90-231) bei beiden verwendeten PK:PrP-Verhältnissen keine PK-resistenten Fragmente nachgewiesen werden (s. Abb. 3.11).

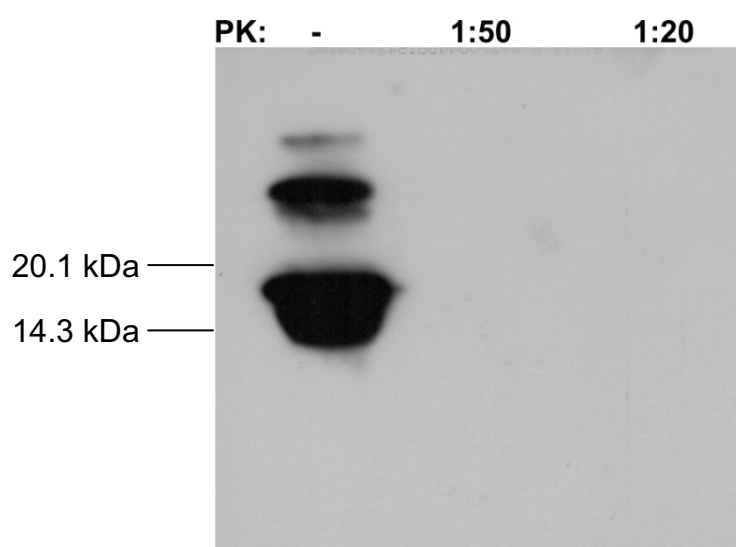


Abb. 3.11: Proteinase K-Analyse des α -helikalen Ausgangsmaterials

Western Blot Analyse des recPrP(90-231) vor der Konversion zu amyloiden Fibrillen mit (PK:PrP 1:20/1:50[w/w]) und ohne Zugabe von Proteinase K (-) nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37°C.

Ein geringer Teil des amyloiden Ausgangsmaterials bleibt unverdaut (Banden bei 16 kDa), darüber hinaus entsteht in den Proben, die fibrilläre Proteinaggregate enthielten (Abb. 3.10), bei beiden gewählten PK-Konzentrationen auch eine Vielzahl von kleineren Fragmenten unterhalb der Bande des unverdauten Materials. Diese Banden liegen in einem Molekulargewichtsbereich von ca. 10-14 kDa. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die hier generierte PK-Resistenz offenbar nicht wie im Fall von natürlichem PrP^{Sc} relativ einheitlich ist, sondern die Aggregate aufgrund der Konversion zu fibrillären Strukturen durch viele unterschiedlich resistente Strukturen geprägt werden.

3.1.8 Einfluss amyloider Keime auf die Konversion von recPrP(90-231)

In den vorher charakterisierten Ansätzen wurde die spontane Konversion von recPrP(90-231) zu Fibrillen untersucht. Wie beschrieben verläuft sie in den Ansätzen mit einer Proteinkonzentration von 80 ng/μl innerhalb von mehreren Wochen. Abgeleitet von dem Modell einer Prion-Infektion sollte die Zugabe eines amyloiden „Keims“ die Inkubationszeit bis zur Ausbildung amyloider Aggregate deutlich verkürzen können.

Für diese kinetische Messung der keiminduzierten Fibrillogenese wurden Ansätze von 80 ng/μl recPrP bei 0,03 % SDS und 250 mM NaCl mit oder ohne Zugabe von amyloiden Fibrillen (s. Kapitel 3.1.6) analysiert. Um die Bildung der Fibrillen verfolgen zu können, wurde dieser Ansatz mit 5 μM Thioflavin T versetzt, was nach Literaturangaben die Fibrillenbildung nicht behindert (Baskakov *et al.*, 2004). Der Prozess konnte bei 37°C über 20h mittels ThT-Assay (Abb. 3.12) beobachtet werden.

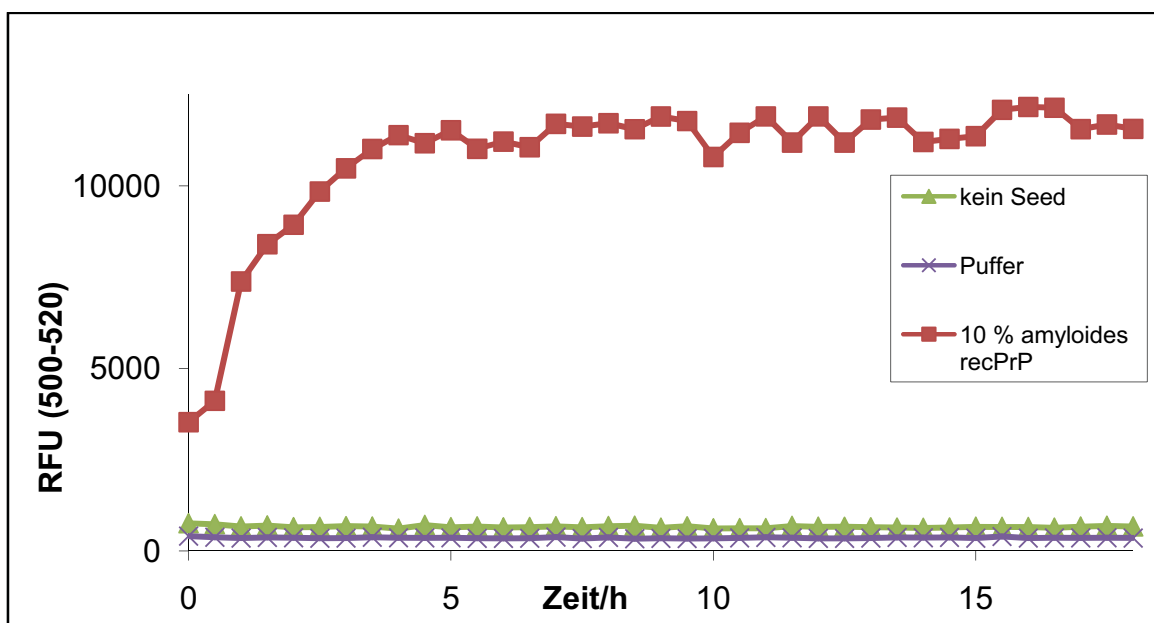


Abb. 3.12: Kinetik der Fibrillogenese nach Zugabe eines amyloiden Keims

Jeweils 10 % (1,2 µg amyloide Aggregate in 4 µl Gesamtvolumen) wurden zur Lösung von 80 ng/µl (Gesamtvolumen: 150µl) recPrP90-231 in 0,03 % SDS/250 mM NaCl/10 mM HEPES pH 7.2 zugegeben. Als Kontrolle dienten der identische Ansatz ohne Zugabe eines Keims (aufgetragen als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU) gegen die Zeit(h); RFU wurden im Bereich von 500-520 nm aufgenommen und der Mittelwert gebildet).

In die Ansätze wurde je 1,2 µg des Prion-Proteins aus den vorher charakterisierten Ansätzen (3.1.6) gegeben, was 10 % der Menge des Gesamtproteins im Ansatz entspricht.

In diesem Ansatz wurde nach 0,5 h der erste Anstieg des Fluoreszenzsignals detektiert, der sich dann weiter fortsetzte. Nach ca. 5 h kam es zu keiner weiteren Veränderung des Fluoreszenzsignals. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass zu diesem Zeitpunkt die keiminduzierte Fibrillenbildung schon abgeschlossen war. Am Ende der Inkubationsphase zur keiminduzierten Fibrillenbildung wurde dem Ansatz ein Aliquot entnommen und im Elektronenmikroskop auf Fibrillen hin untersucht (Abb. 3.13). Neben eindeutigen fibrillären Strukturen sind in den Ansätzen auch einige kleinere amorphe Aggregate zu detektieren. Die in dieser Abbildung gezeigten fibrillären Strukturen und kleineren amorphen Aggregate unterscheiden sich nicht wesentlich von den vorher gezeigten fibrillären Strukturen der spontanen Konversionsansätze. Neben dem Nachweis der Fibrillenbildung mittels ThT zeigen diese Aufnahmen nochmals eindeutig die entstandenen amyloiden Fibrillen. Damit konnte ein-

deutig eine Beschleunigung der Fibrillogenese von 5 Wochen auf ca. 5 Stunden durch Zugabe eines Keims induziert werden.

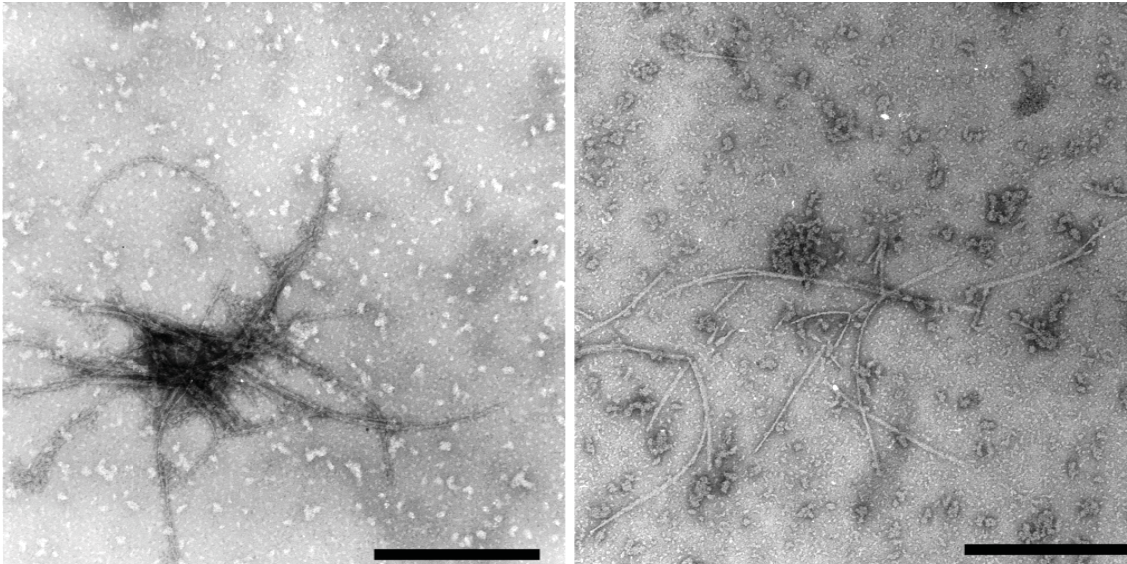


Abb. 3.13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der keiminduzierten Fibrillenbildung

Nach erfolgreicher keiminduzierter Fibrillenbildung wurden ein Aliquot der entstandenen Aggregate aus dem mit Thioflavin T versetzten Ansatzes mittels EM untersucht (Balken= 500nm)

3.2 Konversion von PrP^{C} aus CHO-Zellen ($\text{CHO-PrP}^{\text{C}}$)

Im Gegensatz zu dem in den vorherigen Kapiteln gezeigten rekombinanten PrP (90-231) beinhaltet die Peptidsequenz des $\text{CHO-PrP}^{\text{C}}$ s die natürliche Vollständigensequenz des syrischen Hamsters (Aminosäuren 23-231). Da das nun untersuchte PrP in eukaryotischen CHO-Zellen exprimiert wird, trägt es einen GPI-Membrananker und zwei Glykosylierungen als natürliche posttranslationale Modifikationen. Nur die genaue Zusammensetzung und der Verzweigungsgrad der Glykosylierung des $\text{CHO-PrP}^{\text{C}}$ s unterscheidet sich geringfügig von der des natürlichen PrP^{C} s (Blochberger *et al.*, 1997).

In einer früheren Arbeit konnte in dem hier analysierten Konversionssystem natürliches, aus dem Hirnmaterial gesunder Hamster präpariertes PrP^{C} , in amyloide Fibrillen überführt werden (Leffers *et al.*, 2005). Da dieses Material aufgrund seiner natürlichen Herkunft sehr aufwendig zu präparieren ist (Pan *et al.*, 1992), sollte dieses System auf posttranslational modifiziertes PrP^{C} aus einer überexprimierenden CHO-

Zellkultur (Blochberger *et al.*, 1997; Elfrink *et al.*, 2007) angepasst werden. Aufgrund des eukaryotischen Expressionssystem ist dieses Material, das aus *in vitro* Zellkulturen aufgereinigt werden kann, eine gute Alternative zum natürlichen Prion-Protein aus Gehirnen nicht-infizierter Hamster.

3.2.2 Löslichkeitsanalyse von PrP^C nach 7 wöchiger Inkubation

Ansatzpunkt für die Konversion von CHO-PrP^C zu fibrillären Strukturen waren die Ergebnisse von Leffers *et al.* (2005) unter Verwendung von natürlichem PrP^C präpariert aus Hirnen gesunder Hamster. In dieser Arbeit konvertierte PrP^C bei einer SDS-Konzentration von 0,01 % SDS und 250 mM NaCl innerhalb von 5 Wochen zu fibrillären Strukturen. Da das CHO-PrP^C bis auf eine veränderte Glykolysierung die gleiche Primärstruktur sowie einen GPI-Membrananker hat, wurden diese Bedingungen als Erstes getestet. Desweiteren wurde eine geringfügige Abstufung der SDS-Konzentration (0,0075 % SDS) vorgenommen. Dies resultierte aus der Annahme, dass die Hyperglykosylierung von CHO-PrP^C (gegenüber nativen PrP^C) zu einer generell, gesteigerten Löslichkeit führt.

Unter den Bedingungen (0,01 % bzw. 0,0075 % SDS/250 mM NaCl) wurde das CHO-PrP^C für 7 Wochen bei 37°C (und 650 rpm) inkubiert. Die längere Inkubationszeit von 7 Wochen wurde gewählt, da in den Ansätzen maximal eine Proteinkonzentration von 30 ng/μl erreicht werden konnte, man aber stets sicherstellen wollte, dass die Fibrillenbildung stattfindet. Nach einem 100.000g Zentrifugation für 1 h wurden Pellet und Überstand getrennt und mittels SDS-PAGE und nachfolgendem Western-Blot auf ihren Löslichkeitszustand hin überprüft. Die Löslichkeitsverteilung der beiden Proben ist in Abbildung 3.14 dargestellt.

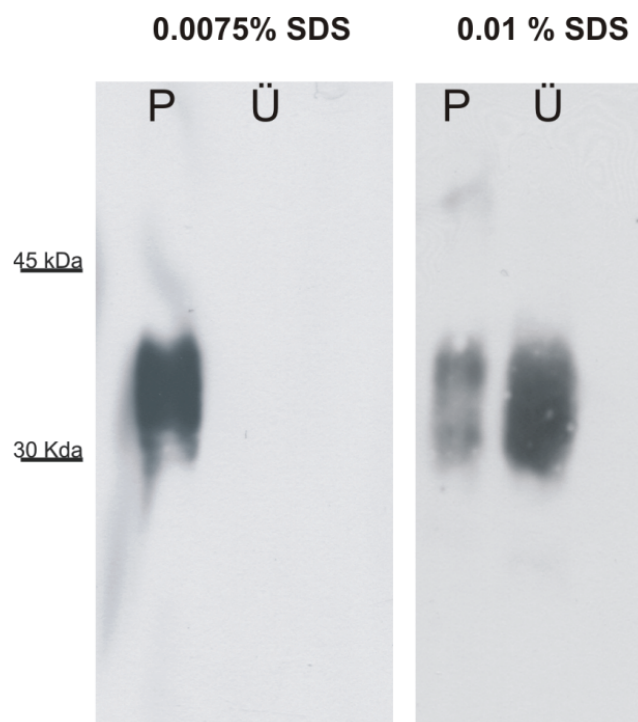


Abb. 3.14: Löslichkeitsanalyse von CHO-PrP^C nach einer Inkubationszeit von 7 Wochen

Variiert wurde nur die SDS-Konzentration in 10 mM HEPES (pH 7.2), 250 mM NaCl (Ü= Überstand/P=Pelletfraktion nach Löslichkeitsanalyse mittels 100.000g Zentrifugation für 1 h mit anschließender SDS-PAGE und Western-Blot).

Bei einer SDS-Konzentration von 0,01 % SDS war das CHO-PrP^C noch zum größten Teil löslich, wohingegen bei einer SDS-Konzentration von 0,0075 % SDS das Protein vollständig aggregierte (Abb. 3.14).

Beide Pelletfraktionen der in Abbildung 3.14 gezeigten Experimente wurden elektronenmikroskopisch untersucht (Kap. 3.2.3).

3.2.3 Elektronenmikroskopische Analyse der PrP^C-Aggregate

Unter den vorher beschriebenen Bedingungen wurden jeweils die unlöslichen Anteile des PrP^Cs auf ihre Aggregatstrukturen hin im Elektronenmikroskop untersucht (Abb. 3.15). Durch die immer noch hohe Löslichkeit des Proteins bei 0,01 % SDS/ 250 mM NaCl/ 10 mM HEPES (pH 7.2) wurden nur einige vereinzelte Aggregate gefunden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der höheren Ausbeute an fibrillären Aggregaten wurde nur die SDS-Konzentration von 0,0075 % SDS weiter verfolgt. Bei dieser SDS-

Konzentration fanden sich nach 7 wöchiger Inkubation viele kurze fibrilläre Strukturen (Abb. 3.15).

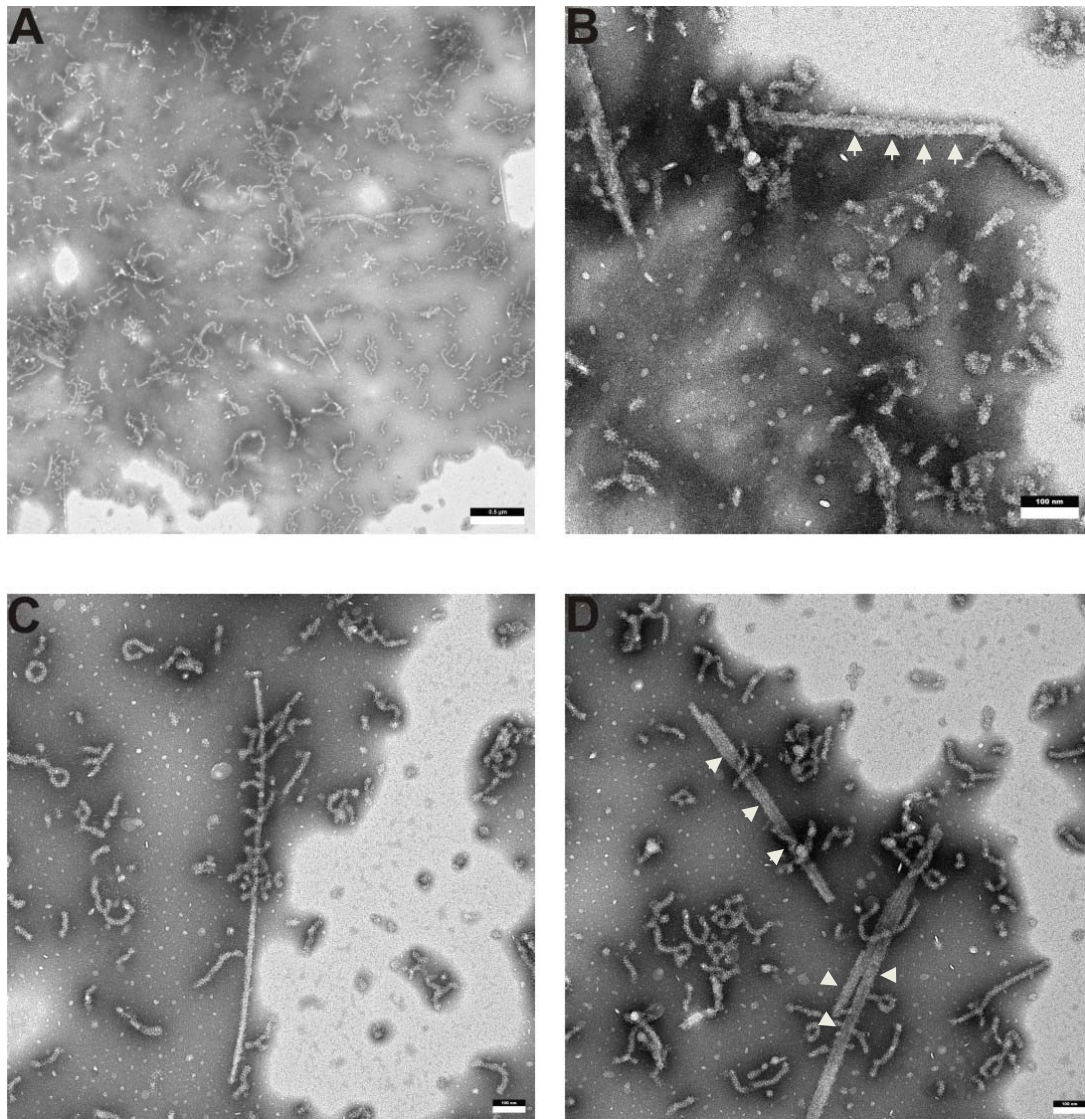


Abb. 3.15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von CHO-PrP-Fibrillen

30 ng/µl CHO-PrP^C bei einer SDS-Konzentration von 0,0075 % SDS/ 250 mM NaCl/10 mM HEPES (pH 7.2) nach einer Inkubationszeit von 7 Wochen (Balken A:0.5 µm; B-D: 100 nm; Pfeile: s. Text)

Der Vergleich der PrP^C-Aggregate mit den recPrP-Aggregaten (s. Kap. 3.1.1/5/6) macht schnell deutlich, dass es sich bei dem Hauptteil der hier vorliegenden Strukturen um eine andere, als „fuzzy“ (kurze, unscharfe bzw. rauhe) bezeichnete ultrastrukturelle Form von Fibrillen handelt (Schlumpberger *et al.*, 2000; vgl. Kapitel 4.3.1).

Weitergehende Betrachtungen der PrP^C-Aggregate zeigten, dass in diesen Ansätzen mindestens drei verschiedene fibrilläre Spezies zu finden sind. Die am häufigsten vorkommenden Strukturen sind fuzzy-Fibrillen. Sie überschreiten selten eine Länge

von 500 nm (Abb. 3.15) und erscheinen wegen ihrer etwas unscharfen Abgrenzung ein wenig breiter als die vorher gezeigten rekombinanten Fibrillen. Ähnliche, d.h. vom normalen Erscheinungsbild leicht abweichende Fibrillen sind schon in der Literatur beschrieben. Somit stellt diese Arbeit nicht die erste Beschreibung der unscharf erscheinenden fibrillären Ultrastruktur dar. Ähnliche Fasern wurden auch in Konversionsansätzen eines Proteins aus *S. cerevisiae* gefunden, welches Prion-Charakteristika aufweist (Schlumpberger *et al.*, 2000).

Die zweite im Rahmen dieser Arbeit gefunden Ultrastruktur ist eine aus diesen „fuzzy-fibres“ hervorgehende Struktur. In Abb. 3.15 B-D erscheint es so, als ob sich die kleinen gebeugten Fasern zu längeren und gleichzeitig auch breiteren Strukturen zusammenlagern. Diese 1-2 μm langen Strukturen liegen dann nicht mehr in flexibler, gebeugter Form vor, sondern wirken gerade und starr (markiert durch weiße Pfeile in Abb. 3.15).

Die dritte und dabei auch seltenste Ultrastruktur ist die glatte Faser. In Abb. 3.16 A und B sind die fuzzy-Fibrillen und mehrere glatte Fasern im Verbund zu sehen (markiert durch schwarze Pfeile in Abbildung 3.16). Konnte man die vorher charakterisierten Strukturen noch aufgrund ihres Erscheinungsbildes auf ein und die gleiche Substruktur zurückführen, so ist die Form der Fasern in den Ansätzen nicht mehr mit der Hauptmasse der gefundenen Aggregate zu vergleichen. Dieses Erscheinungsbild ist eher mit den rekombinanten Ultrastrukturen aus Kapitel 3.1 zu vergleichen.

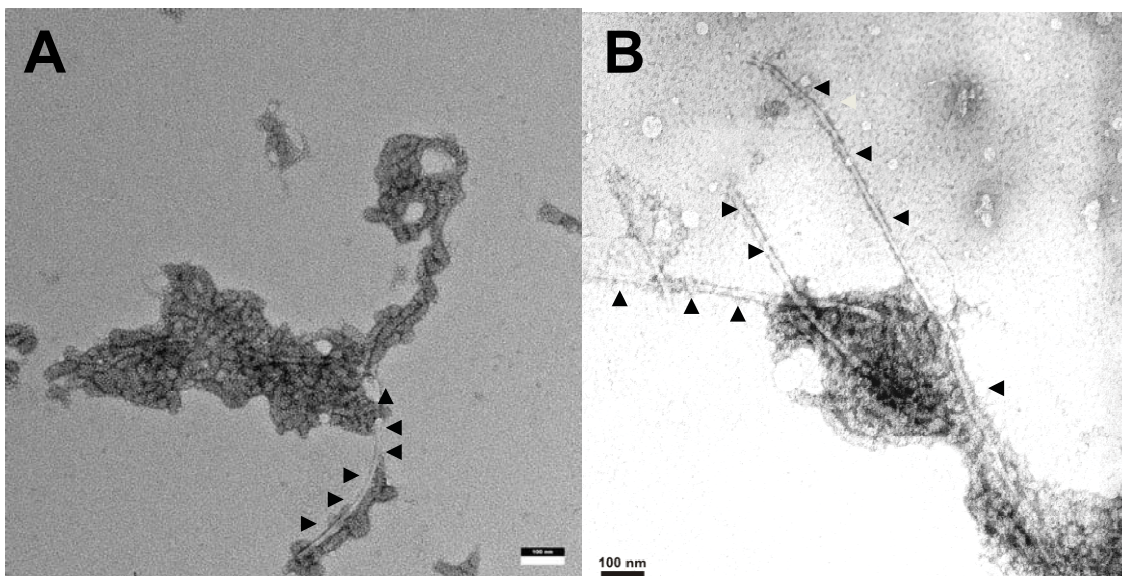


Abb. 3.16: „Alternative“ fibrilläre Strukturen des CHO-PrP

Assoziation der „glatten“- (durch schwarze Pfeile (A) markiert) und „fuzzy“- Form der CHO-PrP^C Fibrillen nach einer Inkubationszeit von 7 Wochen (30 ng/ μl CHO-PrP^C/10 mM HEPES pH 7,2/0.0075 % SDS/250 mM NaCl).

Untersucht man die CHO-PrP-Fibrillen im ThT-Assay kommt es zur Fluoreszenzerhöhung, gegenüber der Kontrolle (Abb. 3.17).

Damit bestätigt sich der schon aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen angenommene amyloide Charakter dieser Aggregate (s. Abb. 3.15/16).

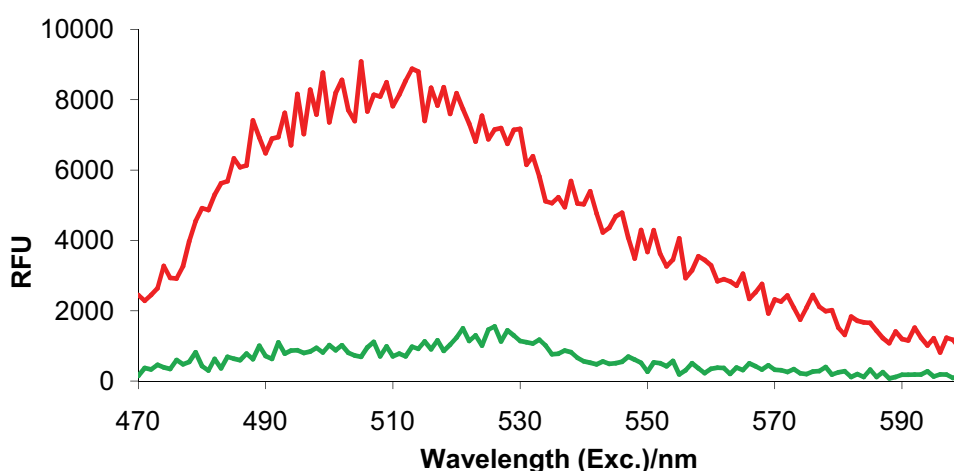


Abb. 3.17: Thioflavin T -Assay von CHO-PrP-Fibrillen

10 ng/ μ l CHO-PrP^C nach 7wöchiger Inkubation (30 ng/ μ l CHO-PrP^C/10 mM HEPES pH 7,2/0.0075 % SDS/250 mM NaCl) (rot) und Puffer-Kontrolle (grün) wurden mit 5 μ M ThT versetzt und ein Fluoreszenz-Emissions-Spektrum aufgenommen.

3.2.4 Immuno-Elektronenmikroskopische Analyse der CHO-PrP^C-Fibrillen

Um sicher zu stellen, dass an der Ausbildung der PrP^C-Fibrillen das vollständige Prion-Protein (Sequenz 23-231) beteiligt ist, wurden die Fibrillen einer Immunogold-Markierung unterzogen. Bei dieser Markierung wird kolloidales Gold an einen Tertiär-Antikörper gekoppelt. Dieser kann über ein System von PrP-spezifischen Erstantikörpern und Sekundärantikörpern an Prion-Proteine binden (s. Kap. 2.10.2 und Abb. 3.18/19).

Dazu wurde jeweils ein Antikörper verwendet, der an dem absoluten N- (EST123, Erkennungsepitop: 30-35) und C-Terminus (R2, Erkennungs-epitop: 225-231) des PrP^Cs bindet. Zeigen beide Antikörper ein eindeutiges Markierungsergebnis an den hier detektierten Fibrillen, so kann davon ausgegangen werden, dass diese Strukturen aus PrP^C aufgebaut sind.

Aufgrund der hohen Ordnungszahl des Goldes, wäre die Markierung auch ohne Negativ-Färbung als schwarzer Punkt im Elektronenmikroskop sichtbar. Da aber die proteinösen Strukturen zur Darstellung den Negativ-Kontrast brauchen, wurde die Färbung am Ende der Markierung (siehe auch Kapitel 2.10.2), wie auch in den vorherigen Aufnahmen, weiterhin durchgeführt. Wegen des geringen Durchmessers der Goldpartikel von 5 nm, sind in den folgenden Aufnahmen einige der Goldmarkierungen zur besseren Sichtbarkeit mit Pfeilen gekennzeichnet (siehe Abb. 3.18/19).

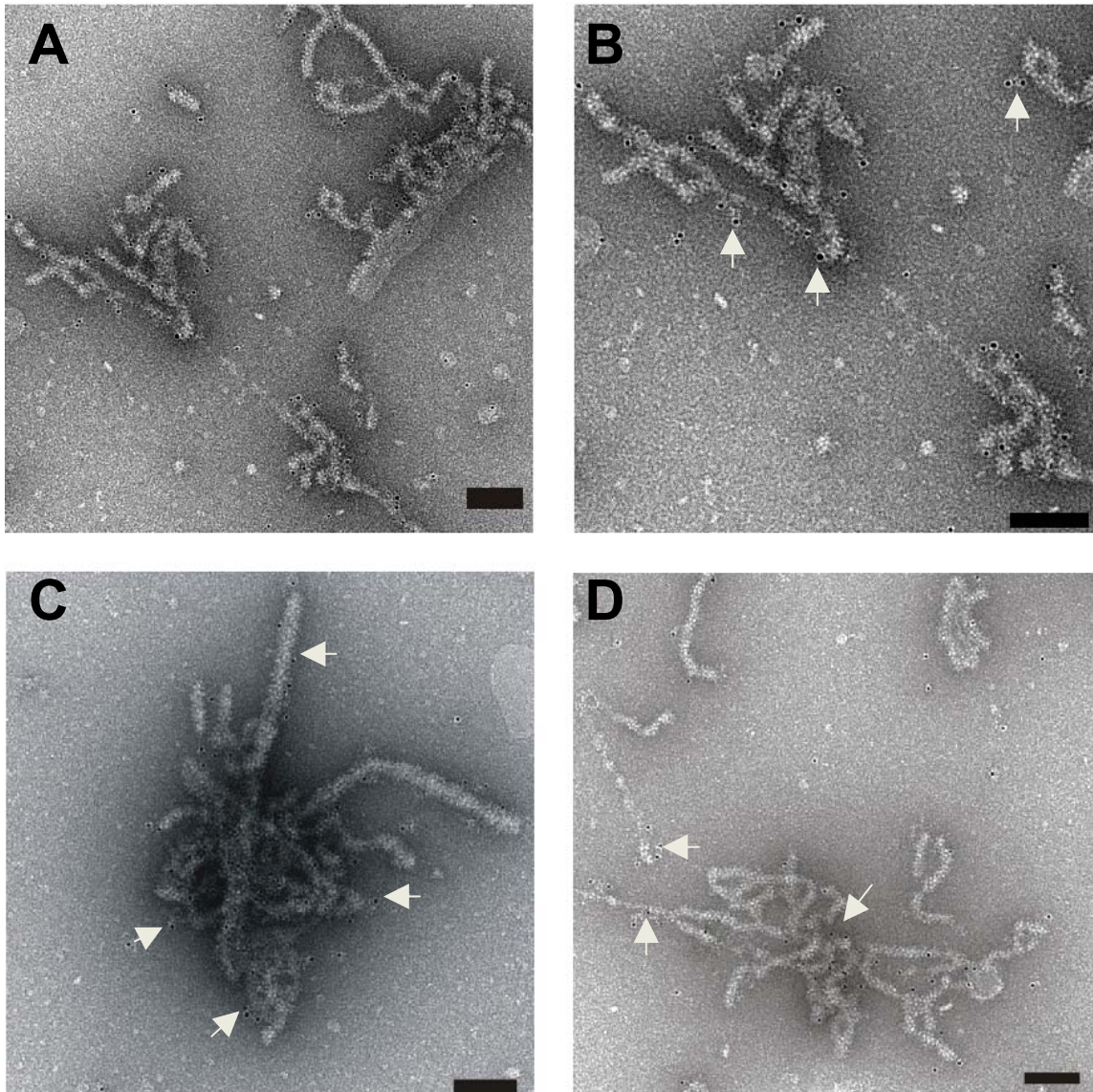


Abb. 3.18: Immunogold-Markierung der CHO-PrP-Fibrillen mit dem Antikörper R2 (Epitop: 225-231)

B ist ein vergrößerter Abschnitt aus A; C/D: verschiedene fibrilläre Aggregate mit Immunogold-Antikörpern markiert; (einige Goldpartikel sind in den Aufnahmen exemplarisch mit Pfeilen markiert, Balken= 100nm)

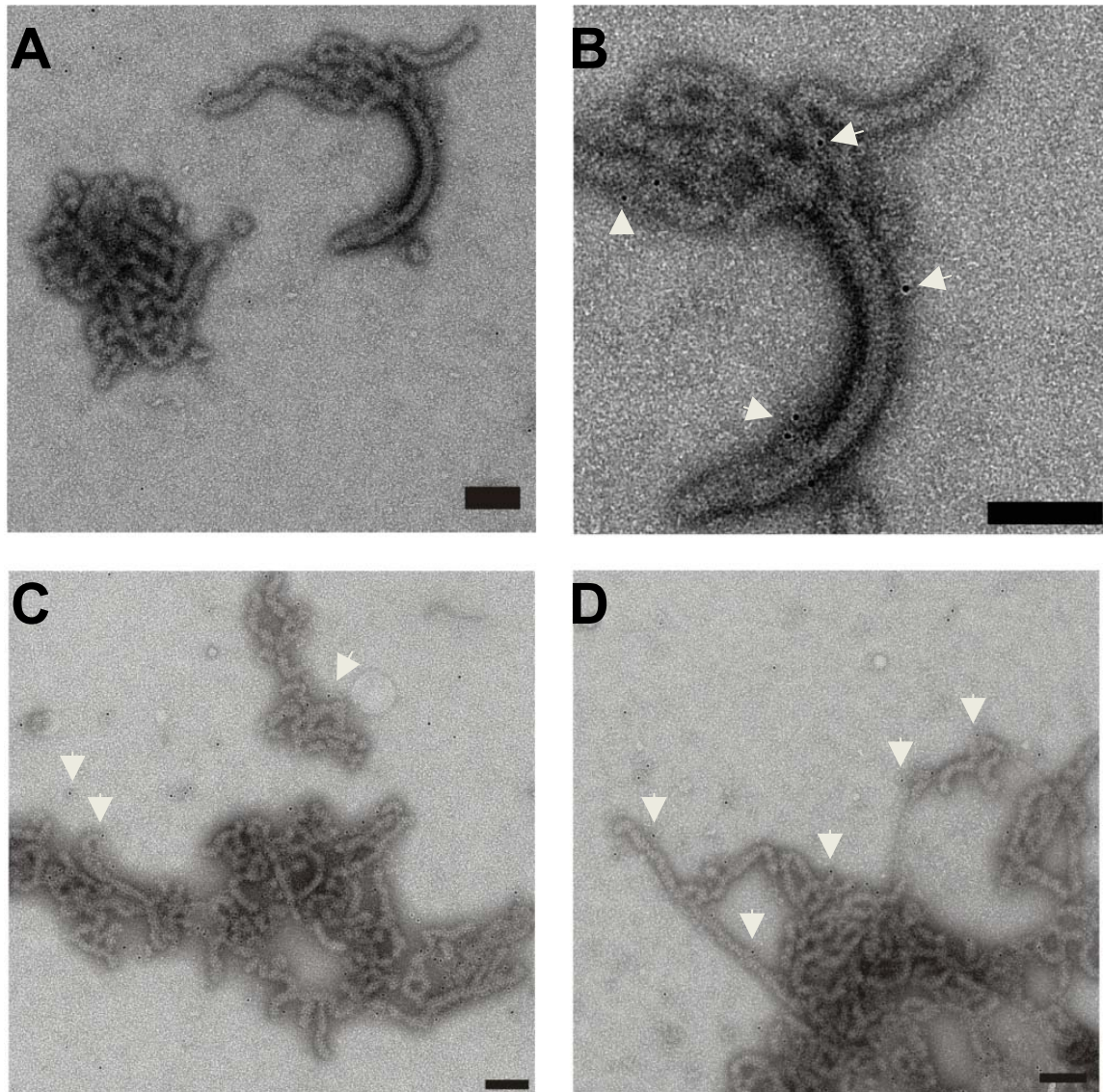


Abb. 3.19: Immunogold-Markierung der CHO-PrP-Fibrillen mit dem Antikörper EST123 (Epitop: 30-37)

Aufnahme B ist ein vergrößerter Ausschnitt aus Aufnahme A; Aufnahmen C/D zeigen verschiedene fibrilläre Aggregate mit Immunogold-Markierung (Pfeile markieren einige der Immunogold-Partikel, Balken=100nm).

In beiden Fällen ist es gelungen, die Immunogold-Markierung mit zwei PrP-spezifischen Antikörpern der Hauptstruktur („fuzzy fiber“) eindeutig zu zeigen. Die weitere Struktur, welche nur durch Anlagerung dieser Fasern zustande kommt, sollte daher auch aus PrP^C mit seiner vollständigen Sequenz bestehen.

Im Gegensatz zu den in Abschnitt 3.2.3 gezeigten Strukturen waren nach der Behandlung der Proben durch Immunogold-Markierung viel weniger der großen und glatteren Überstrukturen zu detektieren. Dies kann an der Behandlung der Netze mit den verschiedenen Schritten zur Markierung liegen. Daher sollen die beiden Färbe-

methoden in Bezug auf ihre mechanische Belastung gegenübergestellt werden. So kommt das Netz im Falle des einfachen Negativkontrasts nach der Adsorption der Probe noch weitere 30 sek.-1 Minute mit Flüssigkeiten in Kontakt. Im Gegensatz dazu ist die Beanspruchung des Netzes bei der Immunogold-Markierung um ein Vielfaches höher, da für diese Markierung das Netz für ca. 24h mit unterschiedlichen Lösungen (Primär-/Sekundär-/Tertiärantikörper, Blockierungs- und Waschschriffe) behandelt werden muss und mit einer einhergehenden mechanischen Belastung der Netzoberfläche bzw. der darauf adsorbierten Probe verbunden ist.

Außerdem kann die Behandlung mit hohen Konzentrationen des Antikörpers R2 die hier vorliegenden Strukturen zerstören, wie im Rahmen dieser Arbeit beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

3.2.5 Infektiositätstests mit CHO-PrP-Fibrillen

In einem weiteren Schritt dieser Arbeit zur Charakterisierung der generierten fibrillären Strukturen aus CHO-PrP^C sollten diese, in Analogie zu den vorherigen Experimenten (Leffers *et al.* 2005), auf ihre Infektiosität hin untersucht werden. Bis heute Zeit ist es noch nicht gelungen, ein mit dem Tiermodell vergleichbaren Zellkultur-Infektiositätstest für Hamster-Prionen zu entwickeln (Klohn *et al.*, 2003). Daher wurden diese Tests in einem genetisch veränderten Mausmodell durchgeführt. Die genetische Modifikation der verwendeten Mauslinie betrifft in erster Linie das exprimierte Prion-Protein und dessen Expressionslevel. Die in den Infektiositätstests verwendete TG7-Mauslinie exprimiert das Prion-Protein der Hamstersequenz (SHaPrP^C) auf einem PrP-Knockout-Hintergrund (Tg (SHaPrP^{+/+}) 7PrnP^{0/0}). Dieser stellt sicher, dass nur das SHaPrP^C exprimiert wird und es keine unerwünschte Expression des Maus-PrPs (MoPrP^C) existiert (s. Kap. 2.14.1). Zusätzlich zu dieser transgenen Veränderung wird das PrP^C 8fach, im Vergleich zum Expressionslevel von Wildtyp-Hamstern, überexprimiert. In vorangegangenen Experimenten lag die Inkubationszeit für natürliche Prionen, aufgereinigt aus den Gehirnen infizierter Hamster (PrP27-30), bei durchschnittlich 42 Tagen (Leffers *et al.*, 2005). Trotz der unterschiedlichen Organismen (Maus vs. Hamster) sind die Mäuse in der Lage Hamster Prionen zu replizieren und stellen damit einen mit Hamster vergleichbar infizierbaren Organismus dar. Für eine Testreihe standen jeweils 4 Tiere zur Verfügung.

Um eine Gesamtproteinmenge von ca. 12 µg (vergleichbare Menge an Protein zu Experimenten der Publikation von Legname *et al.* (2004) inokulieren zu können, musste ein vollständiger CHO-PrP^C-Konversionsansatz (30 ng/µl, 400µl Gesamtvolumen) intracerebral verabreicht werden. Für diese Art der Inokulation kann aber nur ein Volumen von 30 µl genutzt werden. Deshalb wurde der Ansatz nach erfolgreicher Konversion zu Fibrillen 1h bei 100.000g zentrifugiert und das resultierende Pellet in 30 µl sterilem 5 % BSA in PBS-Puffer aufgenommen. Alternativ zu diesem Ansatz wurde auch versucht, die fibrilläre Probe an Nitrozellulose Partikel zu binden. Dies wurde in Anlehnung an das Protokoll von Steinitz und Tamir (1995) durchgeführt. Die Nitrozellulose Partikel sollen in diesem Experiment die Proteine binden und diese damit nach der Inokulation im Gehirn zu immobilisieren. Eine Immobilisierung der Proteinaggregate soll gewährleisten, dass die fibrillären Strukturen vom Ort der Inokulation nicht ausgewaschen werden.

Dafür wurde das Pellet nach der 100.000g Zentrifugation in 25 µl Nitrozellulose-Partikel enthaltenen PBS-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Um die proteinbindenden Eigenschaften der Nitrozellulose zu erhalten wurde erst nach der Inkubation (1h bei Raumtemperatur) der Fibrillen und Nitrozellulose die Lösung mit 30 %iger BSA-Lösung auf 5 % BSA eingestellt. Da die Tierversuche immer noch andauern (voraussichtliches Ende der Experimente: Juli/2008) wird in Tabelle 3.2 der aktuelle Stand der Versuche präsentiert (nach 490 Tagen).

Tab. 3.2: Übersicht der Tierversuche mit fibrillärem CHO-PrP und den korrespondierenden Kontrollen

Inokulum	Stand der Tierversuche
12 µg amyloides CHO-PrP in 5 % BSA/PBS	keine erkrankten Tiere (0/4)
12 µg amyloides CHO-PrP gebunden an Nitrozellulose-Partikel in 5 % BSA/PBS	keine erkrankten Tiere (0/4)
12 µg α-helikales CHO-PrP ^C in 5 % PBS	keine erkrankten Tiere (0/4)
5 % BSA in PBS und Nitrozellulose	2 verstorbene Tiere (0/4, (2)), keine Prion-Krankheitssymptome
5 % BSA in PBS	1 erkranktes Tier (1/4)

4. Diskussion

Die von Stanley Prusiner aufgestellte Prion-Hypothese, und später konsequenter formulierte „protein-only“-Hypothese besagt, dass allein eine Konformationsänderung des Prion-Proteins den Unterschied zwischen zellulärem PrP und infektiösen Prionen darstellt. Der Konversionsprozess von einem α -helikalen zu einem β -faltblattreichen Prion-Protein geht mit einer gesteigerten Unlöslichkeit und damit verbundener Aggregation des Proteins einher. Die entstehenden Aggregate bilden amorphe und fibrilläre Ablagerungen. Da auch von anderen Proteinen ein solcher Konversionsprozess mit pathologischen Folgen bekannt ist (s. Kapitel 1, Tabelle 1.1/2), spricht man allgemein von Proteinfehlfaltungskrankheiten. Die Besonderheit der Prion-Krankheiten besteht in ihrer Übertragbarkeit. Den vorläufigen Beweis der Theorie erbrachten Prusiner und Kollegen 2004, indem sie allein durch amyloides rekombinantes Prion-Protein in transgenen Mauslinien eine Prion-Erkrankung induzieren konnten (Legname *et al.*, 2004). Daher stellen die amyloid bildenden Proteinfaltungswege den besten *in vitro* Ansatz zur molekularen Analyse der Prion-Erkrankung dar. Mit diesem Ansatz können auch die verschiedenen Ätiologien der Prion-Krankheiten, nämlich die spontane, genetisch bedingte und durch Infektion hervorgerufene PrP-Fehlfaltung, nachvollzogen werden. Daher ist ein molekulares Verständnis des Fehlfaltungsweges *in vitro* essentiell für die Untersuchung der PrP-Fehlfaltung im Krankheitsfall.

Ziel dieser Arbeit war es, den Fehlfaltungsweg des rekombinanten Prion-Proteins der Sequenz 90-231 (syrischer Hamster) von der ersten stabilen Vorstufe bis hin zu den fibrillären Strukturen zu analysieren. Die biophysikalische Analyse der generierten fibrillären Strukturen sollte die Ähnlichkeit mit authentischen PrP^{Sc} und damit die Aussagekraft des Fehlfaltungsweges sicher stellen.

Zusätzlich sollte das in einer früheren Arbeit (Leffers *et al.*, 2005) für natürliches Prion-Protein etablierte Konversionssystem auf PrP^C, das in einer eukaryotischen CHO-Zellkultur exprimiert wurde, übertragen werden. Neben der ultrastrukturellen Analyse der entstanden Aggregate mussten die Fibrillen auf ihre Infektiosität hin im Tierver-

such getestet werden, was jedoch wegen der langen Inkubationszeit nicht innerhalb dieser Arbeit abgeschlossen werden konnte.

4.1 Der metastabile Intermediärzustand als Vorstufe der amyloiden Aggregation des Prion-Proteins

Das in dieser Arbeit vorgestellte Konversionssystem basiert auf der Kombination von anionischem Detergenz SDS und NaCl als Lösungsmittel. Dafür wird rekombinantes Prion-Protein nach der Aufreinigung auf 0,2 % SDS eingestellt. Induktion der Konversion erfolgt durch das Verdünnen des SDS und unter gleichzeitiger Zugabe von 250 mM NaCl. Diese Bedingungen induzieren einen teildenaturierten Zwischenzustand (s. Kap. 3.1.2, Abb. 3.2; Abb. 4.1 B). Zum Vergleich dienten die von Hornemann und Glockshuber (Hornemann *et al.*, 1998) veröffentlichten CD-Spektren von verschiedenen Sekundärstrukturen des rekombinanten Maus PrPs (Abb. 4.1 A). In dieser Abbildung sind der durch NMR-Analysen bestätigte α -helikale Zustand (Riek *et al.*, 1996), aber auch der volldenaturierte „random-coil“-Zustand dargestellt. Das in der vorliegenden Arbeit (Abb. 4.1 B) gemessene CD-Spektrum des Intermediärzustandes der Fibrillogenese kann als eine Kombination des voll denaturierten PrPs (gestrichelte Linie in Abb. 4.1) und des α -helikalen Zustandes (durchgezogene Linie, Abb. 4.1) des rekombinanten Maus Prion-Proteins angesehen werden. In der Arbeit von Hornemann und Glockshuber wird auch ein β -faltblattreiches „Faltungsintermediat“ aufgeführt, welches dem β -faltblattreichen Spektrum unter NaCl-freien Bedingungen im SDS-Konversionssystem entspricht. Ob dieses Intermediat nach weiterer Inkubation fibrilläre Strukturen oder sogar PrP^{Sc} ausbildet, wird in dieser Arbeit nicht erwähnt.

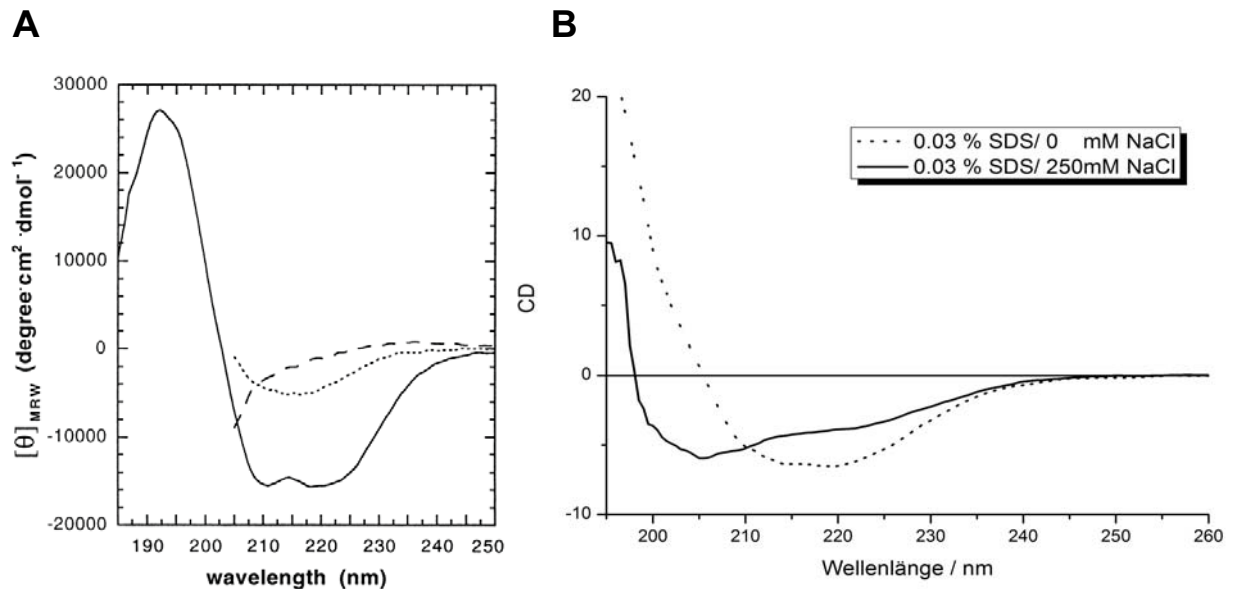


Abb. 4.1 Sekundärstrukturen von rekombinanten Prion-Proteinen

A: Maus Prion-Protein (Aminosäuren: 120-230; Hornemann & Glockshuber, 2000; α Helix: durchgezogene Linie; vollständige Denaturierung: gestrichelte Linie, „Faltungsintermediat“: gepunktete Linie); B: Sekundärstrukturanalyse des recPrP90-231; 0.03 % SDS/250mM NaCl (Linie); 0.03 % SDS/ kein NaCl (Punkte).

Aus den CD-Spektren ist nicht ersichtlich, welcher Teil des Proteins zur α -helikalen Sekundärstruktur gefaltet und welcher Sequenzabschnitt in Folge einer random-coil Formation flexibel ist. Unter den Bedingungen, die zur Strukturaufklärung mittels NMR verwendet wurden, teilt sich das Prion-Protein in einen hochflexiblen Sequenzabschnitt 90-119 und in einen globulären Abschnitt von Aminosäure 120-231, der durch α -Helices dominiert wird. Unter den verwendeten SDS-Bedingungen (0,03 % SDS, 250 mM NaCl) wird das in den CD-Experimenten ermittelte Spektrum durch ein stärkeres Minimum bei 205 nm dominiert. Dieses charakteristische Spektrum kann demnach als eine Kombination von „random-coil“ und α -helikalen Strukturelementen angesehen werden. Daher könnte man vermuten, dass ein Teil der Faltung des C-Terminus beibehalten wird und durch einen stärkeren, über den Bereich von Aminosäureabschnitt 90-120 hinausgehenden, „random-coil“-Anteil des N-Terminus ergänzt wird.

4.1.1 Strukturelle Auswirkung von Denaturierungsmitteln und NaCl

Die meisten, in der Prion-Forschung bekannten, Konversionssysteme zur Ausbildung amyloider Strukturen verwenden neben den verschiedenen Detergenzien auch NaCl in den Ansätzen (Baskakov *et al.*, 2002; Jackson *et al.*, 1999; Swietnicki *et al.*, 2000). Keine dieser Studien beschäftigte sich mit dem spezifischen Einfluss von Detergenz und NaCl genauer. In früheren Arbeiten mit dem SDS-Konversionssystem (ohne Zusatz von NaCl) ist der alleinige Einfluss des Detergenz ausführlich charakterisiert worden (Leffers *et al.*, 2004) und konnte nun mit dem modifizierten System verglichen werden. Die Daten der vorangegangenen Arbeiten liefern nun die Grundlage für den Vergleich des Konversionsverhaltens mit und ohne NaCl.

In Kapitel 1.7 dieser Arbeit wurde schon erwähnt, dass das Amyloid bildende System eine Modifikation des früheren Konversionssystems darstellt, in dem durch verschiedene SDS-Konzentrationen definierte Sekundärstrukturen von Prion-Proteinen eingestellt werden konnten. In Abbildung 4.2 ist im oberen Teil das früher bekannte Konversionssystem dargestellt und wird im unteren Teil dem in dieser Arbeit verwendeten und analysierten System gegenüber gestellt. Die Auswirkung der Zugabe von 250 mM NaCl soll im folgenden Abschnitt genauer behandelt werden.

Voraussetzung für die Ausbildung amyloider Strukturen im SDS-System ist im Fall des recSHaPrP(90-231) eine SDS-Konzentration von 0,03 % SDS (Stöhr 2003, Leffers *et al.*, 2005). An den beiden in Abb. 4.2 gezeigten Sekundärstrukturspektren kann man nun die drastische Auswirkung von NaCl auf die Sekundärstruktur beobachten. Bei einer SDS-Konzentration von 0,03 % SDS zeigt das PrP eine β -faltblattreiche dominierte Struktur. Aus früheren Arbeit ist bekannt, dass unter diesen Bedingungen das Protein in 12 bis hin zu 16meren vorliegt (Jansen *et al.*, 2001; Leffers *et al.*, 2004). Die Zugabe von 250 mM NaCl induziert nun eine Struktur, deren Spektrum auf einen teildenaturierten Zustand mit α -helikalen Strukturanteilen schließen lässt. Ähnliche Spektren treten im SDS-Konversionssystem ohne NaCl erst unter doppelt so hohen ($\geq 0,06$ % SDS) SDS-Konzentrationen auf.

Auch ist das Löslichkeitsverhalten von PrP in den beiden Konversionssystemen (mit oder ohne NaCl) trotz vergleichbare Sekundärstrukturanteile unterschiedlich. So ist PrP unter SDS-Konzentrationen von $\geq 0,06$ % löslich, aggregiert aber bei 0,03 % SDS/250 mM NaCl zu amyloiden Fibrillen. Dieser Vergleich soll deutlich machen, dass eine dem präamyloiden Intermediärzustand vergleichbare Sekundärstrukturver-

teilung höhere SDS-Konzentrationen benötigt, wenn kein NaCl an der Beeinflussung der Strukturformation beteiligt ist.

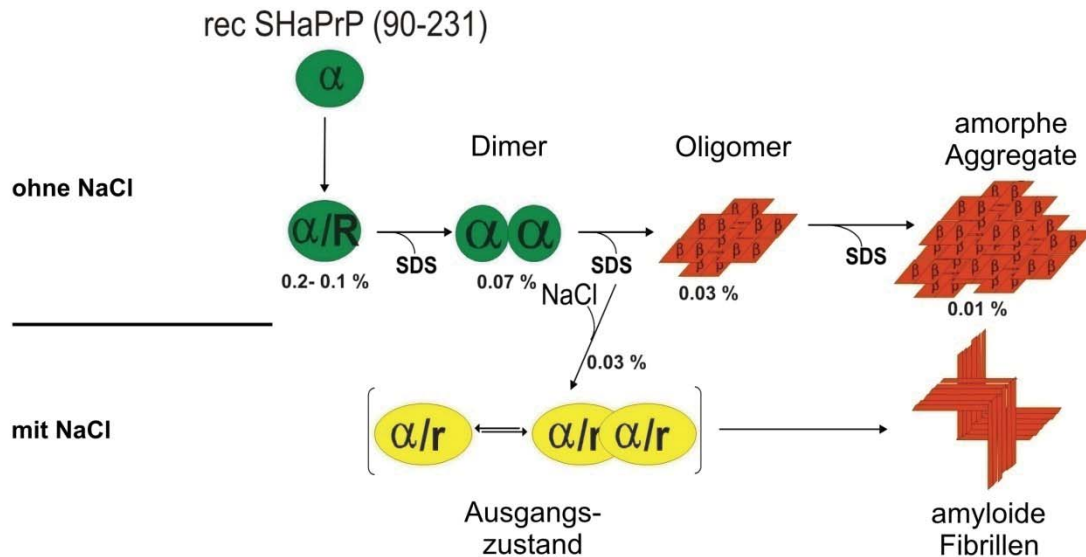


Abb. 4.2: Vergleich des Konversionssystem mit und ohne NaCl

Der obere Teil („ohne NaCl“) der Abbildung behandelt die strukturelle Konversion von recPrP unter verschiedenen SDS-Konzentrationen. Bei einer SDS-Konzentration von 0,03 % SDS und Zugabe von 250 mM NaCl wird ein Monomer-Dimer Gleichgewicht eingestellt, welches zu amyloiden Fibrillen aggregiert.

Ohne Zugabe von 250 mM NaCl werden bei 0,01 % SDS β -faltblattreiche Strukturen ausgebildet und es entstehen amorphe Präzipitate (Post *et al.*, 1998). Daraus geht hervor, dass eine SDS-induzierte β -faltblattreiche Struktur, ohne die Zugabe von NaCl, nicht zu amyloiden Strukturen führt. Daher muss davon ausgegangen werden, dass die durch SDS allein induzierten β -Strukturen im rekombinanten Prion-Protein nicht die Ausdehnung oder die Sequenzbereiche betreffen, die für die Ausbildung amyloider Fibrillen ausschlaggebend sind. Da die β -faltblattreichen Strukturen hydrophobe Bereiche des Prion-Proteins exponieren und daher nur schlecht löslich sind, können vor der Aggregation gebildete Faltblätter nicht mehr an dem für Fibrillenbildung benötigten Abschnitt des PrPs teilhaben. Außerdem ist denkbar, dass die im Modell für PrP^{Sc} vorgeschlagene β -Helix-Ausbildung (s Abb. 1.3) durch die hier von vorne herein festgelegten β -Struktur-Abschnitte verhindert werden. Aus den Daten der hier vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals aus dem SDS-basierten *in vitro*-Konversionssystem abgeleitet werden, dass sich der Intermediärzustand zur Ausbildung amyloider Fibrillen grundsätzlich von dem der amorphen Aggregation unter-

scheidet. So liegt der Intermediärzustand der amorphen Aggregation in einer β -faltblattreichen oligomeren (12-16 PrP-Moleküle, Jansen *et al.*, 2001) Form vor, wohingegen der präamyloide Intermediärzustand teildenaturiert ist und ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht ausbildet.

Eine ähnliche Beobachtung wurde auch in dem Konversionssystem gemacht, welches für die Ausbildung synthetischer Prionen verantwortlich ist. In diesem System existiert eine Subpopulation eines β -strukturierten Oligomers (vergleichbar mit den Oligomeren bei 0,03 % SDS ohne NaCl), das nicht auf dem Bildungsweg der amyloiden Form von recPrP liegt (Baskakov *et al.*, 2002).

Anderen Arbeitsgruppen konnten ebenfalls eine Auswirkung von NaCl auf die Struktur von PrP-Fragmenten zeigen (Apetri *et al.*, 2003). Die Untersuchungen beschäftigten sich mit dem entfaltenden Charakter von NaCl auf die Helix I-Region (vgl. Abb. 1.2) des Prion-Proteins. In Entfaltungsexperimenten konnte in der zitierten Arbeit gezeigt werden, dass höhere NaCl-Konzentrationen die Entfaltung der Helix-I begünstigen. Die Entfaltung könnte auf zwei α -Helix-stabilisierende Salzbrücken zurückgeführt werden. Mutationsstudien, die Auswirkungen auf die Salzbrücken haben, zeigten eine effektivere PrP^C zu PrP^{Sc}-Konversion (Speare *et al.*, 2003). Ob genau dieser Salzeffekt an der Strukturänderung beteiligt ist, kann aus den hier vorliegenden Daten nicht direkt geklärt werden. So ist es denkbar, dass die Sekundärstrukturveränderung auch auf Effekte zurückgehen könnte, die das Salz auf die SDS-Protein-Bindung hat, und dann Auswirkungen auf das Aggregationsverhalten von PrP zeigt.

Unter den hier verwendeten Lösungsmittelbedingungen (0,03 % SDS (1 mM)/250 mM NaCl) liegt man knapp unter der kritischen mizellaren Konzentration (CMC) von 1,1 mM SDS (Dutkiewicz & Jakubowska, 2002). Zieht man die Ergebnisse aus den weiteren Charakterisierungen des präamyloiden Zustandes hinzu, so bestätigt sich die Annahme. Bei SDS-Konzentrationen unterhalb der CMC bindet 1 g Protein 0,4 g SDS, das entspricht ca. 20 SDS-Molekülen/PrP (Rangachari *et al.*, 2006). Diese Annahme wird durch die AUZ-Analysen des monomeren PrPs gestützt (s. Tab. 3.1). Desweiteren muss man davon ausgehen, dass die angegebene CMC für das frei in Lösung vorliegende SDS gilt und somit das an das Protein gebundene SDS nochmals von der Gesamtmenge abgezogen werden muss. Die hier gewählten Bedingungen zur Fibrillenbildung liegen demnach knapp unterhalb der CMC und beeinflussen die Messungen des präamyloiden Zustandes nicht.

Vergleicht man andere Konversionssysteme mit den hier vorliegenden Daten, so scheint sich ein Grundprinzip der Konversion hin zu amyloiden Fibrillen abzuzeichnen. Da die meisten nativ gefalteten Proteine spontan keine amyloiden Strukturen ausbilden, lässt sich schlussfolgern, dass eine partielle Entfaltung für eine strukturelle Reorganisation nötig ist. Alle Studien zur Aufklärung der genaueren Mechanismen der Fehlfaltungswege, seien sie nun krankheitsassoziiert oder nicht, wurden in Modellsystemen *in vitro* durchgeführt. *In vitro* Experimente zur amyloiden Fehlfaltung basieren auf der Verwendung von denaturierenden oder teildenaturierenden Bedingungen. Dieser Mechanismus der teilweisen Entfaltung ist bei den meisten Modellsystemen zu erkennen. So wird für die Fibrillogenese der synthetischen Prionen (Bocharova *et al.*, 2005a; Legname *et al.*, 2004) eine Kombination von hohen Harnstoff- und Guanidiniumhydrochlorid-Konzentrationen in der Gegenwart von NaCl verwendet. Aber auch für nicht Prion-Proteine werden teildenaturierte Konformere benötigt, um diese in amyloide Fibrillen zu überführen (Catharino *et al.*, 2005; Niraula *et al.*, 2004). Die meisten Studien zeigen eine konstante Einstellung denaturierender Bedingungen, unter denen es spontan zur Ausbildung von Fibrillen kommt. Andere Studien verzichten auf dauerhafte Protein-entfaltende Bedingungen. So kommt es bei hitzeinduzierter Entfaltung von Insulin zu einer anfänglichen Denaturierung, die vergleichbar mit dem historischen Effekt des Ei-Kochens ist. In dieser Form der Denaturierung werden hydrophobe Bereiche des Proteins exponiert und aggregieren anschließend. Daher kommt es nach einer anschließenden Inkubationszeit zur Bildung von Insulin-Fibrillen (Jimenez *et al.*, 2002). Darüber hinaus zeigen einige Arbeiten ein breites Spektrum von Bedingungen, unter denen ein einzelnes Protein Fibrillen bilden kann (McParland *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2003). Meistens liegt die Auswirkung dieser Variationen in einer veränderten Inkubationszeit und/oder in einer dann veränderten Morphologie der Fibrillen. Somit kann ein teildenaturierter Intermediärzustand, bis auf einige Ausnahmen (Jackson *et al.*, 1999; Tattum *et al.*, 2006), als genereller präamyloider Ausgangszustand für die Fibrillogenese von Proteinen postuliert werden.

4.1.2 Ein Monomer-Dimer-Gleichgewicht als Vorstufe amyloider Fibrillen

Neben der Charakterisierung der Sekundärstruktur des zur Fibrillenbildung neigenden metastabilen Intermediärzustandes von PrP ist die Aufklärung des Oligomerisierungsgrades der ersten stabilen Zwischenstufe im Konversionsprozess von besonderem Interesse. Das in dieser Arbeit eingeführte Konversionssystem besitzt die Eigenschaft, dass erst nach langer Inkubationszeit amyloide Fibrillen zu detektieren sind. Diese Eigenschaft ließ eine genauere Analyse des Intermediärzustandes mit der Analytischen Ultrazentrifugation (AUZ) zu. Auswertungen der Gleichgewichtszentrifugationen unter verschiedenen Drehgeschwindigkeiten konnten ein Monomer-Dimer Gleichgewicht unter den Amyloid ausbildenden Bedingungen nachweisen (Kap. 3.1.2). Somit kann der Intermediärzustand als ein Monomer-Dimer Gleichgewicht angesehen werden, dessen Sekundärstruktur teildenaturiert ist.

Wie kann nun aber die Ausbildung eines stabilen Monomer-Dimer Gleichgewichts in die Bildung von Fibrillen einbezogen werden?

Bisher konnte die atomare dreidimensionale Struktur von PrP^{Sc} aufgrund der Unlöslichkeit nicht bestimmt werden. Daher steht für diese Betrachtung nur ein Modell zur Verfügung, welches aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen an 2D-Kristallen von PrP^{Sc} ermittelt wurde (DeMarco *et al.*, 2006; Govaerts *et al.*, 2004; Wille *et al.*, 2002). Aus den Daten hervorgehend besteht die Einheitszelle in der kristallinen Anordnung aus einer trimeren PrP^{Sc}-Einheit (vgl. Kap. 1 Abb. 1.3). Unter Berücksichtigung des trimeren Modells von PrP^{Sc} als Untereinheit der hier vorliegenden Fibrillen wäre es vorstellbar, dass aus dem Gleichgewicht stabile trimere Untereinheiten (oder ein Vielfaches dieser Trimere) für die Ausbildung von amyloiden Fibrillen entstehen könnten.

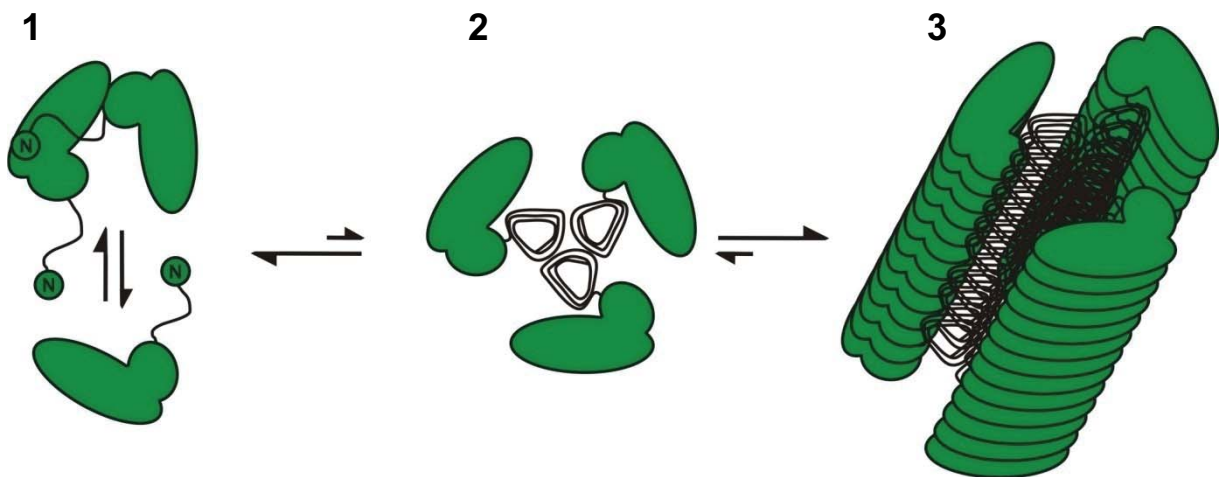


Abb. 4.3: Hypothetischer Bildungsweg von $\text{PrP}^{\text{amyloid}}$ aus einem Monomer-Dimer Gleichgewicht und unter Berücksichtigung des trimeren Modells von PrP^{Sc}

(Govaerts *et al.*, 2004)

In einem aus der vorangegangenen Annahme abgeleiteten Mechanismus (Abb. 4.3/1-3) wäre es denkbar, dass während der Inkubationszeit das PrP - Monomer-Dimer Gleichgewicht (1) zwischen einer PrP^{Sc} (bzw. $\text{PrP}^{\text{amyloid}}$)- Form (2) und der teildenaturierten Konformation wechselt, diese ohne weitere Stabilisation der 3. Dimension aber nicht eingehalten werden kann (zurück zu 1). So kommt es immer wieder zu einer strukturellen Fluktuation zwischen den beiden Zuständen 1 (teildenaturiertes Gleichgewicht) und 2 ($\text{PrP}^{\text{amyloid}}$ -Trimer). Erst die stabilisierende Wirkung eines zweiten oder mehrerer, exakt gleich gefalteter PrP -Trimere, stabilisiert dann den Zustand 2 und bildet die erste stabile fibrilläre Einheit (3). Sie bildet somit den ersten Keim der darauf folgenden amyloiden Aggregation.

Auch andere Arbeitsgruppen diskutieren in theoretischen Arbeiten ein Dimer als Vorstufe des Bildungsweges von PrP^{Sc} (Malolepsza *et al.*, 2005; Sekijima *et al.*, 2003). Da diese Arbeiten aber *in silico* entstanden sind, lässt sich wenig über ihren Bezug zum realen Konversionsprozess und die damit verbundene Relevanz aussagen. Ebenfalls konnte die Struktur eines dimeren Zustands des humanen Prion-Proteins durch die Röntgenbeugung an Proteinkristallen atomar aufgeklärt werden (Knaus *et al.*, 2001). Die Struktur wurde über einen „domain swapping“-Mechanismus gebildet der mit Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke einhergeht. Für die Konformationsänderung von PrP^{C} zu PrP^{Sc} ist aber keine Reduktion und Reoxidation der Disulfidbindung notwendig bzw. detektiert worden (Welker *et al.*, 2002). Deshalb ist der Mechanismus eher als artifizieller Weg zur Kristallisation einer aberranten Form

zu sehen, ohne einen Beitrag zur Aufklärung des Oligomerisierungsprozesses des Prion-Proteins zu leisten. In einer anderen Arbeit zur Strukturaufklärung des Prion-Proteins mit Hilfe der Röntgenbeugung an Kristallen, welche die NMR-Struktur bestätigte, konnte nur ein Monomer in der asymmetrischen Einheitszelle detektiert werden (Haire *et al.*, 2004). Desweiteren gibt es nur wenige Arbeiten, die ein PrP-Dimer *in vivo* identifiziert haben. So konnten Priola und Kollegen ein dimeres Protein mit PrP-Epitopen identifizieren, welches aber kovalent miteinander verbunden war und deshalb nicht durch entfaltende oder reduzierende Agenzien voneinander getrennt werden konnte (Priola *et al.*, 1995). In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass natürliches PrP^C auch in einem Dimer-Monomer-Gleichgewicht vorkommt (Meyer *et al.*, 2000). Auch in unserer Arbeitsgruppe konnte ein α -helikaler, dimerer Zustand des Prion-Proteins im NaCl-freien Konversionsystem nachgewiesen und genauer analysiert werden (Jansen *et al.*, 2001). Dieses Dimer wird im folgenden Kapitel näher vorgestellt und mit dem präamyloiden Dimer dieser Arbeit verglichen.

4.1.3 Molekulare Kontaktstellen im „NaCl-freien“ und teildenaturierten Dimer

Da das PrP-Dimer die erste detektierbare Vorstufe zur Fibrillenbildung ist, stellt eine molekulare Kontaktstelle im Dimer den ersten Berührungspunkt der Prion-Protein-Untereinheiten auf dem Weg zu PrP^{Sc}-ähnlichen Fibrillen dar. Bisher wurden in der Literatur nur Beschreibungen zur Existenz von dimeren Zuständen des Prion-Proteins, nicht aber eine Beschreibung der molekularen Aminosäurekontakte geliefert. Dagegen wurde in unserer Arbeitsgruppe ein System zur Analyse der molekularen Kontaktstellen in PrP-Dimeren etabliert (Kaimann *et al.* 2007, zur Publikation eingereicht). Für die Analyse wird der Crosslinker EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid Hydrochlorid) verwendet. EDC ist ein heterobifunktioneller Crosslinker, der freie Amino- und Carboxylgruppen durch Bildung einer Amidbindung aneinander koppelt, ohne dass ein Ligand eingebaut wird (sog. „Nulllängen-Crosslinker“). Es können also Glutamat- bzw. Aspartatgruppen mit in unmittelbarer Nähe befindlichen Aminogruppen vernetzt werden. Im ersten Schritt der Reaktion

aktiviert EDC die Säuregruppe. Befindet sich in der direkten Nachbarschaft keine weitere Aminogruppe, so reagiert EDC mit Wasser ab und die Säuregruppe wird freigesetzt. Die gesamte Reaktion konnte in einer PrP-Dimer enthaltenden Lösung durchgeführt werden. Nach der chemischen Reaktion wurde der Ansatz in einer SDS-PAGE aufgetrennt (Kap. 3; Abb 3.5). Die Analyse von kovalent vernetzten Dimeren detektiert nicht dasselbe Verhältnis von Dimer zu Monomer, wie aus den AUZ Experimenten ermittelt wurde. Dies kann damit erklärt werden, dass die chemische Reaktion nicht zu 100 % abläuft. So wird jedes nicht kovalent vernetzte Dimer als Monomer in der SDS-PAGE-Auftrennung detektiert.

In der Arbeit von Kaimann (2006) wurde ein Dimer im salzfreien SDS-Konversionssystem (Abb. 4.2, „0,07 % SDS-Dimer“) analysiert und wird im Folgenden mit dem in der vorliegenden Arbeit analysierten Dimer verglichen. Im „NaCl-freien“ Dimer wurden exakt dieselben Quervernetzungen wie im teildenaturierten dimeren Zustand (mit 250mM NaCl) detektiert. Der einzige Unterschied zum präamyloiden Zustand ist eine teilweise intramolekulare Quervernetzung der monomeren Untereinheit des Dimers, welche aber identisch mit der intermolekularen Kontaktstelle im Dimer ist. Somit konnte in der Arbeit von Kaimann *et al.* eine Strukturierung des N-Terminus detektiert werden, die über den aus NMR-Messungen bekannten globulären Teil des Prion-Proteins hinausgeht.

Die Analyse der entstandenen Peptidfragmente des präamyloiden dimeren und auch monomeren Zustandes, nach tryptischer Proteolyse mit anschließender ESI-LC-MS/MS-Messung, lieferte folgende Kontaktstellen: Die Hauptverknüpfungspunkte sind zwischen der N-terminalen Aminogruppe von Glycin an Position 90 des detektierten Fragments 90-106 und dem Segment 152-156, welche der vorher beschriebenen Kontaktstelle des „NaCl-freien“ Dimers entsprechen. Innerhalb des gelelektrophoretisch aufgetrennten Monomers zeigten sich keine bzw. kaum detektierbare intramolekulare Kontaktstellen, was den größten Unterschied der beiden diskutierten Dimere ausmacht.

Aus dem Vergleich kann man nun sehr gut ableiten, dass durch die nur teilweise N-terminale Rückfaltung im Monomer der N-Terminus im PrP unter Amyloid-ausbildenden Bedingungen weitaus flexibler ist. Da dieser Abschnitt der Sequenz ohne NaCl in einem Dimer mit einer „stabilen“ Struktur eingebunden ist, wird die Fibrillenbildung verhindert und das Protein bleibt trotz vergleichbarer CD-Spektren

(Abb. 3.2 und 3.3) löslich. Erst die partielle Auflösung der Struktur durch Zugabe von NaCl bei einer niedrigeren Konzentration von SDS ermöglicht die amyloide Aggregation, wobei aber die Sekundärstrukturanteile quantitativ gleich verteilt bleiben (Kap. 3.1/4.1).

Auch waren die Intensitäten der gemessenen Peptide nicht so hoch wie in den vorher erwähnten Quervernetzungs-Experimenten (Kaimann *et al.*, zur Publikation eingereicht). Dies ist möglicherweise eine Auswirkung des höheren Denaturierungsgrades (Kapitel 4.1), so dass nun nicht alle N-Termini an der Ausbildung der Dimer-Kontaktstelle beteiligt sind, was auch die nicht vorhandenen Quervernetzungen in der monomeren Untereinheit nahe legen.

Die N-terminale Flexibilität deckt sich mit der aktuellen Vorstellung des Konversionsprozesses von PrP^C zu PrP^{Sc} (Govaerts *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 1993). Zum einen spiegelt es die Tatsache wieder, dass für den Konversionsprozess des α -helikalen Proteins zu dem β -faltblattreichen PrP^{Sc} eine Zwischenstufe teilentfaltet werden muss, desweiteren scheint der Bereich von 90 bis 170 am stärksten von der Umfaltung betroffen zu sein (vgl. 1.4.2, Abb.1.3). Da nach allen heutigen Erkenntnissen die Disulfidbindung während der Konversion nicht verändert wird, bildet sie eine „Strukturklammer“. Der Aminosäurebereich nach dieser Bindung (Position 179) ist sehr wahrscheinlich nicht an der Konversion beteiligt. Diese Hypothese konnte auch durch eine Arbeit bestärkt werden, die eine weitere Disulfidbrücke in die PrP Struktur innerhalb des von der Konversion betroffenen Bereiches einfügte. So zeigte die Mutante keine Auswirkung auf die PrP^C-ähnliche Struktur, konnte aber in dem dort verwendeten Konversionssystem im Gegensatz zum Wildtyp-PrP nicht in amyloide Fibrillen überführt werden (Knowles *et al.*, 2006).

4.2 Ausbildung amyloider Fibrillen des rekombinanten Prion-Proteins

Unter den hier besprochenen Bedingungen von 0,03 % SDS/250 mM NaCl und bei neutralem pH aggregiert recPrP(90-231) innerhalb eines Zeitraumes von 5 bis 7 Wochen in unlösliche, elektronenmikroskopisch sichtbare Fibrillen (s. Abb. 3.1., 3.8). Die Fibrillen besitzen eine unverzweigte Struktur mit einem Durchmesser von ca. 8 bis 15 nm (Abb. 3.1/8) und lassen sich durch den amyloidspezifischen Farbstoff Thioflavin T

von anderen nicht fibrillären Proteinstrukturen eindeutig unterscheiden, wie sich an der spezifischen ThT-Fluoreszenzerhöhung zeigt (s. Abb. 3.7).

Wie bereits erwähnt, erfolgte die Aggregation aus einem löslichen Monomer-Dimer Gleichgewicht und führte zu verschiedenen amyloiden Überstrukturen, wie sie in Abb. 3.1 gezeigt werden. So können einige der Ultrastrukturen innerhalb eines einzelnen Ansatzes beobachtet werden. Die Diversität der Überstruktur bezieht sich auf den Zusammenschluss von einzelnen Fibrillen. Dabei kommen laterale sowie umeinander gewundene Anlagerungen der 8-12 nm breiten Fibrillen vor (Abb. 3.1/8/9). Vergleichbare Aussagen zu unterschiedlichen Strukturen von Fibrillen rekombinanter Prion-Proteine sind bisher nur in einer weiteren Arbeit publiziert bzw. erwähnt worden. Die Autoren kommen zum Schluss, dass unterschiedliche rekombinante Spezies (Maus vs. Hamster) unterschiedliche Überstrukturen zeigen (Makarava *et al.*, 2006). Dabei ordnen sie dem Prion-Protein der Maussequenz eine lateral flächige Anlagerung der Fibrillen zu und denen des Hamster Prion-Proteins eine eher lateral gewundene Anlagerung. Diese klare Zuordnung der Überstruktur des Hamster Prion-Proteins wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht beobachtet, da beide Arten der erwähnten Überstruktur in dieser Arbeit detektiert werden konnten. Daher könnte der Unterschied in der Arbeit von Makarava *et al.* als eine Auswirkung von verschiedenen Konversionsbedingungen angesehen werden und nicht als intrinsische Eigenschaften der verglichenen Peptidketten. Erst eine vergleichende Analyse von rekombinanten PrPs verschiedener Spezies im SDS-System mit Salz könnte Spezies-spezifische Unterschiede in den amyloiden Überstrukturen aufdecken. Im Gegensatz zu der zitierten Studie sind Variationen in den Überstrukturen innerhalb eines Ansatzes auch aus Arbeiten mit anderen Proteinen bekannt, wie die Beispiele an amyloiden Fibrillen aus Lysozym und Insulin zeigen (Jimenez *et al.*, 2002).

Unter der Annahme des in Abb. 4.3 vorgeschlagenen Mechanismus, ist die Bildung des ersten stabilen amyloiden Keims der Beginn der Fibrillogenese. Die einzelne Trimer-Einheit ist als instabil zu bezeichnen und wird erst durch die Anlagerung einer weiteren Einheit in der dritten Dimension stabilisiert. Das eher seltene Ereignis, in dem zwei gleichartig „fehlgefaltete“ Trimere aufeinander treffen und sich gegenseitig stabilisieren, kann der Grund für die relativ lange Inkubationszeit von 5 bis 7 Wochen sein. Die Konzentrationserhöhung auf 300 ng/μl bringt eine höhere Wahrscheinlichkeit dieses Ereignisses mit sich. Daher resultierte dieser experimentelle Ansatz, wie

im Modell erwartet, dann in einer beschleunigten Fibrillenbildung innerhalb von nur einer Woche (Kap. 3.1.6).

Ein Konversionssystem ist umso besser zur Analyse der Prionenbildung geeignet, je ähnlicher die generierten Aggregate den natürlichen Prionen sind. Da bisher für PrP^{Sc} keine atomare Struktur aufgelöst werden konnte und die vorhandenen Modelle nur auf der Kombination von biochemischen Daten und niedrig aufgelösten Strukturdaten beruhen, wurden die in dieser Arbeit erhaltenen Fibrillen mit biophysikalischen Charakteristika von PrP^{Sc} verglichen.

Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, liefert die Konversion des rekombinanten PrPs amyloide Fibrillen. Das in dieser Arbeit verwendete rekombinante Prion-Protein besteht aus der Sequenz 90-231, welche der Aminosäuresequenz von infektiösen PrP 27-30 entspricht. PrP 27-30 bildet, wie schon in Kapitel 1.4.2 beschrieben, innerhalb des Aufreinigungsprozesses amyloide Fibrillen. Auch der vorläufige Beweis der Prion-Hypothese wurde durch ein Konversionssystem erreicht, welchem die Bildung von amyloiden Fibrillen zugrunde liegt (Legname *et al.*, 2004). Die in der vorliegenden Arbeit generierten Fibrillen zeigen elektronenmikroskopisch vergleichbare Strukturen zu den vorher angesprochenen, infektiösen Präparationen von PrP 27-30 und den synthetischen Prionen.

Die Bindung des amyloid spezifischen Farbstoffes Thioflavin T resultierte in einer Fluoreszenzerhöhung, was eindeutig den amyloiden Charakter der Fibrillen bestätigte. Auch PrP27-30-Präparationen zeigen neben den schon erwähnten Fibrillen vergleichbare spektrale Eigenschaften bei Anfärbung mit Thioflavin T (Müller, 2006). Da die Thioflavin T-Bindung nur an β -strukturierten Fibrillen die spezifische Fluoreszenzerhöhung zeigt, kann von einer β -Faltblatt Anordnung innerhalb der in diesem System generierten Fibrillen ausgegangen werden. Für weitere strukturelle Untersuchungen stand nur die CD-Spektroskopie zur Verfügung und weil die Methode für aggregierte Proteine nur schlecht auswertbar ist, wurde von dieser Charakterisierung abgesehen, da die β -Faltblattstruktur schon indirekt über die Thioflavin T Bindung gezeigt werden konnte. Ob und welche der postulierten PrP^{Sc}-Modelle (DeMarco *et al.*, 2004; Govaerts *et al.*, 2004) den in dieser Arbeit gezeigten Strukturen gleichen oder ähneln, kann anhand der hier vorliegenden Daten nicht beurteilt werden.

Ein weiterer biochemischer Marker von PrP^{Sc} ist die partielle Resistenz gegenüber der zeitlimitierten (1h) Proteolyse durch das Enzym Proteinase K. Unter den natürlichen Bedingungen wird bei der Behandlung von Vollängen-PrP^{Sc} (Sequenz: 23-231)

nur ein N-terminales Fragment entfernt (Abschnitt: 23-89). Ein relativ einheitliches C-terminales Fragment, das sogenannte PrP27-30 (Sequenz: 90-231), verbleibt intakt und infektiös. Der Test auf proteolytische Resistenz wurde auch mit den in der vorliegenden Arbeit generierten Fibrillen (Kapitel 3.1.6) durchgeführt. Bei den beiden in Abb. 3.10 gezeigten proteolytischen Degradationen kann man Folgendes beobachten: Nach einer Stunde Inkubation unter verschiedenen Verhältnissen von Proteinase K zu PrP (Abb. 3.10) werden verkürzte Fragmente detektiert. Es ist ein schwaches Signal auf der Höhe des Ausgangsmaterials (16 kDa) erkennbar (Abb. 3.10). Es ist aber deutlich schwächer ausgeprägt als die darunter befindlichen Fragmente, deren Länge zwischen ca. 10 und 14 kDa beträgt. Das vergleichbare Experiment mit dem nicht fibrillären Ausgangsmaterial (Abb. 3.11) zeigt, dass diese spezielle PK-Resistenz aufgrund der Konversion entstand, da in diesen Ansätzen kein PrP (Abb. 3.11: „1:50“ und „1:20“) nach Proteinase K-Behandlung zu detektieren war.

Auffallend ist, dass bei fibrillärem recPrP(90-231) unter den gewählten Bedingungen ein Kontinuum aus PK-resistenten Fragmenten entsteht und nicht wie im Fall von PrP^{Sc} ein einheitlicher Schnitt erfolgt, der in dem sogenannten PrP27-30 resultiert. Eine Übersicht über das verwendete recPrP(90-231) sowie die aus Konversion und proteolytischer Degradation entstandenen Fragmente soll in Abbildung 4.4 gegeben werden. Der zur Detektion verwendete Antikörper erkennt das absolute C-terminale Ende des Prion-Proteins, so dass von einer N-terminalen Degradation, vergleichbar mit PrP^{Sc}, ausgegangen werden kann.

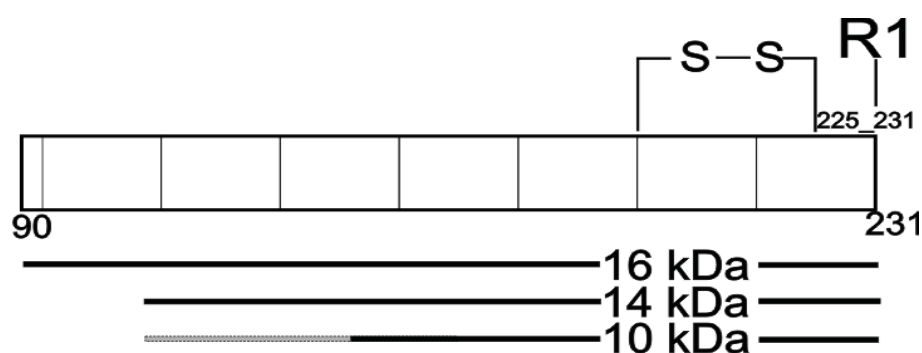


Abb. 4.4: Schematische Darstellung der PK-resistenten Fragmente nach Konversion von recPrP(90-231) in amyloide Fibrillen

Der grau eingefärbte Bereich spiegelt das im Western-Blot detektierte Kontinuum aus PK-resistenten Bereichen wieder. Desweiteren ist die Disulfidbrücke („S-S“) und das Epitop des im Western-Blot verwendeten Antikörpers R1 (Epitop: 225-231) dargestellt.

Die Infektiosität der Prionen geht nicht zwangsläufig mit einer gesteigerten PK-Resistenz einher (Birkmann *et al.*, 2006; Pastrana *et al.*, 2006). Daher muss davon ausgegangen werden, dass die PK-Resistenz durch die spezifische Struktur der entstandenen Aggregate hervorgerufen wird, nicht aber ein Hinweis auf eine mögliche Infektiosität ist. Diese aggregierte Struktur verhindert bzw. erschwert die vollständige Degradation durch Proteinase K. Im Fall des natürlichen Erregers entsteht eine einheitlich verkürzte infektiöse Isoform, die sich in einer spezifischen Schnittstelle bei der Behandlung mit Proteinase K widerspiegelt. Aufgrund der verschiedenen Schnittstellen der hier untersuchten fibrillären Strukturen besteht ein und derselbe Inkubationsansatz aus verschiedenen ultrastrukturellen Subspezies. Die nach Behandlung mit Proteinase K entstehenden Fragmente könnten somit unterschiedliche fibrilläre Spezies darstellen. So wäre es zum Beispiel denkbar, dass nur der resistente Teil des Prion-Proteins an der Ausbildung der fibrillären Kernstruktur partizipiert und sich dadurch dem Abbau durch die Proteinase K entzieht.

Vergleichbare „unübliche“ C-terminale Fragmente konnten auch in einem Fall von sCJD (Zou *et al.*, 2003) und den synthetischen Prionen detektiert werden (Bocharova *et al.*, 2005b). Darüber hinaus zeigen weitere Proteine nach erfolgreicher Konversion zu amyloiden Fibrillen eine gesteigerte PK-Resistenz, wie Arbeiten mit natürlichem A β -Plaques-assoziierten Protein (Soderberg *et al.*, 2005), einer amyloiden SH3-Domäne (Polverino de *et al.*, 2003) oder auch einem synthetisch hergestellten Peptid (Fezoui *et al.*, 2000) zeigen.

Ein weiteres und essentielles Merkmal von PrP^{Sc} ist die Eigenschaft, als Keim für die Vervielfältigung, d.h. Fehlfaltung weiterer PrP^C-Moleküle, zu dienen. Dieses Verhalten konnte in dieser Arbeit tatsächlich anhand der keiminduzierten Fibrillogenese nachvollzogen werden (Kap. 3.1.8, Abb. 3.12). Die Zugabe eines Keims, bestehend aus fibrillären PrP-Aggregaten, verkürzt die Inkubationszeit zur Ausbildung amyloider Strukturen von mehreren Wochen auf wenige Stunden. Eine vergleichbare Reaktion konnte auch in einer anderen Arbeit in unserer Gruppe durch die Zugabe von natürlichem PrP^{Sc} beobachtet werden (Weinmann, 2006). Vergleicht man die Experimente, so zeigen PrP^{Sc} und die hier verwendeten fibrillären Strukturen des rekombinanten PrPs in vergleichbaren Experimenten auch ein sehr ähnliches Verhalten.

Von Tierversuchen wurde bei diesen Fibrillen abgesehen, da in der vergleichbaren Studie (Legname *et al.*, 2004) die Fibrillen aus rekombinantem Maus PrP(89-230) nur in speziellen transgenen Mäusen positiv auf *in vitro* generierte Infektiosität getes-

tet werden konnten. Die transgene Mauslinie exprimiert das korrespondierende zelluläre Prion-Protein mit der Aminosäuresequenz 89-230. Tierversuche in einer wildtyp-Mauslinie konnten keine Infektiosität nachweisen. Da ein vergleichbares Tiermodell für das Hamster-Prion-Protein nicht existiert, wurden keine Tierversuche durchgeführt.

4.3 Fibrilläre Strukturen von PrP^C aus CHO-Zellen

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass eukaryotisch exprimiertes PrP^C bei 0,01 % SDS und 250 mM NaCl über einen Zeitraum von 5 Wochen zu Fibrillen aggregieren können (Leffers *et al.*, 2005). In der Arbeit von Leffers *et al.* wurde PrP^C aus den Hirnen nicht infizierter Hamster präpariert. PrP^C wird bei allen Säugetieren im neuronalen Gewebe in der größten Menge exprimiert (Kretzschmar *et al.*, 1986). Die Gesamtmenge des PrPs in Hirnen nicht infizierter Tiere liegt bei ca. 0,1 %, bezogen auf den Gesamtproteingehalt. In den bisher veröffentlichten Protokollen zur Aufreinigung von PrP^C aus Hirnmaterial wurden pro eingesetztes Gramm Hirnmaterial nur ca. 1 µg PrP^C präpariert (Pan *et al.*, 1992). Die Verwendung dieses Materials für Infektiositätsstudien mit Proteinmengen, die vergleichbar mit den Studien von Legname *et al.* (2004) sind, würde PrP^C-Präparationen sehr vieler gesunder Tiere voraussetzen und wurde daher nicht durchgeführt.

Aus dem vorher genannten Grund wurde für diese Arbeit von der Aufreinigung und Verwendung von natürlichem Hamster-PrP^C abgesehen. Die Quelle für eukaryotisches PrP^C stellte in dieser Arbeit eine CHO-Zellkultur dar, die PrP^C, verglichen mit neuronalem Gewebe, vierzehnfach überexprimiert (Blochberger *et al.*, 2000). Das System wurde in unserer Arbeitsgruppe innerhalb einer anderen Arbeit von dem Aufreinigungsprotokoll von PrP^C (Pan *et al.*, 1992) adaptiert und für die Aufreinigung von CHO-PrP^C optimiert (Elfrink und Riesner, 2004; Elfrink *et al.*, 2007). Das CHO-PrP^C besteht aus der Aminosäuresequenz des syrischen Hamsters und trägt einen Glykositolphosphatidylinositol (GPI)-Membrananker und zwei N-Glykosylierungen. Die beiden N-Glykosylierungen unterscheiden sich in ihrer Länge und Verzweigung von denen des natürlichen PrP^Cs (Elfrink, 2006). Dies äußert sich in der gelelektrophoretischen Mobilität des CHO-PrP^Cs (34-38KDa) gegenüber PrP^C (33-35 KDa). Da aber über die natürliche Funktion von PrP^C nicht viel bekannt ist, gibt es keinen verglei-

chenden Funktionstest für die beiden PrP^C-Formen, der Details über die Auswirkungen der unterschiedlichen Glykosylierungen liefern könnte.

Das schon an natürlichem PrP^C etablierte Konversionssystem sollte auf die Verwendung von CHO-PrP^C übertragen werden. Daher wurde wegen der nur geringfügigen Modifikationen des CHO-PrP^Cs zuerst die identische Bedingung (0,01 % SDS/ 250 mM NaCl), wie für natürliches PrP^C, für die Fibrillogenese getestet. Da das Protein (vgl. Abb. 3.14, 0,01 % SDS) zum großen Teil nach der Inkubationszeit von 7 Wochen löslich war, musste davon ausgegangen werden, dass nur ein kleiner Teil des CHO-PrP^C unlöslich wurde und damit auch nur wenige Aggregate elektronenmikroskopisch zu detektieren waren. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten bei der Analyse der unlöslichen Fraktion dieses Ansatzes nur sehr wenige fibrilläre Strukturen (Daten nicht gezeigt). Unter den gleichen Bedingungen aggregierte natürliches PrP^C vollständig, mit 10-20 % an fibrillären Strukturen (Leffers *et al.*, 2005). Der Unterschied in der Löslichkeit ist sehr wahrscheinlich auf die größeren und stärker verzweigten Glykosylierungen zurückzuführen, die eine höhere Löslichkeit unter gleichen SDS-Konzentrationen von CHO-PrP^C zur Folge haben. Ähnliches ist im Vergleich von rekombinanten PrP (90-231) zu entdecken. Die Einstellung von recPrP(90-231) auf 0,03 % SDS/250 mM NaCl führt zu fibrillären Strukturen, wohingegen solubilisiertes und desaktiviertes PrP27-30-(solPrP27-30) Fibrillen bei 0,01 % SDS/250 mM NaCl bildet. Diese beiden Konstrukte unterscheiden sich nur in den posttranslationalen Modifikationen, nämlich dem GPI-Membrananker und den Glykosylierungen.

Da die hier verglichenen PrP^C-Formen weniger unterschiedlich sind als die vorher erwähnten solPrP27-30 und recPrP(90-231), wurde zur Effizienzsteigerung des Systems eine geringfügige Anpassung in der SDS-Konzentration von 0,01 % auf 0,0075 % SDS vorgenommen. Unter den angepassten Bedingungen aggregierte das CHO-PrP^C innerhalb von 7 Wochen vollständig (Abb. 3.14). Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Proteinaggregate aus der Pelletfraktion nach der Löslichkeitsanalyse des CHO-PrP^Cs zeigten fibrilläre Strukturen (Abb. 3.15/16).

4.3.1 Immunogold-Markierung der fibrillären CHO-PrP^C Aggregate

Trotz der Veränderung im ultrastrukturellen Erscheinungsbild ist die Effizienz der CHO-PrP^C-Konversion (verglichen mit Fibrillen aus natürlichem PrP^C) weitaus höher und einheitlicher. So konnten in CHO-PrP^C-Ansätzen nur wenige, als amorph zu bezeichnende, Strukturen detektiert werden, welche in den vorangegangenen Arbeiten an natürlichem PrP^C den Hauptteil der unlöslichen Aggregate ausmachten.

Eine wichtige Analyse der hier generierten Fibrillen stellt die immunologische Markierung des PrPs mit Hilfe von Antikörpern dar, die mit Nanogoldpartikeln gekoppelt sind. Die Markierung der Fibrillen sollte den eindeutigen Beweis darstellen, dass die Strukturen aus CHO-PrP bestehen. Weiterhin konnte durch die Verwendung von zwei Antikörpern, die jeweils am absoluten C- und N-terminalen Ende des Prion-Proteins binden, gezeigt werden, dass das Volllängen-Konstrukt (Aminosäuresequenz 23-231) des Prion-Proteins in der Struktur der Fibrillen vorliegt. Somit kann ausgeschlossen werden, dass nur ein kürzeres Fragment des Prion-Proteins die fibrillären Strukturen bildet. Daher wurden zwei verschiedene Antikörper verwendet, die einmal den Sequenzabschnitt 30-37 (Antikörper-EST123) und zum anderen 225-231 (Antikörper-R2) erkennen (s. Abb. 4.5).

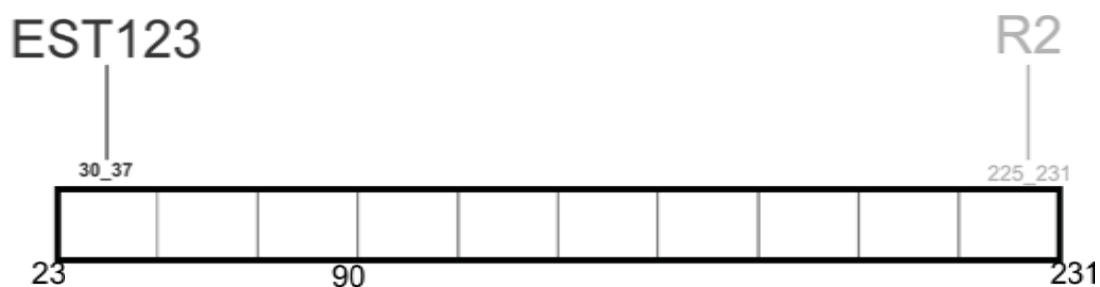


Abb. 4.5: Epitope der zum Immunogold-Markierung verwendeten Antikörper

EST123 bindet an den N-terminalen Sequenzbereich von Aminosäure 30 bis 37 und R2 den Abschnitt 225-231.

Beide Antikörper binden in einer Region, die nicht durch strukturelle Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} maskiert werden (Govaerts *et al.*, 2004). Somit kann mit den Antikörpern R2 und EST123 alle Prion-Protein Strukturisomere erkannt werden. Beide Antikörper waren in der Lage, an den hier vorliegenden Strukturen zu binden und damit spezifisch zu markieren. In beiden Ansätzen zur Markierung konnte, wie die Abb. 3.18/19 eindeutig zeigen, bewiesen werden, dass die Fibrillen aus PrP der natürlichen Aminosäuresequenz von 23-231 bestehen.

Wie in den vorherigen Abschnitten gezeigt, aggregierte das CHO-PrP^C bei 0,0075 % SDS/250 mM NaCl nach einer Inkubationszeit von 7 Wochen vollständig zu fibrillären Strukturen, die sich aus PrP^C der natürlichen, ungekürzten Sequenz zusammensetzen. Die Aggregate zeigten drei unterschiedliche fibrilläre Strukturen (Abb.3.15/16). Den größten Anteil der Fibrillen bildeten kurze, kleine fibrilläre Aggregate. Aufgrund ihres „unscharfen“ Erscheinungsbildes, d.h. einer nicht ganz glatt abgegrenzten Struktur, werden diese Fasern als „fuzzy“ („unscharf“) oder auch „worm-like“ („Wurm-ähnlich“) bezeichnet. Diese Strukturen stellen aber keine außergewöhnliche amyloide Struktur dar. Vergleichbare amyloide Strukturen wurden auch in einer Arbeit zur Konversion vom sogenannten Hefepriion-Protein Ure2P gefunden (Schlumpberger *et al.*, 2000). Interessanter ist der Vergleich zu PrP-Fibrillen einer früheren Arbeit (Leffers *et al.*, 2005). Wie unter Kapitel 4.5 erwähnt, stellen die verwendeten Bedingungen nur eine geringfügige Anpassung der für natürliches PrP^C verwendeten Bedingungen dar (0,01 % SDS für natürliches PrP^C und 0,0075 % SDS für CHO-PrP^C). Im Vergleich zeigen sich deutliche Unterschiede in der Struktur und Ausbeute der generierten Aggregate. So wurde in der Arbeit von Leffers *et al.* nur ein kleiner Teil der Aggregate von 10-20 % als fibrilläre Strukturen identifiziert. Der Hauptteil der entstandenen Aggregate zeigte eine als amorph zu bezeichnende Struktur. Im Gegensatz dazu wurden unter der Verwendung von CHO-PrP^C fast ausschließlich kurze „fuzzy“-Fasern detektiert. Sie zeigten zwar Tendenzen zum Zusammenschluss zu glatteren größeren Überstrukturen (Abb. 3.15, markiert durch weiße Pfeile), die dann aber nicht mehr mit denen aus natürlichen PrP^C zu vergleichen waren. Nur selten konnte die Assoziation von glatten Fasern mit den „fuzzy“-Fasern aus CHO-PrP^C detektiert werden (Abb. 3.16, markiert durch schwarze Pfeile). Weil zwischen PrP^C aus Gehirnen nicht infizierter Hamster und einer CHO-Zellkultur nur die Art der Glykosylierung unterschiedlich ist, muss diese ultrastrukturelle Differenz der generierten Fibrillen in der unterschiedlichen Struktur der Glykosylierung begründet sein. CHO-PrP^C-Glykosylierungen sind größer und weiter verzweigt, so dass eine glatte Faserstruktur sterisch erschwert oder verhindert wird. Das seltene Auftreten der glatten Fasern in CHO-PrP^C könnte demnach ein Resultat einer Subfraktion von CHO-PrP^C sein, die kleinere Glykosylierungen trägt.

Da, unter der Annahme des trimeren PrP^{Sc}-Modells von Govaerts *et al.* (2004), die Glykosylierungen in einer PrP^{Sc}-Fibrille nach außen zeigen, könnte man nun vermuten, dass einige Bereiche der Aminosäuresequenz des Proteins in der Fibrille anders

strukturiert werden müssen. Desweiteren könnten auch die zusätzlichen Aminosäuren (23-89) die fibrilläre Struktur beeinflussen, wodurch das unterschiedliche Erscheinungsbild der Fasern zustande kommt. Auch kann man das PrP^{Sc}-Fibrillen-Modell zum Vergleich mit den hier generierten Fibrillen hinzuziehen. Das in der Arbeit von Govaerts *et al.* (2004, s. Kap. 1.4.3, Abb. 1.3 E) vorgeschlagene atomare Modell für die fibrilläre Struktur von PrP^{Sc} passt mit einem Querschnitt von ca. 7 bis 10 nm besser für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen rekombinanten Fibrillen (Querschnitt: ~10 nm). Das Modell bezieht sich allerdings auf das am N-Terminus verkürzte Konstrukt PrP27-30 (Aminosäuren 90-231), so dass der durchschnittliche Querschnitt der CHO-PrP^C-Fasern von ca. 10-20 nm trotzdem mit diesem Modell zu erklären ist. Da das CHO-PrP^C noch weitere 67 N-terminale Aminosäuren sowie eine Hyperglykosylierung besitzt, kann diese Differenz den größeren Querschnitt ausmachen. Ob diese strukturelle Differenz der Faserstrukturen auch einen Unterschied in der Amyloid-Kernstruktur mit sich bringt, kann aus den hier vorliegenden Daten aber nicht geschlossen werden. Eine geringfügige Veränderung der Bedingungen kann ebenfalls die Ultrastruktur von amyloiden Fibrillen stark beeinflussen. In einer Arbeit zur Fibrillogenese von β_2 -Mikroglobulin, bestimmte eine pH-Wert-Differenz von 1 (pH 3,5 vs. pH 2,5) die Aggregation zu „fuzzy“-Fasern (welche in der Arbeit von Gosal *et al.* (2005) als „worm-like“ bezeichnet wurden) oder glatten Fibrillen. Zur Ausbildung der glatten Fasern kann auch eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit führen. So wurde an A β gezeigt, dass vergleichbare Strukturen nach kürzerer Inkubationszeit auftreten, sich aber bei weiterer Inkubationszeit zu „normalen“ glatten Fasern wandeln. Daher wurden diese kürzeren Fibrillen auch als Protofibrillen bezeichnet (Goldsbury *et al.*, 2005).

4.3.3 Tierversuche mit fibrillärem CHO-PrP^C

Der einzige biologische Test für den Nachweis von PrP^{Sc} stellt im Moment der Infektiositätstest im Tierversuch dar. Für diesen Test wurden pro Tier 12 μ g fibrilläre CHO-PrP^C-Proben in transgenen Mäusen intracerebral inokuliert. Die in dieser Arbeit verwendeten transgenen Mäuse (Tg (SHaPrP+/+) 7 PrnP 0/0) exprimieren das Prion-Protein des Hamsters in einer 7fach erhöhten Menge im Vergleich zum Wildtyp-Hamster. Vergleichende Versuche mit natürlichen Prionen des Hamsters (PrP27-30) zeigen, dass die Tiere nach Inokulation von PrP27-30 nach ca. 42 Tagen erkranken

(Leffers *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu zeigen Wildtyp-Hamster bei Inokulation von vergleichbaren Mengen des Erregers erst nach 70-90 Tagen Symptome einer Prion-Erkrankung (Müller, 2006). Aufgrund der kürzeren Inkubationszeit bei gleicher Erregermenge, d.h. einer effektiveren Infizierbarkeit, wurden diese Tiere zum Tierversuch ausgewählt. Die gewählte Gesamtmenge an inokulierten fibrillären CHO-PrP (12 µg) orientierte sich an der verwendeten Menge von amyloiden PrP aus der Arbeit von Legname *et al.* (2004). In dieser Arbeit wurde rekombinantes PrP in eine amyloide Struktur konvertiert und rief nach Inokulation von ca. 12 µg amyloider Fibrillen und einer sehr langen Inkubationszeit von bis zu 680 Tagen Symptome einer Prion-Infektion hervor (Legname *et al.*, 2004). Anschließende histologische und biochemische Charakterisierung der erkrankten Tiere, konnten Prion-Ablagerungen und spongiforme Veränderungen des Nervengewebes nachweisen. Daher wurden diese Aggregate als synthetische Prionen bezeichnet.

Da die Tierversuche zur Zeit noch weiter andauern, kann nur über den heutigen Stand der Versuche berichtet werden. Schon jetzt (nach 490 Tagen Inkubation) kann davon ausgegangen werden, dass die hier generierten Strukturen nicht dem natürlichen PrP^{Sc} gleichen, da natürliche Prionen schon nach ca. 42 Tagen Krankheits-symptome auslösen. Falls die Tiere im Anschluss an diese Arbeit noch Krankheits-symptome entwickeln, stellen die CHO-PrP-Fibrillen synthetische Prionen dar, die eine sehr langsam ablaufende Prion-Erkrankung hervorrufen. Dies kann, wie schon erwähnt, an einer nicht den natürlichen Prionen entsprechenden Struktur liegen, die einen längeren Zeitraum zur autokatalytischen Vervielfältigung im Organismus benötigen. Aber auch andere Faktoren könnten eine Auswirkung auf die Inkubationszeit haben. So wird in einigen Arbeiten diskutiert, dass zur Replikation von Prionen in einem Organismus ein zellulärer Faktor, Chaperone oder Bindungspartner nötig ist (Lee *et al.*, 2003). Bei einer nicht vollständig dem PrP^{Sc} entsprechenden Konformation der CHO-PrP^C-Fibrillen könnte die Bindung dieses Faktors geschwächt oder verhindert werden und dadurch die Replikation des Erregers erschweren.

Im Fall einer negativen Aussage zur Infektiosität im Tierversuch kann es sein, dass der oben genannte Faktor keine Bindung zeigte oder ein Faktor aus der falschen Spezies ist und dadurch die Infektion verhindert worden ist. Die Speziespezifität eines Kofaktors könnte nur in vergleichbaren Experimenten mit Wildtyp-Hamstern abschließend geklärt werden. Die CHO-PrP-Fibrillen könnten aber auch eine andere Konformation von fehlgefalteten Prion-Proteinen darstellen, die nicht infektiös sind.

Dies wäre die einfachste und wahrscheinlichste Erklärung für ein negatives Resultat im Tierversuch.

5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das rekombinante Prion-Protein (90-231) über ein Monomer-Dimer Gleichgewicht zu amyloiden Fibrillen aggregiert. Das System konnte auf die Fibrillogenese von eukaryotischem CHO-PrP^C erweitert werden. Diese zeigten deutlich unterschiedliche fibrilläre Ultrastrukturen im Vergleich mit den recPrP(90-231) Fibrillen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bisher nur der Intermediärzustand der Fibrillogenese des rekombinanten Prion-Proteins charakterisiert werden. Daher könnten weiterführende Arbeiten den präamyloiden Zustand des CHO-PrP^Cs charakterisieren und mit dem des rekombinanten PrP vergleichen. Der Intermediärzustand, zunächst der des rekombinanten PrPs, könnte in weiteren Arbeiten mit Hilfe der NMR-Spektroskopie atomar aufgelöst werden, um einen detaillierteren Einblick in den Ausgangszustand der Fibrillenbildung zu bekommen. Insbesondere könnte man analysieren, welcher Teilbereich den fixierten Bereich des Dimers bildet, da der flexible Abschnitt mit Hilfe der NMR nicht aufgelöst werden kann.

Die gewonnenen Daten werden dann Aufschluss über den Einfluss der posttranslationalen Veränderung auf die ultrastrukturellen Unterschiede der Fibrillen geben. Es wäre weiterhin denkbar, dass zusätzliche Anpassung der Bedingungen (pH-Wert, Proteinkonzentration) zu „glatten“ fibrillären Strukturen des CHO-PrPs führt. Auch weiterführende strukturelle Vergleiche der CHO-PrP^C- und rekombinanten Fibrillen mittels Faserdiffraktion und Festphasen NMR (ss-NMR) würden Aufschluss über vergleichbare und unterschiedliche Strukturelemente geben, die zu den unterschiedlichen Fibrillentypen führen.

Diese Datensätze könnten dann mit denen der natürlichen Prionen verglichen werden, um mögliche Aussagen über die Korrelation von Struktur und Infektiosität treffen zu können.

6. Zusammenfassung

Prionen sind Erreger der Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE). Zu diesen Krankheiten zählen die Bovine Spongiforme Enzephalopathie, Scrapie beim Schaf und die Creutzfeld-Jakob-Erkrankung beim Menschen. Der Erreger besteht einzig und allein aus der infektiösen Isoform des wirtseigenen Prion-Proteins (PrP). Das zentrale Ereignis in der Ausbildung der infektiösen Isoform PrP^{Sc} ist eine Strukturkonversion der hauptsächlich α -helikalen, zellulären Isoform PrP^C in eine unlösliche, überwiegend β -Faltblatt-strukturierte und krankheitsassoziierte Isoform PrP^{Sc}. PrP^{Sc} ist partiell resistent gegen die Proteolyse mit Proteinase K. Nach Behandlung mit Proteinase K bildet es hochmolekulare amyloide Fibrillen aus. Die strukturelle Konversion kann anhand eines *in vitro* Konversionssystems, welches auf der Kombination des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) und NaCl basiert, nachvollzogen werden. In diesem Konversionssystem entstehen nach mehrwöchiger Inkubationszeit fibrilläre Proteinaggregate.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der präamyloide Intermediärzustand des Prion-Proteins im *in vitro* Konversionssystem näher charakterisiert werden. Analysen zur Sekundärstruktur dieses Ausgangszustandes zeigten, dass dieser neben einem α -helikalen auch einen hohen Anteil von random-coil Strukturelementen besitzt und daher als teildenaturiert bezeichnet werden kann. Der teildenaturierte Intermediärzustand liegt in einem Monomer-Dimer-Gleichgewicht vor, wie aus Messungen mittels analytischer Ultrazentrifugation hervorging. Ein chemischer Quervernetzer und eine anschließende massenspektrometrische Analyse identifizierten die molekularen Kontaktstellen des Amyloid ausbildenden Dimers. Die aus dem Konversionssystem hervorgegangenen fibrillären Aggregate weisen alle amyloid-spezifischen Charakteristika auf und zeigen darüber hinaus mit PrP^{Sc} vergleichbare biophysikalische Eigenschaften. Dazu gehören die gesteigerte Fluoreszenzausbeute bei spezifischer Bindung von Thioflavin T an die Fibrillen, Unlöslichkeit und eine gesteigerte Resistenz gegenüber der Verdauung mit Proteinase K.

Auch konnte dieses *in vitro* Konversionssystem erfolgreich auf vollständig post-translational modifiziertes PrP^C ausgeweitet werden. PrP^C wurde aus einer eukaryotischen Zellkultur aufgereinigt, welches zwei Glykosylierungen und einen GPI-Membrananker trägt. Die entstandenen amyloiden Strukturen konnten mit Hilfe der Negativkontrastierung und der Immunogold-Markierung im Elektronenmikroskop ge-

nauer charakterisiert werden. Die Fibrillen lösten im Rahmen der Untersuchungszeit keine Krankheitssymptome aus.

7. Literaturverzeichnis

- Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A., and Clarke, M. C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, 214(5090), 764-766.
- Alper, T., Haig, D. A., and Clarke, M. C. (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 22(3), 278-284.
- Apetri, A. C. and Surewicz, W. K. (2003) Atypical effect of salts on the thermodynamic stability of human prion protein. *J.Biol.Chem.*, 278(25), 22187-22192.
- Baskakov, I. V., Legname, G., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (2002) Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J.Biol.Chem.*, 277(24), 21140-21148.
- Birkmann, E., Schafer, O., Weinmann, N., Dumpitak, C., Beekes, M., Jackman, R., Thorne, L., and Riesner, D. (2006) Detection of prion particles in samples of BSE and scrapie by fluorescence correlation spectroscopy without proteinase K digestion. *Biol.Chem.*, 387(1), 95-102.
- Blochberger, T. C., Cooper, C., Peretz, D., Tatzelt, J., Griffith, O. H., Baldwin, M. A., and Prusiner, S. B. (1997) Prion protein expression in Chinese hamster ovary cells using a glutamine synthetase selection and amplification system. *Protein Eng*, 10(12), 1465-1473.
- Bocharova, O. V., Breydo, L., Parfenov, A. S., Salnikov, V. V., and Baskakov, I. V. (2005a) In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP(Sc). *J.Mol.Biol.*, 346(2), 645-659.
- Bocharova, O. V., Breydo, L., Salnikov, V. V., Gill, A. C., and Baskakov, I. V. (2005b) Synthetic prions generated in vitro are similar to a newly identified subpopulation of PrPSc from sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease. *Protein Sci.*, 14(5), 1222-1232.

- Bolton, D. C. and Bendheim, P. E. (1988) A modified host protein model of scrapie. Ciba Found.Symp., 135 164-181.
- Brown, D. R. (2003) Prion protein expression modulates neuronal copper content. J.Neurochem., 87(2), 377-385.
- 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., and Kretzschmar, H. (1997) The cellular prion protein binds copper in vivo. Nature, 390(6661), 684-687.
- Brown, D. R., Wong, B. S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S. J., and Jones, I. M. (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. Biochem.J., 344 Pt 1 1-5.
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., and Bostock, C. J. (2-10-1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. Nature, 389(6650), 498-501.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., and Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. Cell, 73(7), 1339-1347.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., and Weissmann, C. (16-4-1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. Nature, 356(6370), 577-582.
- Castilla, J., Saa, P., and Soto, C. (2005b) Detection of prions in blood. Nat.Med., 11(9), 982-985.
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., and Soto, C. (2005a) In vitro generation of infectious scrapie prions. Cell, 121(2), 195-206.
- Catharino, S., Buchner, J., and Walter, S. (2005) Characterization of oligomeric species in the fibrillization pathway of the yeast prion Ure2p. Biol.Chem., 386(7), 633-641.

- Caughey, B. and Lansbury, P. T. (2003) Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. *Annu.Rev.Neurosci.*, 26 267-298.
- Caughey, B., Kocisko, D. A., Raymond, G. J., and Lansbury, P. T., Jr. (1995) Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem.Biol.*, 2(12), 807-817.
- Chandler, R. L. (1965) An experimental mixed infection of mice with scrapie and an oncogenic virus. *J.Comp Pathol.*, 75(3), 323-326.
- Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1998) Pathologic conformations of prion proteins. *Annu.Rev.Biochem.*, 67 793-819.
- Cohen, F. E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J., and Prusiner, S. B. (1994) Structural clues to prion replication. *Science*, 264(5158), 530-531.
- Collinge, J. and Palmer, M. S. (1994) Human prion diseases. *Baillieres Clin.Neurol.*, 3(2), 241-247.
- Creutzfeldt HG (1920) Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol Psychiatry* 57: 1-18
- Cuille, J & Chelle, P.-L. (1936) La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *Comptes Rendus Acad. Sci.* 203:1552-1554
- Daggett, V. and Fersht, A. R. (2003) Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem.Sci.*, 28(1), 18-25.
- Deleault, N. R., Geoghegan, J. C., Nishina, K., Kascsak, R., Williamson, R. A., and Supattapone, S. (2005) Protease-resistant prion protein amplification reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions. *J.Biol.Chem.*, 280(29), 26873-26879.
- Deleault, N. R., Lucassen, R. W., and Supattapone, S. (2003) RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*, 425(6959), 717-720.
- Demarco, M. L. and Daggett, V. (2004) From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 101(8), 2293-2298.

- DeMarco, M. L., Silveira, J., Caughey, B., and Daggett, V. (2006) Structural Properties of Prion Protein Protofibrils and Fibrils: An Experimental Assessment of Atomic Models. *Biochemistry*, 45(51), 15573-15582.
- Demeler, B. and Saber, H. (1998) Determination of molecular parameters by fitting sedimentation data to finite-element solutions of the Lamm equation. *Biophys.J.*, 74(1), 444-454.
- Dill, K. A. and Chan, H. S. (1997) From Levinthal to pathways to funnels. *Nat.Struct.Biol.*, 4(1), 10-19.
- Dobson, C. M. (1992) Resting places on folding pathways. *Curr.Biol.*, 2(7), 343-345.
- Eigen, M. (1996) Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys.Chem.*, 63(1), A1-18.
- Elfrink K. (2005). Zelluläres Prion Protein aus CHO-Zellen: Strukturelle Umwandlung und Mechanismus der Einlagerung in raft-ähnliche Lipidmembranen. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Elfrink, K., Nagel-Steger, L., and Riesner, D. (2007) Interaction of the cellular prion protein with raft-like lipid membranes. *Biol.Chem.*, 388(1), 79-89.
- Epand, R. M. and Scheraga, H. A. (1968) The influence of long-range interactions on the structure of myoglobin. *Biochemistry*, 7(8), 2864-2872.
- Fersht, A. R., Matouschek, A., Sancho, J., Serrano, L., and Vuilleumier, S. (1992) Pathway of protein folding. *Faraday Discuss.*, (93), 183-193.
- Fezoui, Y., Hartley, D. M., Walsh, D. M., Selkoe, D. J., Osterhout, J. J., and Teplow, D. B. (2000) A de novo designed helix-turn-helix peptide forms nontoxic amyloid fibrils. *Nat.Struct.Biol.*, 7(12), 1095-1099.
- Fournier, J. G., Escaig-Haye, F., and Grigoriev, V. (2000) Ultrastructural localization of prion proteins: physiological and pathological implications. *Microsc.Res.Tech.*, 50(1), 76-88.
- Friedreich, N & Kekule, A. (1859) Zur Amyloidfrage. *Virchows. Arch. Pathol. Anat* 16:50.

- Goldsbury, C., Frey, P., Olivieri, V., Aebi, U., and Muller, S. A. (2005) Multiple assembly pathways underlie amyloid-beta fibril polymorphisms. *J.Mol.Biol.*, 352(2), 282-298.
- Gosal, W. S., Morten, I. J., Hewitt, E. W., Smith, D. A., Thomson, N. H., and Radford, S. E. (2005) Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid. *J.Mol.Biol.*, 351(4), 850-864.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (2004) Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 101(22), 8342-8347.
- Haire, L. F., Whyte, S. M., Vasisht, N., Gill, A. C., Verma, C., Dodson, E. J., Dodson, G. G., and Bayley, P. M. (2004) The crystal structure of the globular domain of sheep prion protein. *J.Mol.Biol.*, 336(5), 1175-1183.
- Harris, D. A. (2001) Biosynthesis and cellular processing of the prion protein. *Adv.Protein Chem.*, 57 203-228.
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J., and Lantos, P. (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 389(6650), 448-50, 526.
- Hope, J., Ritchie, L., Farquhar, C., Somerville, R., and Hunter, N. (1989) Bovine spongiform encephalopathy: a scrapie-like disease of British cattle. *Prog.Clin.Biol.Res.*, 317 659-667.
- Hornemann, S. and Glockshuber, R. (1998) A scrapie-like unfolding intermediate of the prion protein domain PrP(121-231) induced by acidic pH. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 95(11), 6010-6014.
- Hornemann, S., Schorn, C., and Wuthrich, K. (2004) NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO Rep.*, 5(12), 1159-1164.
- Jackson, G. S., Hosszu, L. L., Power, A., Hill, A. F., Kenney, J., Saibil, H., Craven, C. J., Waltho, J. P., Clarke, A. R., and Collinge, J. (1999) Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science*, 283(5409), 1935-1937.

- Jahn, T. R. and Radford, S. E. (2005) The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J.*, 272(23), 5962-5970.
- James, T. L., Liu, H., Ulyanov, N. B., Farr-Jones, S., Zhang, H., Donne, D. G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S. B., and Cohen, F. E. (1997) Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 94(19), 10086-10091.
- Jansen, K., Schafer, O., Birkmann, E., Post, K., Serban, H., Prusiner, S. B., and Riesner, D. (2001) Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. *Biol.Chem.*, 382(4), 683-691.
- Jarrett, J. T. and Lansbury, P. T., Jr. (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, 73(6), 1055-1058.
- Jimenez, J. L., Nettleton, E. J., Bouchard, M., Robinson, C. V., Dobson, C. M., and Saibil, H. R. (2002) The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99(14), 9196-9201.
- Kaimann T., Metzger S., Kuhlmann K., Brandt B., Hölting H.-D. and Riesner D. (zur Publikation eingereicht). Molecular Model of an α -helical Prion Protein dimer and its monomeric subunits as derived from chemical cross-linking and molecular modeling calculations
- Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S. B., and Riesner, D. (1992) Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J.Gen.Virol.*, 73 (Pt 4) 1025-1029.
- Kellings, K., Prusiner, S. B., and Riesner, D. (1994) Nucleic acids in prion preparations: unspecific background or essential component? *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, 343(1306), 425-430.
- Kimberlin, R. H. and Marsh, R. F. (1975) Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. I. Biochemical studies of brain during development of disease. *J.Infect.Dis.*, 131(2), 97-103.

- Klohn, P. C., Stoltze, L., Flechsig, E., Enari, M., and Weissmann, C. (2003) A quantitative, highly sensitive cell-based infectivity assay for mouse scrapie prions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 100(20), 11666-11671.
- Knaus, K. J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W. K., and Yee, V. C. (2001) Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat.Struct.Biol.*, 8(9), 770-774.
- Knowles, T. P. and Zahn, R. (15-8-2006) Enhanced stability of human prion proteins with two disulfide bridges. *Biophys.J.*, 91(4), 1494-1500.
- Krebs, M. R., Bromley, E. H., and Donald, A. M. (2005) The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J.Struct.Biol.*, 149(1), 30-37.
- Krebs, M. R., E. H. Bromley, and A. M. Donald 2005 The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J.Struct.Biol.* 149(1):30-37.
- Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E., and DeArmond, S. J. (1986) Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am.J.Pathol.*, 122(1), 1-5.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Bd. 227, S. 680-685.
- Landolt, H. P., Glatzel, M., Blattler, T., Achermann, P., Roth, C., Mathis, J., Weis, J., Tobler, I., Aguzzi, A., and Bassetti, C. L. (2006) Sleep-wake disturbances in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, 66(9), 1418-1424.
- Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J., and Hauw, J. J. (1996) BSE transmission to macaques. *Nature*, 381(6585), 743-744.
- Lee, K. S., Linden, R., Prado, M. A., Brentani, R. R., and Martins, V. R. (2003) Towards cellular receptors for prions. *Rev.Med.Virol.*, 13(6), 399-408.
- Lee, S. and Eisenberg, D. (2003) Seeded conversion of recombinant prion protein to a disulfide-bonded oligomer by a reduction-oxidation process. *Nat.Struct.Biol.*, 10(9), 725-730.

- Leffers, K. W., Schell, J., Jansen, K., Lucassen, R., Kaimann, T., Nagel-Steger, L., Tatzelt, J., and Riesner, D. (2004) The structural transition of the prion protein into its pathogenic conformation is induced by unmasking hydrophobic sites. *J.Mol.Biol.*, 344(3), 839-853.
- Leffers, K. W., Wille, H., Stohr, J., Junger, E., Prusiner, S. B., and Riesner, D. (2005) Assembly of natural and recombinant prion protein into fibrils. *Biol.Chem.*, 386(6), 569-580.
- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H. O., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science*, 305(5684), 673-676.
- Legname, G., Nguyen, H. O., Baskakov, I. V., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (2005) Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 102(6), 2168-2173.
- Leopold, J.G. (1759).: Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zur Landwirtschaft. Fünf Theile.- Mit Kupfer und Baurissen. Berlin, Christian Friedrich Günther: 348
- Leopold, P. E., Montal, M., and Onuchic, J. N. (1992) Protein folding funnels: a kinetic approach to the sequence-structure relationship. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 89(18), 8721-8725.
- LeVine, H., III 1993 Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.* 2(3):404-410.
- LeVine, H., III 1999 Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.* 309:274-284.
- Makarava, N., Bocharova, O. V., Salnikov, V. V., Breydo, L., Anderson, M., and Baskakov, I. V. (2006) Dichotomous versus palm-type mechanisms of lateral assembly of amyloid fibrils. *Protein Sci.*, 15(6), 1334-1341.
- Malolepsza, E., Boniecki, M., Kolinski, A., and Piela, L. (2005) Theoretical model of prion propagation: a misfolded protein induces misfolding. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 102(22), 7835-7840.

- Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1991) Alzheimer's disease: molecular basis of structural lesions. *Brain Pathol.*, 1(4), 226-227.
- McKinley, M. P., Bolton, D. C., and Prusiner, S. B. (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, 35(1), 57-62.
- McKinley, M. P., Masiarz, F. R., and Prusiner, S. B. (1981) Reversible chemical modification of the scrapie agent. *Science*, 214(4526), 1259-1261.
- McKinley, M. P., Meyer, R. K., Kenaga, L., Rahbar, F., Cotter, R., Serban, A., and Prusiner, S. B. (1991) Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *J.Virol.*, 65(3), 1340-1351.
- McParland, V. J., Kad, N. M., Kalverda, A. P., Brown, A., Kirwin-Jones, P., Hunter, M. G., Sunde, M., and Radford, S. E. (2000) Partially unfolded states of beta(2)-microglobulin and amyloid formation in vitro. *Biochemistry*, 39(30), 8735-8746.
- Mehlhorn, I., Groth, D., Stockel, J., Moffat, B., Reilly, D., Yansura, D., Willett, W. S., Baldwin, M., Fletterick, R., Cohen, F. E., Vandlen, R., Henner, D., and Prusiner, S. B. (30-4-1996) High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry*, 35(17), 5528-5537.
- Meyer, R. K., Lustig, A., Oesch, B., Fatzer, R., Zurbriggen, A., and Vandevelde, M. (2000) A monomer-dimer equilibrium of a cellular prion protein (PrPC) not observed with recombinant PrP. *J.Biol.Chem.*, 275(48), 38081-38087.
- Müller H. (2006) Inaktivierung von Prionen unter Bedingungen industrieller oleochemischer Prozesse. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Naiki, H., Higuchi, M., Hosokawa, and T. Takeda 1989 Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal.Biochem.* 177(2):244-249.
- Naslavsky, N., Stein, R., Yanai, A., Friedlander, G., and Taraboulos, A. (1997) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J.Biol.Chem.*, 272(10), 6324-6331.

- Nelson, R. and Eisenberg, D. (2006) Structural models of amyloid-like fibrils. *Adv. Protein Chem.*, 73 235-282.
- Niraula, T. N., Konno, T., Li, H., Yamada, H., Akasaka, K., and Tachibana, H. (2004) Pressure-dissociable reversible assembly of intrinsically denatured lysozyme is a precursor for amyloid fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(12), 4089-4093.
- Novitskaya, V., Bocharova, O. V., Bronstein, I., and Baskakov, I. V. (2006) Amyloid fibrils of mammalian prion protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons. *J. Biol. Chem.*, 281(19), 13828-13836.
- O.I.E. (World Organisation for Animal Health):
http://www.oie.int/eng/info/en_esbincidence.htm
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E., and . (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40(4), 735-746.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., and . (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90(23), 10962-10966.
- Pan, K. M., Stahl, N., and Prusiner, S. B. (1992) Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Protein Sci.*, 1(10), 1343-1352.
- Pastrana, M. A., Sajani, G., Onisko, B., Castilla, J., Morales, R., Soto, C., and Requena, J. R. (2006) Isolation and Characterization of a Proteinase K-Sensitive PrP(Sc) Fraction. *Biochemistry*, 45(51), 15710-15717.
- Pickart, C. M. and Cohen, R. E. (2004) Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5(3), 177-187.
- Polverino de, Laureto P., Taddei, N., Frare, E., Capanni, C., Costantini, S., Zurdo, J., Chiti, F., Dobson, C. M., and Fontana, A. (2003) Protein aggregation and amyloid fibril formation by an SH3 domain probed by limited proteolysis. *J. Mol. Biol.*, 334(1), 129-141.

- Post, K., Brown, D. R., Groschup, M., Kretzschmar, H. A., and Riesner, D. (2000) Neurotoxicity but not infectivity of prion proteins can be induced reversibly in vitro. *Arch.Virol.Suppl.*,(16), 265-273.
- Post, K., Pitschke, M., Schafer, O., Wille, H., Appel, T. R., Kirsch, D., Mehlhorn, I., Serban, H., Prusiner, S. B., and Riesner, D. (1998) Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. *Biol.Chem.*, 379(11), 1307-1317.
- Priola, S. A., Caughey, B., Wehrly, K., and Chesebro, B. (1995) A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP. *J.Biol.Chem.*, 270(7), 3299-3305.
- Priola, S. A., Caughey, B., Wehrly, K., and Chesebro, B. (1995) A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP. *J.Biol.Chem.*, 270(7), 3299-3305.
- Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542), 136-144.
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Bolton, D. C., Kent, S. B., and Hood, L. E. (1984) Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell*, 38(1), 127-134.
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D., Pan, K. M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., Carlson, G. A., and . (1990) Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*, 63(4), 673-686.
- Rangachari, V., Reed, D. K., Moore, B. D., and Rosenberry, T. L. (2006) Secondary structure and interfacial aggregation of amyloid-beta(1-40) on sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry*, 45(28), 8639-8648.
- Rezaei, H., Choiset, Y., Eghiaian, F., Treguer, E., Mentre, P., Debey, P., Grosclaude, J., and Haertle, T. (2002) Amyloidogenic unfolding intermediates differentiate sheep prion protein variants. *J.Mol.Biol.*, 322(4), 799-814.

- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., and Wuthrich, K. (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature*, 382(6587), 180-182.
- Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, H., Groth, D., Baldwin, M. A., and Prusiner, S. B. (1996) Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *J.Virol.*, 70(3), 1714-1722.
- Riesner, D., Kellings, K., Wiese, U., Wulfert, M., Mirenda, C., and Prusiner, S. B. (1993) Prions and nucleic acids: search for "residual" nucleic acids and screening for mutations in the PrP-gene. *Dev.Biol.Stand.*, 80 173-181.
- Saborio, G. P., Permanne, B., and Soto, C. (2001) Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, 411(6839), 810-813.
- Safar, J. G., Kellings, K., Serban, A., Groth, D., Cleaver, J. E., Prusiner, S. B., and Riesner, D. (2005) Search for a prion-specific nucleic acid. *J.Virol.*, 79(16), 10796-10806.
- Sambrook J, Gething MJ. Protein structure. Chaperones, paperones. *Nature*. (1989) Nov 16;342(6247):224-5.
- Schlumpberger, M., Wille, H., Baldwin, M. A., Butler, D. A., Herskowitz, I., and Prusiner, S. B. (2000) The prion domain of yeast Ure2p induces autocatalytic formation of amyloid fibers by a recombinant fusion protein. *Protein Sci.*, 9(3), 440-451.
- Scott MR, Groth D, Tatzelt J, Torchia M, Tremblay P, DeArmond SJ, Prusiner SB. (1997) Propagation of prion strains through specific conformers of the prion protein. *J.Virol.* 71(12):9032-9044.
- Sekijima, M., Motono, C., Yamasaki, S., Kaneko, K., and Akiyama, Y. (2003) Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein: insight into dynamics and properties. *Biophys.J.*, 85(2), 1176-1185.

- Singer, S. J. and Dewji, N. N. (2006) Evidence that Perutz's double-beta-stranded subunit structure for beta-amyloids also applies to their channel-forming structures in membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 103(5), 1546-1550.
- Smith, D. P., Jones, S., Serpell, L. C., Sunde, M., and Radford, S. E. (2003) A systematic investigation into the effect of protein destabilisation on beta 2-microglobulin amyloid formation. *J.Mol.Biol.*, 330(5), 943-954.
- Soderberg, L., Dahlqvist, C., Kakuyama, H., Thyberg, J., Ito, A., Winblad, B., Naslund, J., and Tjernberg, L. O. (2005) Collagenous Alzheimer amyloid plaque component assembles amyloid fibrils into protease resistant aggregates. *FEBS J.*, 272(9), 2231-2236.
- Soto, C. (2003) Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat.Rev.Neurosci.*, 4(1), 49-60.
- Speare, J. O., Rush, T. S., III, Bloom, M. E., and Caughey, B. (2003) The role of helix 1 aspartates and salt bridges in the stability and conversion of prion protein. *J.Biol.Chem.*, 278(14), 12522-12529.
- Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K., and Prusiner, S. B. (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, 51(2), 229-240.
- Stefani, M. and Dobson, C. M. (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *J.Mol.Med.*, 81(11), 678-699.
- Steinitz, M. and S. Tamir (1995) An improved method to create nitrocellulose particles suitable for the immobilization of antigen and antibody. *J.Immunol.Methods* 187(1):171-177.
- Stöhr, J. (2003). Möglichkeiten der Fibrillenbildung on rekombinanten Prion-Proteinen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Supattapone, S. (2004) Prion protein conversion in vitro. *J.Mol.Med.*, 82(6), 348-356.
- Swietnicki, W., Morillas, M., Chen, S. G., Gambetti, P., and Surewicz, W. K. (2000) Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP90-231. *Biochemistry*, 39(2), 424-431.

- Tattum, M. H., Cohen-Krausz, S., Thumanu, K., Wharton, C. W., Khalili-Shirazi, A., Jackson, G. S., Orlova, E. V., Collinge, J., Clarke, A. R., and Saibil, H. R. (2006) Elongated oligomers assemble into mammalian PrP amyloid fibrils. *J.Mol.Biol.*, 357(3), 975-985.
- Taylor, J. P., Hardy, J., and Fischbeck, K. H. (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, 296(5575), 1991-1995.
- Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A., and Manson, J. C. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, 380(6575), 639-642.
- Torrent, J., varez-Martinez, M. T., Heitz, F., Liautard, J. P., Balny, C., and Lange, R. (2003) Alternative prion structural changes revealed by high pressure. *Biochemistry*, 42(5), 1318-1325.
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G., Taraboulos, A., and Prusiner, S. B. (1996) Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93(25), 14945-14949.
- Waggoner, D. J., Drisaldi, B., Bartnikas, T. B., Casareno, R. L., Prohaska, J. R., Gitlin, J. D., and Harris, D. A. (2000) Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J.Biol.Chem.*, 275(11), 7455-7458.
- Weinmann N. (2006) Zellextraktfreie Amplifikation der pathologischen Konformation des Prionproteins. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
- Welker, E., Raymond, L. D., Scheraga, H. A., and Caughey, B. (2002) Intramolecular versus intermolecular disulfide bonds in prion proteins. *J.Biol.Chem.*, 277(36), 33477-33481.
- Wilesmith, J. W. (1988) Bovine spongiform encephalopathy. *Vet.Rec.*, 122(25), 614
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., and Smith, P. G. (1996) A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, 347(9006), 921-925.

- Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A., and Prusiner, S. B. (2002) Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 99(6), 3563-3568.
- Xiong, L. W., Raymond, L. D., Hayes, S. F., Raymond, G. J., and Caughey, B. (2001) Conformational change, aggregation and fibril formation induced by detergent treatments of cellular prion protein. *J.Neurochem.*, 79(3), 669-678.
- Young, J. C., Agashe, V. R., Siegers, K., and Hartl, F. U. (2004) Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 5(10), 781-791.
- Zou, W. Q., Capellari, S., Parchi, P., Sy, M. S., Gambetti, P., and Chen, S. G. (2003) Identification of novel proteinase K-resistant C-terminal fragments of PrP in Creutzfeldt-Jakob disease. *J.Biol.Chem.*, 278(42), 40429-40436.