

Einfluss von Faltungshilfen auf die *in vitro*-Konversion
von natürlichem und rekombinantem Prion-Protein aus
prokaryotischen und eukaryotischen Zellkulturen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jens Schell

aus Ratingen (Kreis Mettmann)

Düsseldorf 2001

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatter: Prof. Dr. D. Riesner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. W. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Dezember 2001

Druck und Einband: Druckerei Nowée GmbH, Düsseldorf

Meiner Familie
Mijn Familie

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Riesner, der die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat. Sein Interesse und seine Diskussionsbereitschaft haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, ohne dabei eigene Ideen oder Vorstellungen zu beschneiden. Der regelmäßige direkte Erfahrungsaustausch mit anderen Forschungsgruppen wird durch ihn nicht nur unterstützt, sondern explizit gefördert, was wiederum unsere Selbstständigkeit förderte.

My sincere thank is given to Prof. S. B. Prusiner, University of California, San Francisco, who made it possible for me to work in his laboratory. Also, I would like to thank his colleagues for a nice and instructive time. In particular, Ana Serban and her prep-team for their introduction into handling and clues of CHO-tissue-culture. A special "Thanx" to Helen Lam, who made me feel home in San Francisco.

Die „Gründer“ der Prion-Gruppe, Frau Dr. Karin Post und Herrn Dr. M. Pitschke, haben alle Neuen immer freundlich aufgenommen und eine hervorragende Arbeitsatmosphäre geschaffen. Neben ihren Tipps und Anregungen gilt mein Dank auch der Aufbauarbeit in „frustigen“ Zeiten.

Die mittlerweile stark gewachsene Prion-Gruppe hat es geschafft, die hervorragende Arbeitsatmosphäre fortzusetzen. Neben der fruchtbaren wissenschaftlichen Zusammenarbeit ist ihr vor allem für die außeruniversitären Aktivitäten zu danken, die für den erforderlichen Ausgleich und Abstand zur Arbeit gesorgt haben. Namentlich möchte ich hier nur Katja, Olli und Christian hervorheben, da sie mich fast während meiner gesamten Arbeit begleitet haben. Auch Elfi möchte ich für die sehr schöne Zusammenarbeit bei der Etablierung der PrP^C-Aufreinigung danken.

Danken will ich auch allen anderen Institutsangehörigen, die immer für eine sehr angenehme Atmosphäre im Institut gesorgt haben. Wenn auch nicht immer wegen der Arbeit, so bin ich immer sehr gerne zur Arbeit gegangen – mehr muss ich wohl dazu nicht sagen. Hierbei möchte ich insbesondere Sandra Klümper, mit der ich gemeinsam im Institut gestartet bin, und Andreas Fels, der meine ersten Schritte im Institut betreute, hervorheben.

Den „Dienstleistern“ des Institutes (Elke, Bernd, Frau Beckmann, Frau Greschkowitz und Frau Gruber, sowie der gesamten Rechnergruppe) möchte ich für die alltäglichen und besonderen Arbeitserleichterung danken. Oft Kleinigkeiten, die erst bemerkt werden wenn man sie selber machen muss.

Den Kollegiatinnen/en und Stipendiatinnen/en unseres „Neuro-Kollegs“ gilt ein ganz besonderer Dank. Durch ihre/unsere Aktivität wurde das Kolleg zu einer besonders wertvollen Veranstaltung. Nach Borkum und Strassburg konnte uns auch eine Begutachtung (alles Gute Ruth) nichts mehr anhaben.

Allen anderen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und die ich dennoch hier vergessen habe, nur noch ein kurzes:

Danke

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	IV-V
1 Einleitung	1
1.1 Prion-Erkrankungen	1
1.1.1 Die Natur des Erregers:	3
Das Prion-Modell	3
Prion-Stämme	5
Artenbarriere	6
1.1.2 Replikationsmodelle	6
1.1.3 Die zelluläre Isoform: PrP ^C	8
1.1.4 <i>In vitro</i> -Konversion	10
1.2 Chemische und molekulare Faltungshilfen	12
1.2.1 Chemische Chaperone	12
1.2.2 Molekulare Chaperone	14
1.3 Prion-Infektion und Chaperone	16
1.4 Aufgabenstellung	18
2 Materialien:	20
2.1 Allgemeines zu Chemikalien und Lösungen	20
2.2 Puffer und Lösungen	20
2.3 Chinesische Hamster Ovarien-Zellkultur	21
2.3.1 Glutamin-Synthetase Expressionssystem	22
2.4 Prion-Proteine	23
2.4.1 Rekombinante Prion-Proteine	23
2.4.2 <i>Natürliche</i> Prion-Proteine	23
PrP27-30 (Prion-Stäbchen)	23
Hamster-Hirn PrP ^C	23
2.5 Molekulares Chaperon GroEL/ES	24
2.6 Kontrollproteine	24
2.7 Antikörper	24

3	Methoden.....	25
3.1	Aufarbeitung der lyophilisierten rekombinanten Prion-Proteine.....	25
3.2	Solubilisierung von PrP ²⁷⁻³⁰	26
3.3	Aufreinigung des CHO-PrP ^C	26
3.3.1	CHO-Zellkultur.....	26
3.3.2	Zellyse.....	27
3.3.3	Kupfer- immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)	28
3.3.4	3F4-Antikörper-Affinitäts-Chromatographie.....	29
3.3.5	Aufkonzentrierung und Umpufferungen.....	30
3.4	Induktion der <i>in vitro</i> -Aggregation	30
3.5	Solubilisierungsspin	30
3.6	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	31
3.6.1	Prinzip der FCS-Messung	31
3.6.2	Messung mehrerer Komponenten	33
3.6.3	Fluoreszenzmarkierung von Proteinen für die FCS Messungen.....	34
3.7	Circular-Dichroismus-Spektroskopie.....	36
3.8	Proteinase K-Verdauung	37
3.9	Proteingelelektrophorese	37
3.9.1	Silberfärbung.....	38
3.9.2	Coomassie-Färbung	39
3.10	Blotting-Techniken.....	39
3.10.1	Semi-Dry-Blot.....	39
3.10.2	Dot-Blot	40
3.11	Immunologischer Proteinnachweis	40
4	Ergebnisse	42
4.1	Aufreinigung von CHO-PrP ^C	42
4.1.1	Zellyse und Solubilisierung des CHO-PrP ^C	43
4.1.2	Chromatographische Aufreinigung des CHO-PrP ^C	44

4.2	<i>In vitro</i> -Konversion verschiedener Prion-Proteine	47
4.2.1	Löslichkeit rekombinanter Prion-Proteine.....	48
4.2.2	<i>In vitro</i> -Konversion rekombinanter Prion-Proteine.....	50
4.2.3	Natürliche Prion-Proteine	52
4.3	Einfluss chemischer Chaperone auf die <i>in vitro</i> -Konversion	55
4.3.1	Löslichkeit von recPrP	55
4.3.2	Beeinflussung der Aggregationskinetik.....	56
4.4	Abhängigkeit der <i>in vitro</i> -Konversion von den Pufferbedingungen	59
4.5	Einfluss des molekularen Chaperons GroEL auf die <i>in vitro</i> -Konversion	63
4.5.1	Inhibierung der Aggregation in Natrium-Phosphat-Puffer.....	63
4.5.2	Inhibierung der Aggregation in Freisetzungspuffer	67
4.5.3	Freisetzung von GroEL	68
4.5.4	Faltung durch GroEL/ES ist nicht möglich	71
4.5.5	Charakterisierung der Aggregate.....	72
4.6	Kann GroEL/ES auch mit natürlichem PrP ^C wechselwirken ?	74
5	Diskussion	77
5.1	Die <i>in vitro</i> -Konversion des Prion-Proteins.....	77
5.1.1	<i>In vitro</i> Konversion des recPrP(29-231).....	78
5.1.2	<i>In vitro</i> Konversion von natürlichem PrP ^C	79
5.1.3	Was kann das SDS-abhängige <i>in vitro</i> -Konversionssystem leisten ?	81
5.2	Einfluss von Faltungshilfen auf die <i>in vitro</i> -Konversion	82
5.2.1	Chemische Chaperone	82
5.2.2	Das molekulare Chaperon GroEL	84
5.2.3	Prion-Erkrankungen und Chaperone	86
5.3	Warum wurde bisher <i>in vitro</i> keine neue Infektiosität generiert?	89
5.4	Ausblick	90
6	Zusammenfassung.....	93
7	Literaturverzeichnis.....	95
	Nomenklatur der verwendeten Prion-Proteine	108

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxid
AS	Aminosäure
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CD	Circular Dichroismus
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (engl. Creutzfeldt-Jakob-disease)
Cy2	FluoroLink™Cy2™
Da	Dalton
DOC	Desoxycholat
DMSO	Dimethylsulfoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
x g	x-fache Erdbeschleunigung
G + A	Glutamat und Asparagin
GdnHCl	Guanidinium-Hydrochlorid
Gl.	Gleichung
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom
H ₂ O _{autok}	autoklaviertes, deionisiertes Wasser
H ₂ O _{deion}	deionisiertes Wasser
IMAC	immobilisierende Metall-Chelat-Affinitätschromatographie
MOPBS	20 mM MOPS-Puffer mit Natriumchlorid (Buffer Sodium)
MOPS	0,2 M 3-(N-Morpholino)-Propan-Sulfonsäure, pH 7,0
MSX	L-Methionin Sulfoximin
MW	Molekulargewicht (engl. molecular weight)
NaP _i	Natriumphosphat-Puffer, pH 7,2
NMR	Kernmagnetische Resonanz (engl. nuclear magnetic resonance)
P	Pellet
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffer Sodium

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PK	Proteinase K
ProtA	Protein A
ProtG	Protein G
PrP	Prion-Protein
PrP ^C	zelluläres Prion-Protein
PrP ^{Sc}	Scrapie-Isoform des Prion-Proteins
R6G	Rhodamin 6 G
recPrP	rekombinantes Prion-Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute
S	Überstand (engl. supernatant)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
solPrP27-30	Solubilisiertes PrP27-30
TBST	Tris Buffer Sodium Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMAO	Trimethylaminoxid
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
vCJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
Zw 3-12	Zwittergent 3-12
ε	Extinktionskoeffizient
λ	Wellenlänge

1 Einleitung

1.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSEs) sind eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen. Sie treten in Säugetieren auf. Im Gegensatz zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimerschen Krankheit oder Chorea Huntington, treten TSEs nicht nur sporadisch oder genetisch bedingt auf, sondern können außerdem durch Infektionen hervorgerufen werden.

Nach einer langen Inkubationszeit kommt es durch die Neurodegeneration zu Bewegungs- und Koordinationsstörungen (Ataxien), die mit zunehmender Demenz einhergehen. Histopathologisch sind schwammartige (spongiforme) Veränderungen der grauen Hirnsubstanz durch Vakuolisierung des Neuropils und Verlust von Neuronen zu beobachten, die mit einer Astrozytose verbunden sind (DeArmond & Ironside, 1999). In der Regel findet man bei TSE diffuse Proteinablagerungen, die teilweise amyloide Plaques bilden (ca. 5 % der Creutzfeldt-Jakob-Patienten, Belay *et al.*, 1999). Alle transmissiblen spongiformen Enzephalopathien verlaufen tödlich. Die wichtigsten TSEs sind mit ihrem Ursprung in Tabelle 1.1 zusammengestellt. TSEs werden heute auch aufgrund ihres Molekularen Ursprungs als Prion-Erkrankungen bezeichnet (siehe Kap. 1.1.1).

Tabelle 1.1 Überblick über die wichtigsten Prion-Erkrankungen:

Krankheit	Manifestation	Wirt	Erstmals beschrieben
Scrapie (Traberkrankheit)	sporadisch, infektiös	Schaf, Ziege	1759, J.G. Leopold,
Creutzfeldt-Jakob- Erkrankung (CJD)	sporadisch, genetisch, infektiös	Mensch	1920 H.G. Creutzfeldt, 1921 A. Jakob,
Gerstmann-Sträussler- Scheinker-Syndrom (GSS)	genetisch, sporadisch	Mensch	1936, J.G. Gerstmann <i>et al.</i>
Kuru	infektiös	Mensch	1957, V. C. Gajduksek, & V. Zigas
Fatale familiäre Insomnie (FFI)	genetisch	Mensch	1986, E. Lugaresi <i>et al.</i>
Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE)	infektiös	Rind	1987, G.A.H. Wells <i>et al.</i>
Neue Variante der CJD (vCJD)	infektiös	Mensch	1996, R. G. Will <i>et al.</i>

Die häufigste beim Menschen auftretende Prion-Erkrankung ist die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD), die bereits 1920/1921 (Creutzfeldt; Jakob) beschrieben wurde. Mit einer Inzidenz von etwa einem Fall auf eine Millionen Einwohner ist sie eine sehr seltene Erkrankung. Sie tritt in 85 % der Fälle sporadisch, d.h. ohne eine erkennbare Ursache, auf. In 5 – 15 % konnte eine genetische (familiäre CJD) und in weniger als 1 % der Fälle eine infektiöse Korrelation nachgewiesen werden. Letztere werden auch als iatrogene CJD bezeichnet, da sie durch unzureichend sterilisierte neurochirurgische Instrumente bei medizinischen Eingriffen, bei Dura Mater Transplantationen oder nach Gabe von menschlichen Wachstumshormonen, übertragen wurden (zum Überblick Belay *et al.*, 1999).

Die älteste beschriebene Prion-Erkrankung, die Traberkrankheit oder Scrapie bei Schafen und Ziegen, wurde bereits 1759 beschrieben (Leopold). Sie konnte unter anderem auf Mäuse (Chandler, 1961) und auf den Syrischen Goldhamster (Marsh & Kimberlin, 1975) experimentell übertragen werden. Diese auf Maus bzw. Hamster adaptierten Scrapie-Erreger werden heute meist als Modellsystem in der Grundlagenforschung verwendet.

Seit Ende der 80er Jahre gewannen Prion-Erkrankungen durch das Auftreten der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE) in Großbritannien auch ökonomisch an Bedeutung. Durch eine technische Umstellung in der Tiermehlproduktion und die Verfütterung des Tiermehls an Wiederkäuer wurde sehr wahrscheinlich der Scrapie-Erreger auf Rinder übertragen (Wilesmithe & Wells, 1991). Nach dem Verbot der Verfütterung von Tiermehl an Wiederkäuer (1988) ging die Zahl der BSE-Fälle pro Jahr in Großbritannien seit 1992 kontinuierlich zurück. Da jedoch die Fallzahlen noch immer nicht gegen Null gehen, können derzeit zusätzliche Übertragungswege nicht ausgeschlossen werden. Parallel zu BSE traten TSEs bei verschiedenen Zootieren auf, die sehr wahrscheinlich auch auf die Verfütterung von kontaminiertem Tiermehl zurückzuführen sind (Wells & McGill, 1992; Bons *et al.*, 1996).

Das Auftreten einer neuen Prion-Erkrankung beim Menschen, der varianten CJD (vCJD), im Jahre 1996 wird in Zusammenhang mit BSE gesehen (Will, 1996; Collinge, 1999). Bis einschließlich Juli 2001 waren 106 (98 bestätigt, 8 wahrscheinliche) Patienten in Großbritannien (zwei weitere in Frankreich) erkrankt (Quelle: Regierung Großbritannien <http://www.doh.gov.uk/CJD/stats>). Diese neue Variante tritt im Gegensatz zu den sporadischen und familiären Prion-Erkrankungen verstärkt bei jüngeren Menschen auf (Tabelle 1.2). Zudem unterscheidet sie sich in den Symptomen von der sporadischen CJD, und der Krankheitsverlauf ist mit durchschnittlich 15 Monaten etwa doppelt so lang (Ironsides, 1998). Werden Makaken intracerebral mit BSE und vCJD-Erregern infiziert, so unterscheiden

sich die Läsionsmuster nicht voneinander. Im Gegensatz dazu sind die Läsionsmuster von mit CJD-Erregern infizierten Tieren deutlich unterschiedlich (Lasmézas *et al.*, 1996). Auch das Glykosylierungsmuster des Erregers der vCJD unterscheidet sich nicht von dem des BSE-Erregers (Collinge *et al.*, 1996; Kapitel 1.1.3). Alle bisher erkrankten vCJD-Patienten waren homozygot für Methionin im Codon 129 des Prion-Proteins, während in der normalen kaukasischen Bevölkerung nur etwa 37 % diesen Genotyp tragen (Owen *et al.*, 1990; Deslys *et al.*, 1994)¹. Dies spricht für eine unterschiedliche, genetisch bedingte Anfälligkeit im Zusammenhang mit dem Codon 129. Rinder zeigen diesen Polymorphismus im Codon 129 nicht, sie tragen homozygot Methionin (Schätzl *et al.*, 1997). Daraus kann aber derzeit nicht geschlossen werden, dass die anderen Genotypen nicht an vCJD erkranken, da die Inkubationszeiten auch bei iatrogener CJD mit dem Genotyp variierten (Deslys *et al.*, 1996). Bei sporadischer CJD mit 89 % (Palmer *et al.*, 1991) und bei iatrogener CJD mit 92 % (Brown *et al.*, 1994; Deslys *et al.*, 1996) wurde ebenfalls eine Häufung von homozygoten Patienten gefunden. Deshalb kann zur Zeit nur auf eine geringe genetische Prädisposition, nicht aber auf einen totalen Schutz, geschlossen werden.

Tabelle 1.2 Vergleich der sporadischen und varianten CJD:

Symptome	sporadische CJD	variante CJD
Alter bei Ausbruch	> 60 Jahre	Ø 28 Jahre
Krankheitsdauer	Ø 7 Monate	Ø 15 Monate
psychische Symptome	keine	oft die ersten Symptome
Ataxien	ja	i.d.R. erst nach 6 Monaten
Demenz	ja	meist erst im späteren Verlauf
EEG Veränderungen	period. Spitze-Wellen-Komplexe	keine
Neuropathologie	diffuse Ablagerungen	floride Plaques (ähnl. zu Kuru)

Anm.: Familiäre und iatrogene Erkrankungen manifestieren sich teilweise auch unterschiedlich. Das Durchschnittsalter gegenüber der sporadischen CJD ist ebenfalls herabgesetzt. (Belay *et al.*, 1999)

1.1.1 Die Natur des Erregers:

Das Prion-Modell

Die Erreger der Prion-Erkrankungen zeichnen sich durch eine enorme Resistenz gegen bekannte Deaktivierungsmethoden für Krankheitserreger aus. So konnte bereits 1967 gezeigt werden, dass Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm), die jedes bekannte Virus inaktiviert, keinen messbaren Einfluss auf die Infektiosität von Scrapie-Erregern hatte (Alper *et al.*, 1967).

¹ Keine absolute Regel, da regionale Unterschiede möglich sind. In Japan sind nur etwa 8 % der Bevölkerung heterozygot (Doh-ura *et al.*, 1991)

Allgemein gilt, Behandlungsmethoden, die Nukleinsäuren zerstören, inaktivieren den Erreger nicht (Prusiner *et al.*, 1980; McKinley *et al.*, 1983a). Methoden, die dagegen Proteine denaturieren, können sehr wohl den Erreger deaktivieren (Prusiner *et al.*, 1981; Prusiner *et al.*, 1982a). Die Aufreinigung des Erregers zeigte zudem, dass er überwiegend aus Protein besteht (Prusiner *et al.*, 1980; 1982b).

Aufgrund dieser Tatsachen prägte S.B. Prusiner den Begriff Prion (frei nach **proteinartiges, infektiöses Partikel**), der im folgenden als Synonym für den Erreger verwendet wird (Prusiner, 1982c). Nach dem von ihm aufgestellten Prion-Modell besteht der Erreger überwiegend, wenn nicht gar ausschließlich aus Protein. Dass Prionen sich dennoch replizieren können widersprach aber der gängigen wissenschaftlichen Meinung. Für sein Prion-Modell erhielt S.B. Prusiner 1997 den Nobel-Preis für Medizin.

Hochaufgereinigte infektiöse Partikel, sogenannte Prionstäbchen bestehen fast ausschließlich aus einem Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 27-30 kDa, das Prion-Protein (PrP₂₇₋₃₀) genannt wurde (Prusiner *et al.*, 1982b; McKinley *et al.* 1983b). Spätere Arbeiten zeigten, dass es sich bei PrP₂₇₋₃₀ um ein wirtseigenes Protein (Oesch *et al.*, 1985; Kapitel 1.1.3) handelt, das im Zuge der Aufreinigung N-terminal verkürzt wurde. Die infektiösen Isoformen (PrP^{Sc} und PrP₂₇₋₃₀) unterscheiden sich in ihren biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von dem wirtseigenen, nicht-infektiösem PrP (Tabelle 1.3). Neben dem Prion-Protein konnten bisher nur Lipide (Klein *et al.*, 1998) und Zucker (Dumpitak, 1998; Appel *et al.*, 1999) als weitere Bestandteile nachgewiesen werden, wobei ein Zusammenhang mit der Infektiosität bisher nicht gezeigt werden konnte. Spezifische Nukleinsäuren, wie sie nach allgemeinen Vorstellungen der Replikation von Erregern zu erwarten wären, wurden trotz intensiver Bemühungen bis heute nicht gefunden. Darüber hinaus wurden Nukleinsäuren größer als 80 Nukleotide sogar als notwendiger Bestandteil einer infektiösen Einheit ausgeschlossen (Kellings *et al.*, 1992; Kellings *et al.*, 1994).

Tabelle 1.3 Eigenschaften der unterschiedlichen PrP-Isoformen (PrP^{Sc}, PrP^C, PrP 27-30):
(nach Pitschke, 1999)

Eigenschaft	Zelluläre Isoform (PrP ^C)	Scrapie Isoform (PrP ^{Sc} und PrP ₂₇₋₃₀)
Infektiosität	nicht infektiös	infektiös
Protease K-Sensitivität	vollständig abbaubar	C-terminal resistent
Sekundärstruktur	α- helikal	β-Faltblatt - und α-Helix-Anteile
Löslichkeit	löslich	unlöslich
Aggregationszustand	Monomer	hochmolekulare Aggregate

Das Prion-Modell (zum Überblick Prusiner, 1999b) geht somit davon aus, dass der Erreger fast vollständig, wenn nicht ausschließlich aus der krankhaften Isoform des Prion-Proteins (PrP^{Sc}) besteht. Durch Interaktion mit der zellulären Form (PrP^C) katalysiert es die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} und damit die Replikation des Erregers (Details Kapitel 1.1.2). Dies widerspricht dem zentralen Dogma der Molekularbiologie, dass der genetische Informationsfluss von der DNA über die RNA zum Protein verläuft. Ein Erreger wäre in der Lage, sich ohne eigene Nukleinsäure zu replizieren.

Gegner des Prion-Modells treten auch heute noch für die Virus- bzw. Virino-Hypothese (Diringer *et al.*, 1994; Farquhar *et al.*, 1998) ein. Danach trägt ein kleines Molekül, sehr wahrscheinlich eine kleine, nicht translatierte Nukleinsäure, die genetische Information und wird durch Proteinaggregate geschützt. Häufigstes Argument für die Virus-Hypothese ist das Auftreten verschiedener Prion-Stämme, obwohl trotz intensivster Bemühungen noch keine spezifische Nukleinsäure isoliert werden konnte. Insgesamt stützen die experimentellen Ergebnisse stark das Prion-Modell, auch wenn es bis heute noch nicht bewiesen werden konnte und einige Eigenschaften von Prion-Erkrankungen noch nicht richtig verstanden sind.

Prion-Stämme

Das Auftreten verschiedener Prion-Stämme ist ein, wenn nicht gar das wichtigste, Argument der Prion-Gegner. So wiesen Feldisolate von verschiedenen Scrapie-infizierten Schafen unterschiedliche Charakteristika auf (Pattison & Millson, 1961). Prion-Stämme können sich in ihren Inkubationszeiten, ihrem PK-resistentem Fragment, ihrem Glykosylierungsmuster (Kapitel 1.1.3) oder ihrer Neuropathologie unterscheiden (Dickinson *et al.*, 1968; Bruce *et al.*, 1991; Collinge *et al.*, 1996; Safar *et al.*, 1998). Bei der menschlichen CJD werden ebenfalls Typisierungen aufgrund dieser Eigenschaften vorgenommen (Collinge *et al.*, 1996; Parchi *et al.*, 1996). Diese Stammspezifitäten bleiben auch bei einem genetisch identischen Hintergrund erhalten (Bruce *et al.*, 1992) und werden daher oft einem codierenden Element, z.B. einer Nukleinsäure, zugeschrieben. Im Rahmen des Prion-Modells wird versucht sie auf unterschiedliche Konformationen der Prionen zurückzuführen. Die Konformation der infizierenden Prionen gibt dann die Konformation der replizierten Prionen vor. Strukturelle Unterschiede zwischen verschiedenen Prion-Stämmen könnten so die unterschiedliche Resistenz, bezogen auf die Gesamtstabilität und die Größe des resistenten Cores, erklären (Safar *et al.*, 1998).

Artenbarriere

Die Tatsache, dass sich Prionen teilweise nur schwer von einer Spezies auf eine andere übertragen lassen, wird als Artenbarriere bezeichnet. Diese äußert sich in einer verlängerten Inkubationszeit im Vergleich zu weiteren Übertragungen innerhalb einer Spezies. Sie wird laut Prion-Modell durch eine ineffizientere PrP^{Sc}-Bildung nicht homologer PrP-Moleküle aufgrund von Sequenzunterschieden erklärt (Prusiner *et al.*, 1990). Mäuse zeigten bei Infektion mit Hamster-Prionen nur selten Symptome (Scott *et al.*, 1989; Priola *et al.*, 1999). Transgene Mäuse, die die Hamster-Sequenz exprimieren, erkrankten dagegen sehr schnell (Scott *et al.*, 1989). Durch Expression chimärer Prion-Proteine konnte der Interaktionsbereich zwischen den Molekülen auf die Aminosäuren 112-187 eingegrenzt werden (Scott *et al.*, 1992; Priola & Chesebro, 1995). Teilweise reicht der Austausch einer einzelnen Aminosäure aus, um eine Resistenz oder Suszeptibilität herzustellen. Der Begriff Resistenz ist aber aufgrund der derzeitigen Analyse der Artenbarriere nicht mit „nicht-infektiös“ gleichzusetzen. So konnte vor kurzem gezeigt werden, dass mit Hamster-Prionen inokulierte Mäuse, obwohl klinisch (noch) nicht erkrankt, sowohl andere Mäuse als auch Hamster infizieren konnten (Hill *et al.*, 2000).

1.1.2 Replikationsmodelle

Nach dem Prion-Modell repliziert sich PrP^{Sc} durch Umfaltung von PrP^C in die krankheits-assoziierte Isoform PrP^{Sc}. Replikationsmodelle müssen für alle drei Ätiologien von Prion-Erkrankungen (sporadisch, genetisch und infektiös) Gültigkeit haben.

Das Heterodimermodell (Prusiner *et al.*, 1990; Cohen & Prusiner, 1998; Abbildung 1.1A) geht von einer direkten Wechselwirkung von PrP^C und PrP^{Sc}, eventuell über einen postulierten metastabilen Übergangszustand des PrP^C, das PrP*, aus. Dabei soll es sich um einen teildenaturierten bzw. „molten globule“ Zustand handeln. Dieser liegt in einem Gleichgewicht mit PrP^C vor, wobei das Gleichgewicht fast ganz auf der Seite von PrP^C liegt. PrP* kann mit PrP^{Sc} ein Heterodimer bilden, das sich dann in ein Homodimer des PrP^{Sc} umlagert. Nach Dissoziation können beide PrP^{Sc} Moleküle weitere Katalysen durchführen. Die spontane Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} kommt dabei, obwohl sie thermodynamisch begünstigt ist, aufgrund einer hohen Aktivierungsenergie nur sehr selten vor (sporadischer Fall). Spezifische Mutationen im PrP^C verschieben das Gleichgewicht in Richtung des PrP* und begünstigen so die spontane Umwandlung in PrP^{Sc}. Exogenes PrP^{Sc} dagegen kann aktiv PrP* aus dem Gleichgewicht entziehen und in PrP^{Sc} umwandeln. Dieses Modell wurde

mittlerweile aufgrund von Ergebnissen mit transgenen Tieren (Kapitel 1.3) zum *Template-assistierten* Anlagerungsmodell erweitert. Dabei wird PrP* durch die Bindung eines weiteren Proteins, des sogenannten Faktor X (siehe Kapitel 1.3) stabilisiert und der Komplex interagiert mit PrP^{Sc} (Cohen & Prusiner, 1998).

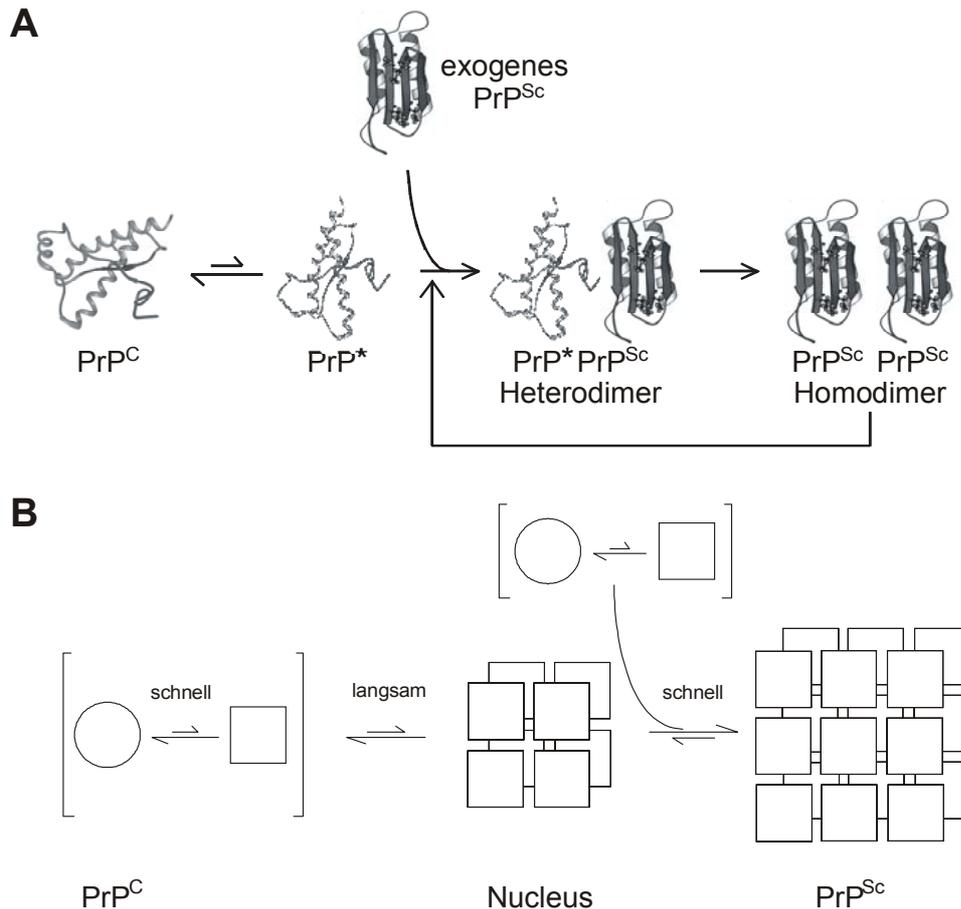


Abbildung 1.1 Modelle zur Replikation der Prionen:

A) Heterodimer-Modell (verändert nach Cohen *et al.*, 1994)

B) Keimabhängiges Polymerisationsmodell (verändert nach Jarrett & Lansbury, 1993)

Nach dem Keim-induzierten Polymerisationsmodell (Jarrett & Lansbury, 1993; Abbildung 1.1B) liegt ein schnelles Gleichgewicht zwischen PrP^C und PrP^{Sc} vor, wobei PrP^C thermodynamisch stabiler ist. Nur wenn sich genügend PrP^{Sc} Moleküle aneinander lagern, entsteht ein stabiler Keim, der die schnelle Anlagerung weiterer PrP^{Sc} Moleküle ermöglicht (sporadischer Fall). Auch in diesem Modell verschieben Mutationen das Gleichgewicht, hier von PrP^C zu PrP^{Sc}, in Richtung des PrP^{Sc} und erleichtern so die Bildung eines Keimes. Bei Infektionen werden Keime extern hinzugefügt und ermöglichen die schnelle Anlagerung von endogenem PrP^{Sc}.

Beide Modelle wurden auf exakte thermodynamische und kinetische Gesetzmäßigkeiten untersucht (Eigen, 1996). Aufgrund dieser kinetischen Überlegungen wurde das Heterodimermodell erweitert. Zur Umwandlung von PrP^C müssen demnach mehrere PrP^{Sc} Moleküle kooperativ zusammenwirken.

1.1.3 Die zelluläre Isoform: PrP^C

Wie bereits erwähnt ist PrP^C ein wirtscodiertes Protein. Es wird primär im zentralen Nervensystem (Kretzschmar *et al.*, 1986), aber auch in verschiedenen anderen Geweben und Zellen (Mobley *et al.*, 1988; Manson *et al.*, 1992) als ein posttranslational modifiziertes Membranprotein exprimiert (Abbildung 1.2).

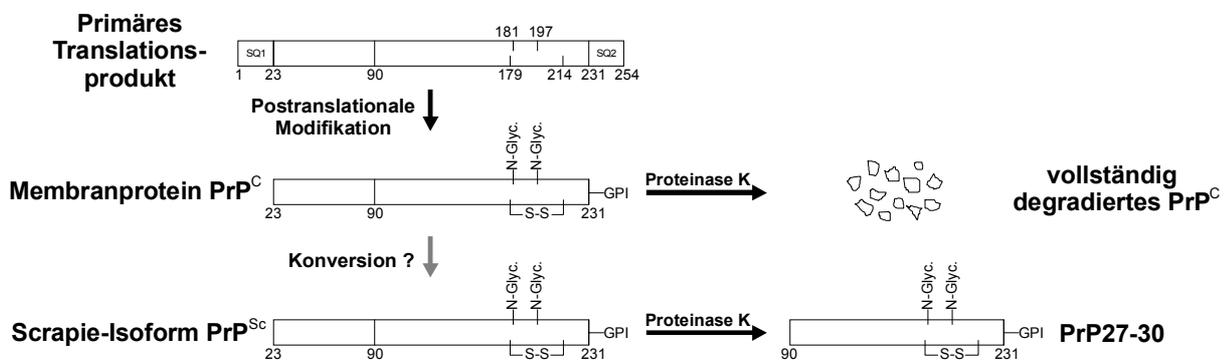


Abbildung 1.2 Biosynthese des PrP^C und PrP^{Sc}:

Erläuterungen siehe Text (modifiziert nach Weissmann, 1994)

Das PrP-Gen ist ein *Single-Copy-Gen*, das beim Hamster aus zwei Exons und einem Intron besteht. Der offene Leserahmen erstreckt sich aber nur auf das zweite Exon (Basler *et al.*, 1986). Das primäre Translationsprodukt wird über eine N-terminale Signalsequenz in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Dort wird durch eine zweite, C-terminale Signalsequenz ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker angehängt, mit dem es in der Membran verankert wird (Bolton *et al.*, 1985; Safar *et al.*, 1990).

Im weiteren Verlauf des sekretorischen Transportsystems wird eine Disulfid-Brücke zwischen Cystein 179 und 214 ausgebildet (Turk *et al.*, 1988). An den Asparaginresten 181 und 197 wird das Protein N-glykosyliert (Endo *et al.*, 1989), wobei alle drei Formen (nicht, ein- oder zweifach glykosyliert) in Zellen gefunden werden. Auf der Zelloberfläche reichert es sich überwiegend in Caveolae-ähnlichen Domänen an, was für GPI-geankerte Proteine typisch ist (Taraboulos *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996).

Im Gegensatz zu PrP^{Sc} ist PrP^C in milden Detergenzien löslich und lässt sich durch Proteinase K vollständig abbauen. PrP^C besitzt eine überwiegend α -helikale Struktur (40 % α -Helix; Pan *et al.*, 1993). NMR-Studien an rekombinantem, d. h. nicht glykosyliertem und GPI-geankertem, PrP zeigten drei α -Helices und zwei kurze β -Faltblattstränge (Riek *et al.*, 1997; James *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Abbildung 1.3A). Im Vergleich dazu zeigt das berechnete Strukturmodell für PrP^{Sc} die beiden Helices B und C und zusätzlich ein antiparalleles β -Faltblatt aus vier Strängen (Huang *et al.*, 1996; Abbildung 1.3B).

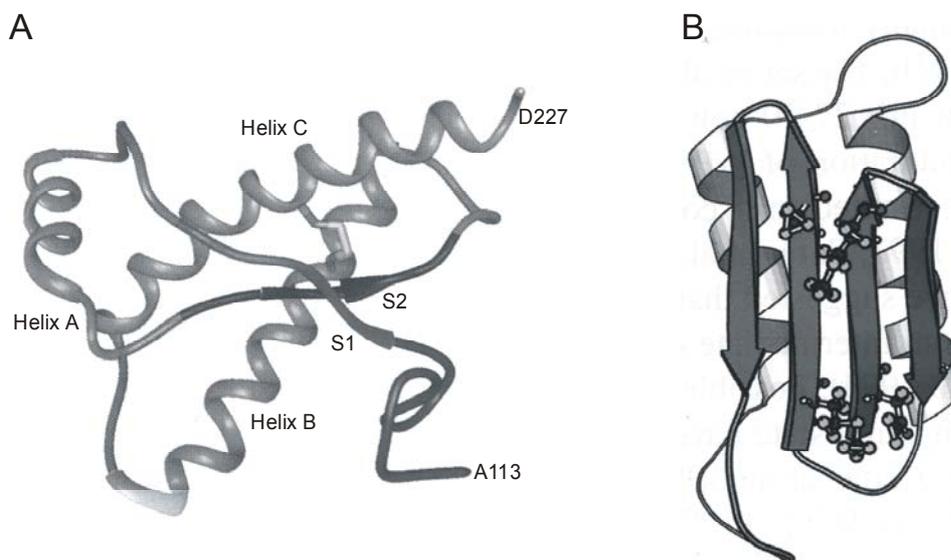


Abbildung 1.3 Struktur der PrP^C- und der PrP^{Sc}-Isoform:

A) NMR Struktur von recPrP(90-231) des Hamsters (Liu *et al.*, 1999). Auch beim Hamster ist der N-Terminus der Volllänge des recPrP, wie bei allen anderen Spezies, unstrukturiert (Riek *et al.*, 1997; Zahn *et al.*, 2000).

B) Berechnetes Strukturmodell vom PrP27-30 des Hamsters (Huang *et al.*, 1996). Die beiden Helices entsprechen den Helices B und C des recPrP.

Die natürliche Funktion des PrP^C ist bis heute noch weitgehend unklar. Die N-terminale Oktarepeatregion des PrP^C bindet unter physiologischen Bedingungen fünf bis sechs Kupferionen (Miura *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 1997a; 1997b). Deshalb wird für PrP^C eine Funktion in der Regulierung des Kupferhaushaltes der Zelle und damit auch im Zusammenhang mit oxidativem Stress diskutiert. Brown *et al.* (1999) konnten zudem für recPrP eine Superoxiddismutase-Aktivität *in vitro* zeigen. Diese Ergebnisse werden aber derzeit noch kontrovers diskutiert (Waggoner *et al.*, 2000; Wong *et al.*, 2000). Zusätzlich konnten Mouillet-Richard *et al.* (2000) in einem Zellkultursystem zeigen, dass PrP^C die Signaltransduktion beeinflusst.

Für die Ausbildung von Prion-Erkrankungen ist PrP^C jedoch essentiell. Knock-out Mäuse, die kein PrP^C exprimieren, können nicht mit PrP^{Sc} infiziert werden. Ohne endogenes PrP^C ist

weder eine Replikation des Erregers noch eine Pathogenese zu beobachten (Bueler *et al.*, 1993; Prusiner *et al.*, 1993). Diese Knock-out Tiere zeigen auch keinerlei Defizite bezüglich ihrer Lebensfähigkeit (Bueler *et al.*, 1993). Früher beschriebene Ataxien bei älteren Tieren (Sakaguchi *et al.*, 1996) konnten mittlerweile auf überexprimiertes DOPPEL (**D**ownstream **P**rion-**P**rotein like **E**lement) zurückgeführt werden (Moore *et al.*, 1999). Diese Tiere exprimierten durch falsches Spleißen chimäre mRNA. Das DOPPEL-Gen liegt 16 kB downstream vom PrP-Gen. DOPPEL zeigt 25 % Aminosäurehomologie und viele strukturelle Gemeinsamkeiten mit PrP: N-terminale Signalsequenz mit anschließenden basischen Aminosäure-Cluster, strukturierte C-terminale Domäne, zwei N-Glykosylierungen und GPI Anker (Silverman *et al.*, 2000; Mead *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2000).

1.1.4 *In vitro* Konversion

Die *de novo* Erzeugung von Infektiosität *in vitro* aus nicht infektiösem Material wäre der endgültige Beweis des Prion-Modells. Diese ist, wenn sie überhaupt möglich ist, bis heute noch nicht gelungen. Bisher wurden verschiedene Konversionsmodelle beschrieben, die Eigenschaften des PrP^{Sc} nachstellen konnten. *De novo* Infektiosität konnte jedoch nicht detektiert werden.

Radioaktiv markiertes PrP^C kann in einem zellfreien *in vitro* Ansatz durch Inkubation mit einem 100 bis 1000-fachen Überschuss an PrP^{Sc} in die PK-resistente Form umgelagert werden. PrP^{Sc} muss dabei entweder mit mittleren Guanidiniumhydrochlorid (GdnHCl)-Konzentrationen teildenaturiert (Kocisko *et al.*, 1994) oder die Konversion unter erhöhten Salzkonzentrationen (Horiuchi & Caughey *et al.*, 1999) durchgeführt werden. Bekannte Artenbarrieren konnten in heterologen Systemen nachgestellt werden (Kocisko *et al.*, 1995; Raymond *et al.*, 1997). Auch blieben unterschiedliche, Stamm-spezifische PK-resistente Fragmente erhalten (Bessen *et al.*, 1995). Die *de novo* generierte Infektiosität konnte aber aufgrund des Überschusses an PrP^{Sc} nicht direkt getestet werden. Mäuse, die chimäres Hamster-Maus-PrP^C exprimierten, ließen sich im Gegensatz zu normalen Mäusen mit Hamster-Scrapie infizieren. Das gebildete PrP^{Sc} war dann auch für normale Mäuse infektiös. Die *in vitro*-Konversion des chimären PrP^C mit Hamster-PrP^{Sc} zeigte aber keine *de novo* generierte Infektiosität (Hill *et al.*, 1999). Auch war die *in vitro* Konversion von nicht modifiziertem PrP deutlich effektiver, wobei in PrP^{Sc} posttranslational modifiziertes PrP gefunden wird.

Ein anderes, in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes *in vitro*-Konversionssystem basiert auf Solubilisierungsexperimenten mit PrP27-30 (Riesner *et al.*, 1996). Durch Solubilisierung in Gegenwart von SDS konnte PrP in monomerer bis oligomerer Form in Lösung gebracht werden. Dieses solubilierte solPrP27-30 wies Eigenschaften des PrP^C auf (Post, 1998; Post *et al.*, 1998; Tabelle 1.4). Die Restinfektiosität konnte auf Hintergrundinfektiosität zurückgeführt und durch Gelelektion entfernt werden (Leffers, 1999). Durch Zugabe von 25 % Acetonitril oder Ausdünnen des SDS auf 0,01 % konnte eine Reaggregation induziert werden (Post, 1998; Post *et al.* 1998). Dieses reaggregierte solPrP27-30 zeigte ähnliche Eigenschaften wie PrP^{Sc} (Tabelle 1.4). Die gleichen Ergebnisse konnten ebenfalls mit recPrP(90-231) gezeigt werden. Kinetische Untersuchungen der Reaggregation zeigten, dass der Aggregation eine sehr schnelle Strukturumwandlung vorausgeht (Pitschke, 1999; Schaefer, 1997). Dabei konnte eine schnelle Aggregationsphase gefolgt von einer langsameren Aggregationsphase unterschieden werden. Die Struktur der so gebildeten Aggregate zeigte in der Elektronenmikroskopie keine zu PrP27-30 vergleichbare amyloide Anordnung, obwohl die Struktur nicht als amorph zu bezeichnen war (Post *et al.*, 1998).

Tabelle 1.4 Vergleich der Eigenschaften von PrP^C, PrP^{Sc} und den Isoformen des solPrP27-30:
(nach Post *et al.*, 1998)

Eigenschaften	Zelluläre Isoform (PrP ^C)	sPrP in 0,2% SDS	Scrapie Isoform (PrP ^{Sc})	sPrP in 0,01% SDS
Infektiosität	nicht infektiös	Restinfektiosität	infektiös	Restinfektiosität
Protease K-Sensitivität	sensitiv	sensitiv	C-terminal resistent	stabiler nach Zentrifugation
Sekundärstruktur	überwiegend α -helikal	größerer α -helikaler als β -Faltblattanteil	β -faltblattreich	größerer β -Faltblatt- als α -helikaler Anteil
Löslichkeit	löslich	löslich	unlöslich	unlöslich
Aggregationszustand	monomer/oligomer	monomer/ oligomer	aggregiert	aggregiert

Die sehr schnelle Strukturumwandlung und der Mechanismus für die Aggregation konnte aufgrund der SDS-Abhängigkeit näher analysiert werden. Wahrscheinlich erfolgt erst eine Dimerisierung von α -helikalen Molekülen, die sich bei weiterem Ausdünnen des SDS in eine β -Faltblattstruktur umlagern und ein lösliches, mindestens tetrameres, Oligomer bilden (Jansen *et al.*, 2001). In Abbildung 1.4 ist dieses Konversionsmodell schematisch dargestellt. Durch Zugabe von Keimen wurde die Aggregation deutlich beschleunigt, was der Keiminduzierten Aggregation entspricht (Pitschke, 1999; Schaefer, 1997).

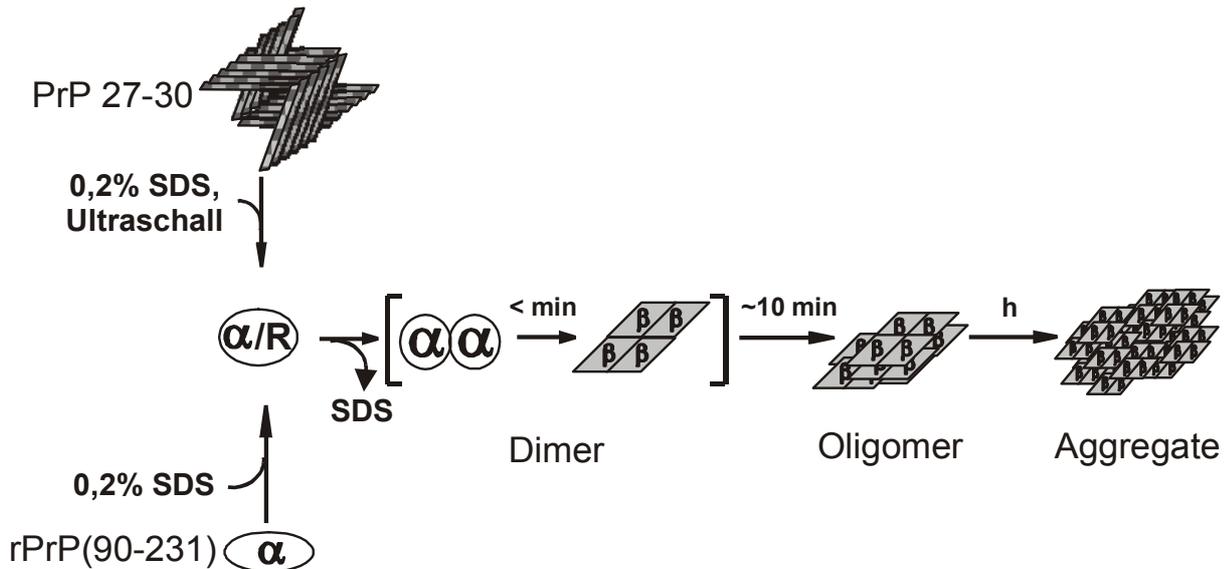


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung des SDS-abhängigen *in vitro*-Konversionssystems
(verändert nach Jansen *et al.*, 2001)

1.2 Chemische und molekulare Faltungshilfen

Es wurde deutlich, dass die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} mit einer Strukturänderung des Proteins einhergeht. Die Umwandlung könnte somit auch durch Substanzen, die in die Faltung von Proteinen eingreifen können, beeinflusst werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Faltungshilfen, die bei der Strukturumwandlung von Proteinen assistieren können, auf die *in vitro*-Konversion des Prion-Proteins untersucht. Aus diesem Grund wird im folgenden sowohl auf das Konzept der chemischen als auch auf das der molekularen Chaperone eingegangen.

1.2.1 Chemische Chaperone

Lösungsmittel können verschiedene Effekte auf die Struktur und Löslichkeit von Proteinen haben (zum Überblick: Timasheff, 1993). So führen z.B. hohe Salzkonzentrationen (1–4 M) zum Aussalzen von Proteinen (Green, 1932), was bei der Aufreinigung und Aufkonzentrierung von Proteinen verwendet wird. Zur Stabilisierung von Proteinen oder Organellen bei der Aufreinigung werden Glycerol (10 %) oder Saccharose (1 M) zugesetzt. Ebenfalls hohe Konzentrationen von Harnstoff (8M) oder GdnHCl (6M) führen zur Denaturierung und damit zum Verlust der biologischen Aktivität von Proteinen (Neurath *et al.*, 1944). Die beschriebenen Phänomene benötigen alle hohe Solvenzkonzentrationen und sind daher auf schwache Wechselwirkungen zurückzuführen. Denaturierende Substanzen binden dabei direkt an Proteine (Simpson & Kauzmann, 1953). Struktur-stabilisierende,

präzipitierende oder Selbst-Assoziation induzierende Substanzen werden dagegen von der Oberfläche des Proteins ferngehalten. Diese Prozesse hängen somit alle nur von der preferentiellen Bindung des Solvenz an das Protein ab und können mit einer Drei-Komponenten thermodynamischen Theorie beschrieben werden (Timasheff, 1993). Dabei wird Wasser explizit mitbetrachtet. Die Wirkung der preferentiellen Hydratisierung auf die Struktur eines Proteins ist in Abbildung 1.5 dargestellt. Bei gegebener Struktur führt der Ausschluss des Solvenz von der Oberfläche eines Proteins zur Aggregation bzw. Selbst-Assemblierung desselben (Abbildung 1.5A). Konkurrieren zwei Strukturen desselben Proteins miteinander, so wird die Struktur mit der kleinsten Oberfläche stabilisiert (Abbildung 1.5B). In diesem Beispiel wird die native, globuläre Struktur stabilisiert. In welcher Weise ein Solvenz wirkt, ist nicht generell vorhersagbar und wird durch das jeweilige Protein mitbeeinflusst.

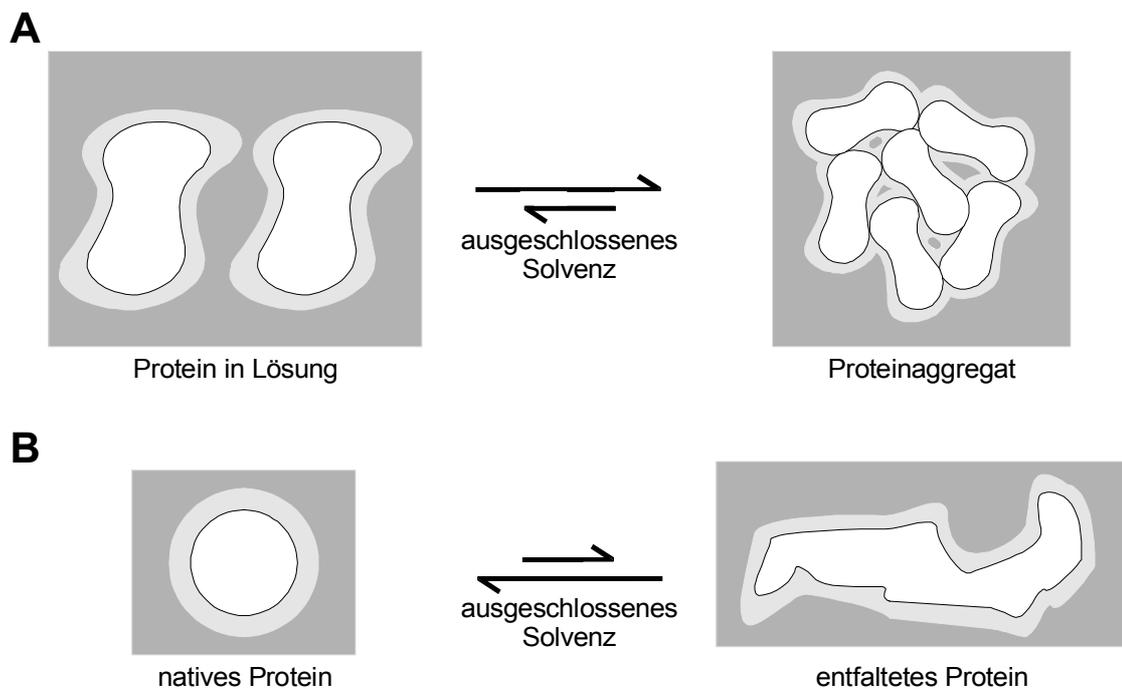


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung des preferentiellen Ausschlusses von Lösungsmittel:

A) Aussalzen: Durch Aggregation wird die Oberfläche verringert.

B) Strukturstabilisierung: Die Oberfläche des nativen Proteins ist kleiner als die des entfalteten, daher wird die Proteinstruktur stabilisiert.

Proteine ○ ; Hydrathülle ◐ ; H₂O + Solvenz ■ (modifiziert nach Timasheff, 1993)

Da einige dieser Lösungsmittel die Faltung von Proteinen beeinflussen und ihre native Struktur stabilisieren, werden sie auch als chemische Chaperone bezeichnet (Tatzelt *et al.*, 1996). So stabilisiert Glycerol Proteine *in vitro* gegen Hitzedenaturierung (Gekko & Koga, 1983). Auch Zellkulturen konnten Hitze-Schocks nach Glycerolbehandlung deutlich besser überstehen als ohne (Edington *et al.*, 1989). In der Natur werden ebenfalls einige chemische

Chaperone, wie z.B. Zucker, Polyole, Aminosäuren und Methylamine, verwendet. So akkumulieren Fische im Muskelsystem destabilisierende (Harnstoff) und stabilisierende (TMAO, Sarkosyl, β -Alanine und Betain) Substanzen in einem Verhältnis von 2:1 (Yancey *et al.*, 1982). Auch in der Säugetiere müssen kurzfristige Harnstoffkonzentrationen größer als ein molar toleriert werden (Garcia-Perez & Burg, 1990).

1.2.2 Molekulare Chaperone

Die Struktur von Polypeptid-Ketten wird durch ihre Primärsequenz bestimmt (Anfinsen, 1973). Daher können Proteine nach vollständiger Denaturierung ihre native Struktur und damit ihre biologische Aktivität wieder zurückgewinnen. Die Effektivität dieser Rückfaltung *in vitro* ist unterschiedlich und kann durch andere, bei der Faltung assistierende Proteine gesteigert werden. Sie werden als molekulare Chaperone bezeichnet (Historischer Überblick über das Konzept molekularer Chaperone: Pelham, 1986). Heute geht man davon aus, dass die meisten Proteine bei ihrer Faltung *in vivo* die Hilfe von molekularen Chaperonen benötigen (Netzer & Hartl, 1998). Eine Vielzahl von verschiedenen Chaperonen in Pro- und Eukaryoten wurde beschrieben, die in verschiedene Klassen eingeteilt werden (Tabelle 1.5 S.16).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das GroEL/ES-System aus der Hsp 60-Familie eingesetzt, da es sich hierbei um ein gut charakterisiertes Chaperon-Modell handelt. Alle Hsp 60-Chaperone bestehen aus 14 identischen Untereinheiten, die in zwei Ringen angeordnet sind (Bukau & Horwich, 1998; Abbildung 1.6). Jede Untereinheit besteht aus einer apikalen, mittleren und äquatorialen Domäne.

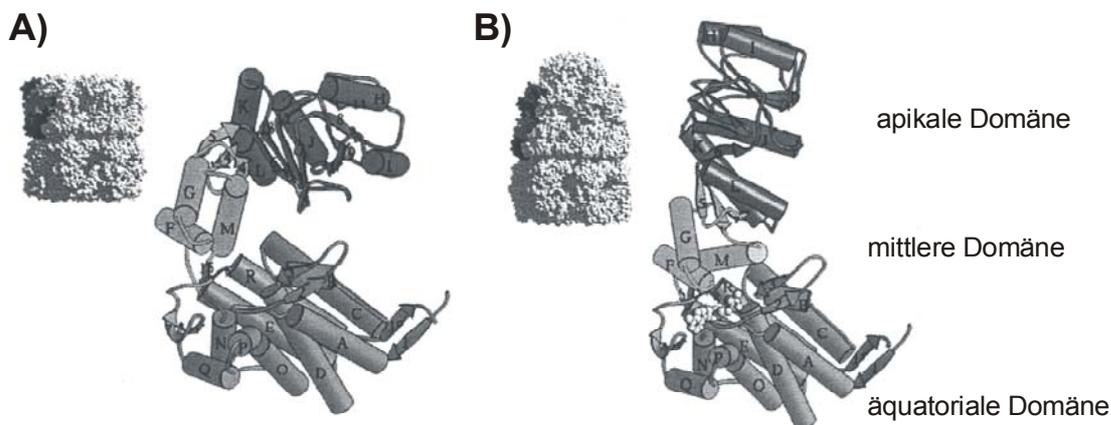


Abbildung 1.6 Struktur des GroEL alleine (A) und im Komplex mit seinem Co-Chaperon GroES (B):
(aus Bukau & Horwich, 1998)

Der durch GroEL assistierte Faltungsprozess ist in Abbildung 1.7 schematisch dargestellt. Das Substrat wird im Inneren des Ringes gebunden (Braig *et al.*, 1993; Fenton *et al.*, 1994). Nach Bindung des Substrates bindet GroEL sein Co-Chaperon GroES in cis und schließt das Substrat ein. Durch ATP-Hydrolyse im cis-Ring kommt es zu einer Freisetzung des Substrates im Inneren des GroEL/ES-Komplexes. Aufgrund dieses Einschlusses kann sich das Substrat ohne Einflüsse von außen falten. Eine weitere ATP-Hydrolyse im trans-Ring führt zur Dissoziation des GroEL/ES-Komplexes und das Substrat wird ins Cytosol entlassen. Ist das Substrat noch nicht richtig gefaltet, können weitere Faltungsrunden durchlaufen werden.

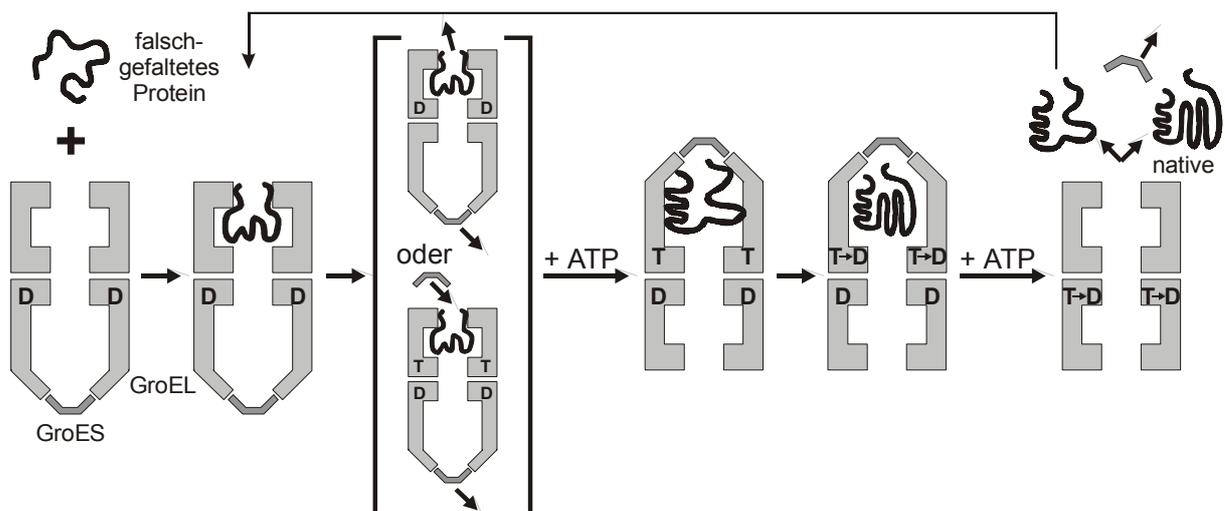


Abbildung 1.7 Modell einer GroEL/ES vermittelten Faltung:

Das ent- oder falsch-gefaltete Protein wird durch GroEL gebunden (trans-Komplex). Mit GroES und ATP kann sich der cis-Komplex ausbilden. Durch ATP Hydrolyse (T→D) im cis-Ring kann sich das Substrat selbst im Inneren des GroEL/ES Komplexes falten. ATP Hydrolyse im trans-Ring führt dann zur Dissoziation des GroEL/ES-Substrat-Komplexes. Sollte die Faltung des Substrates nicht nativ sein, so können weitere Zyklen durchgeführt werden. (modifiziert nach Bukau & Horwich, 1998; Hendrick & Hartl, 1998)

Mitglieder der Hsp 60-Familie kommen in Bakterien und in Organellen von Eukaryoten vor. Einige Veröffentlichungen beschreiben das Vorkommen von Hsp 60 in geringen Konzentrationen auch in anderen Zellkompartimenten, wie z.B. im sekretorischen Transportsystem (Itoh *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 1992; Velez-Granell *et al.*, 1994), wobei Herkunft und Funktion noch unklar sind. Über das Vorkommen im eukaryotischen Cytosol ist bisher nichts bekannt. Eine geringe aber signifikante Homologie zu den Hsp 60 Chaperonen zeigt TRiC (TCP-1 Ring-Komplex; Frydman *et al.*, 1992; Kubota *et al.*, 1994). Es besteht aus einem Doppelring mit je 8-9 heterologen Untereinheiten (Marco *et al.*, 1994) und zeigt Homologien zu Chaperonen von Archaeobakterien (Hartl *et al.*, 1994). Im Gegensatz zu den Hsp 60 Chaperonen benötigt TRiC kein Co-Chaperon. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Klassen werden sie zur Gruppe der Chaperonine zusammengefasst.

Tabelle 1.5 Zusammenfassung der Lokalisation und Funktion der wichtigsten Chaperon-Familien:
(modifiziert nach Morimoto et al., 1997)

Familie	Organismus	Chaperone	Kompartiment	Funktion
kleine Hsps	<i>E.coli</i>	lbpA und lbpB	Cytosol	unterdrücken Aggregation und Hitze
	<i>S.cerevisiae</i>	Hsp 27	Cytosol	Inaktivierung von Proteinen <i>in vitro</i> ;
	Säugetiere	α A und α B-Crystallin Hsp 27	Augenlinse Cytosol	Thermotoleranz durch Stabilisierung von Mikrofilamenten; mögliche Rolle in Zellwachstum und Zelldifferenzierung
Hsp 60	<i>E.coli</i>	GroEL	Cytosol	Funktion in der Assemblierung von Bakteriophagen und Rubisco;
	<i>S.cerevisiae</i>	Hsp 60	Mitochondrien	Rückfaltung oder Inhibierung der Aggregation von denaturierten Proteinen <i>in vitro</i> ;
	Pflanzen	Cpn 60	Chloroplasten	evtl. Rolle in der Proteindegradation <i>in vivo</i> als Cofaktor in proteolytischen Systemen
	Säugetiere	Hsp 60	Mitochondrien	
Hsp 70	<i>E.coli</i>	Dnak	Cytosol	Funktion in der Replikation des Phagen λ ; Autoregulation der Hitzeschock Antwort; Interaktion mit naszierenden Polypeptidketten; evtl. Rolle in der Proteindegradation <i>in vivo</i> als Cofaktor in proteolytischen Systemen; dissoziiert Clathrin; Funktion im Transport zwischen Organellen; Rolle in der Signaltransduktion (z.B. Steroid Hormon Rezeptor); Rückfaltung und Stabilisierung von denaturierten Proteinen <i>in vitro</i>
	<i>S.cerevisiae</i>	Ssa1-4 Ssb1,2 Kar2	Cytosol ER	
	Säugetiere	Ssc1	Mitochondrien	
		Hsc70	Cytosol/Kern	
		Hsp 70	Cytosol/Kern	
		Bip	ER	
		mHsp 70	Mitochondrien	
	Hsp 90	<i>E.coli</i>	HtpG	Cytosol
<i>S.cerevisiae</i>		Hsp 83	Cytosol	Rückfaltung und Stabilisierung von denaturierten Proteinen <i>in vitro</i>
Säugetiere		Hsp 90	Cytosol	
		GRP94	ER	
Hsp 100	<i>E.coli</i>	ClpA,B,C	Cytosol	Funktion in der Stress-Toleranz; vermittelt die Resolubilisierung von hitze-inaktivierter Luciferase aus unlöslichen Aggregaten
	<i>S.cerevisiae</i>	Hsp 104	Cytosol	

1.3 Prion-Infektion und Chaperone

Wie bereits in Kapitel 1.1.1 dargelegt, sind noch nicht alle Eigenschaften von Prionen, wie die verschiedenen Stämme und die Artenbarriere, richtig verstanden. Eng mit der Artenbarriere verbunden ist das genetische Element Faktor X, das im Zusammenhang mit Infektionsstudien an transgenen Mäusen entdeckt wurde.

Transgene Mäuse, die menschliches PrP exprimieren, konnten nicht mit PrP^{CJD} infiziert werden (Telling *et al.*, 1994), obwohl hier Prion-Protein mit gleicher Sequenz eingesetzt wurde. Die Mäuse exprimierten allerdings humanes PrP vor dem Hintergrund des endogenen, murinen PrP. Ohne endogenes, murines PrP ließen sich diese Mäuse infizieren (Telling *et al.*,

1995). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein weiterer, endogener Interaktionspartner, Faktor X oder Protein X genannt, postuliert. Er bindet in den parallel exprimierenden Mäusen aufgrund seiner Spezies-Präferenz das endogene, murine PrP^C. Dieses kann aber nicht bzw. nur schlecht konvertiert werden. Die Expression chimärer Maus-Mensch-PrPs (MHu2M) ermöglichte ebenfalls eine Infektion mit PrP^{CJD}. Weitere Untersuchungen grenzten die Interaktion auf den C-terminalen Bereich ein (Kaneko *et al.*, 1997).

Da Prion-Erkrankungen mit einer Konformationsänderung und Aggregation verbunden sind, wurden schon lange Chaperone als Protein X diskutiert. So konnten Tatzelt *et al.* (1995) bei Scrapie-infizierten Mäuse-Neuroblastoma (ScN2a)-Zellen eine veränderte Stressantwort zeigen. Die induzierbaren Hsp 28 und Hsp 72 wurden bei Stress nicht mehr exprimiert, während alle anderen Stressproteine weiterhin induzierbar waren. Die Expression des konstitutiv exprimierten Hsp 73 war in infizierten und nicht infizierten N2a-Zellen gleich. Jedoch war die zelluläre Lokalisation des Hsp 73 in N2a- und ScN2a-Zellen unterschiedlich. Hsp 73 in nicht infizierten Zellen verteilte sich gleichmäßig im Cytosol und wurde nach Hitzeschock in den Kern transportiert. Dagegen war Hsp 73 in ScN2a-Zellen hochkonzentriert in bestimmten Regionen des Cytosols lokalisiert. Nach Hitze-Schock war keine Translokation in den Kern, sondern nur eine diffuse cytosolische Verteilung zu beobachten. Die molekularen Grundlagen beider Phänomene sind noch nicht geklärt.

Edenhofer *et al.* (1996) zeigten in einem *yeast-two-hybrid*-System eine Interaktion von huHsp 60 mit recPrP des Hamsters. Durch Immuno-Blot Analysen mit Glutathion-S-transferase::recPrP Konstrukten wurde eine Bindungskonstante im mikromolaren Bereich bestimmt.

In einem modifizierten *in vitro*-Konversionssystem (DeBurman *et al.*, 1997; Kapitel 1.1.4) wurde der Einfluss wichtiger zellulärer Chaperone untersucht. Nur GroEL stimulierte die *in vitro*-Konversion von metabolisch markiertem [³⁵S]-PrP^C in PrP^{res} ohne Teildenaturierung des PrP^{Sc}. Die Konversion war ATP-abhängig und wurde in Anwesenheit von GroES gehemmt. Die Effektivität der Konversion war ohne posttranslationale Modifikationen deutlich höher. Die *in vitro*-Konversion mit GroEL wurde unter erhöhten Salzkonzentrationen (10 mM MgCl₂; 1,5 mM NaCl; 140 mM KCl) durchgeführt. In einer späteren Arbeit zeigte die gleiche Arbeitsgruppe mit erhöhten KCl Konzentrationen (100 bis 500 mM) und 5 mM MgCl₂ eine *in vitro*-Konversion ebenfalls ohne Teildenaturierung des PrP^{Sc} (Horiuchi & Caughey, 1999).

Chemische Chaperone (Kapitel 1.2.1) zeigten in Modell-Systemen ebenfalls einen Einfluss. So verhinderten die chemischen Chaperone DMSO, TMAO und Glycerol die Bildung von PrP^{res} in ScN2a-Zellen (Tatzelt *et al.*, 1996). Auch *in vitro* beeinflussten chemische Chaperone die Konversion. Während Glycerol und Cyclodextrin keinen Einfluss zeigten, inhibierten Saccharose und Trehalose die Konversion. DMSO dagegen zeigte *in vitro* eine komplexe Dosisabhängigkeit. Bei mittleren Konzentrationen (1-3 mM) steigerte DMSO die Konversion, wohingegen es bei höheren Konzentrationen (bis zu 30 %) die Konversion inhibierte (DeBurman *et al.*, 1997).

Alle hier aufgeführten Ergebnisse sprechen für eine mögliche Beteiligung von Chaperonen bei Prion-Erkrankungen, eine essentielle Funktion konnte bisher für kein Chaperon gezeigt werden.

1.4 Aufgabenstellung

Die *Prion-Protein only*-Hypothese (oft als *Protein only*-Hypothese abgekürzt), nach der der Erreger allein aus PrP^{Sc} besteht, konnte bis heute noch nicht endgültig bewiesen werden. Der letztendliche Beweis wäre die Generierung neuer Infektiosität *in vitro*. Wie im Einzelnen beschrieben, konnten verschiedene *in vitro*-Konversionssysteme etabliert werden, die einige Eigenschaften des PrP^{Sc} wieder herstellten (Kapitel 1.1.4). Bis heute konnte aber keine *de novo* Infektiosität nachgewiesen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Optimierung und Erweiterung des in unserer Arbeitsgruppe entwickelten *in vitro*-Konversionssystems (Post *et al.*, 1998). Dabei wurde eine Strukturumwandlung und Aggregation nach Entfernung des SDS durch Verdünnung induziert. Diese Aggregate zeigten einige aber nicht alle Eigenschaften von PrP^{Sc}. Um weitere PrP^{Sc}-spezifische Eigenschaften, wie die C-terminale PK-Resistenz oder Infektiosität, herzustellen, wurden folgende Aspekte untersucht:

1. Das von Post *et al.* (1998) entwickelte *in vitro*-Konversionssystem führte unter anderem auch zu einer erhöhten PK-Stabilität des aggregierten PrP. Die spezifische N-terminale Verkürzung wie bei PrP^{Sc} war aber aufgrund des Ausgangsmaterials (solPrP27-30 bzw. recPrP(90-231)) nicht nachweisbar. Daher sollten im Rahmen dieser Arbeit die Spezifität des *in vitro*-Konversionssystem durch recPrP(29-231) untersucht werden.

2. *In vitro*-Generierung von Infektiosität konnte auch in unserem System mit recPrP oder sPrP27-30 bisher nicht nachgewiesen werden. Die fehlende Infektiosität bei recPrP kann auf die nicht vorhandenen posttranslationalen Modifikationen zurückgeführt werden. Bei sPrP27-30 waren diese Modifikationen zwar korrekt, aber neu generierte Infektiosität könnte durch bereits vorhandene Hintergrundinfektiosität verdeckt worden sein. Rückschlüsse auf die Bedeutung der posttranslationalen Modifikationen für die Generierung von *in vitro*-Infektiosität ließen diese Experimente also nicht zu. Deshalb sollte durch natürliches PrP^C aus eukaryotischen Zellkulturen der Einfluss dieser posttranslationalen Modifikationen auf die Infektiosität der Aggregate nach *in vitro*-Konversion untersucht werden. Hierfür ist die Aufreinigung von PrP^C in relativ großen Mengen und hohen Konzentrationen essentiell. Ein transfiziertes CHO-Zellkultursystem (Blochberger *et al.*, 1997) sollte als Suspensionskultur in unserem Labor etabliert und ein Aufreinigungsprotokoll entwickelt werden.
3. Die nach dem bestehenden Protokoll gebildeten Aggregate wiesen im Gegensatz zu PrP27-30 keine fibrillären sondern nur teilstrukturierte Formen auf (Post *et al.*, 1998). Durch Änderung der Lösungsbedingungen kann die Aggregation beeinflusst werden. Einerseits zeigten Zellkulturen, dass chemische Chaperone, wie Glycerol, die Bildung von PrP^{Sc} verhindern (Tatzelt *et al.*, 1996). Andererseits beschleunigte Glycerol die *in vitro*-Fibrillogenese von A β 40 (Yang *et al.*, 1999). Eine Erhöhung der Salzkonzentrationen und Änderung des pH-Wertes konnte rekombinantes PrP in eine fibrilläre Struktur überführen (Jackson *et al.*, 1999). In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss von verschiedenen Salzkonzentrationen und chemischen Chaperonen in unserem *in vitro*-System analysiert.
4. Eine zentrale Bedeutung im Infektionsprozess wird dem sogenannten Faktor X zugeschrieben (Cohen & Prusiner, 1998; Kapitel 1.3). Dabei handelt es sich um eine für die Replikation des Erregers notwendige zelluläre Komponente. Man nimmt an, dass es sich dabei um ein Protein handelt; prinzipiell könnte es sich auch um eine nicht-Protein-Komponente, wie Zucker (Dumpitak, 1998; Appel *et al.*, 1999) handeln. Bei Proteinen sind im speziellen molekulare Chaperone denkbar, weil sich PrP^C und PrP^{Sc} in ihrer Faltung unterscheiden und Chaperone Proteine bei der Faltung unterstützen (Kapitel 1.2.2). Als ein gut charakterisiertes Chaperon-System sollte daher das GroEL/ES-Systems modellhaft in seiner Wirkung auf die *in vitro*-Konversion verschiedener Prion-Proteine untersucht werden.

2 Materialien:

2.1 Allgemeines zu Chemikalien und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien und Lösungen waren, wenn nicht anders angegeben, vom Reinheitsgrad *pro analysi*. Alle Lösungen wurden mit hochreinem *Milli-Q*-Wasser (Hausanlage für deionisiertes Wasser mit nachgeschaltetem Wasseraufreinigungssystem EPA Est. 41237-MA-1, Millipore GmbH, Neu Isenburg), im folgendem als $H_2O_{\text{deion.}}$ bezeichnet, angesetzt und 20 min bei 121 °C autoklaviert. Nicht-autoklavierbare Lösungen wurden mit autoklaviertem $H_2O_{\text{deion.}}$ ($H_2O_{\text{autokl.}}$) angesetzt und mit einem 0,2 μm Filter (Schleicher und Schuell, Dassel) sterilfiltriert.

Für Acrylamid-Stammlösungen wurden Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid in $H_2O_{\text{autokl.}}$ gelöst und 30 min mit einem Ionenaustauscher (Amberlite MB3) unter Rühren inkubiert. Nach Filtration über einen Faltenfilter waren die Acrylamid-Stammlösungen gebrauchsfertig.

2.2 Puffer und Lösungen

NaPi_i (Natrium-Phosphat-Puffer): 100 mM Dinatriumhydrogenphosphat
100 mM Natriumdihydrogenphosphat

Die beiden Lösungen wurden durch Mischen auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt und autoklaviert bzw. steril-filtriert. In den Versuchsansätzen wurde der Puffer, wenn nicht anders angegeben, mit 10 mM und einem pH-Wert von 7,2 eingesetzt.

MOPS: 200 mM 3-(N-Morpholino)-Propan-Sulfonsäure, pH 7,0

MOPBS: 20 mM MOPS
150 mM NaCl

Freisetzungspuffer: 10 mM MgCl₂
10 mM KCl
80 mM NaCl
10 mM NaPi, pH 7,2

2.3 Chinesische Hamster Ovarien-Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Zellkulturlabor für eukaryotische Zellen eingerichtet. Die Arbeiten erfolgten unter der Microflow-Sicherheitswerkbank Klasse II (Nunc GmbH, Wiesbaden Biebrich). Es wurden ausschließlich sterile, einzeln verpackte Pipetten verwendet und alle Gegenstände wurden bevor sie unter die Werkbank gebracht wurden mit 70 %igen Ethanol desinfiziert. Bei allen Arbeiten wurden Ärmelschoner (Sekura, Roth, Karlsruhe) und zwei Paar Handschuhe getragen. Diese Maßnahmen wurden jedoch eher aus Gründen des Produktschutzes getroffen, da auch das überexprimierte PrP^C bisher unter keinen Bedingungen Infektiosität aufwies.

Das Medium für die Suspensionskulturen basierte auf dem CHO-S-SFM II Medium (GibcoLife Technologies, Eggenstein), welches nach unseren Wünschen modifiziert wurde.

Zusätzlich wurden je 500 ml Medium folgende Substanzen zugesetzt:

5 ml	100	x	MEM Nicht essentielle Aminosäure ¹
5 ml	100 mM		Na-Pyruvat ¹
5 ml	100	x	Penicillin/Streptomycin Lösung ¹
5 ml	250	µg	Fungizone ¹
5 ml			Insulin-Transferrin-Selenium-S-Supplement ¹
10 ml	50	x	Nukleotid Lösung ²
5 ml	100	x	Glutamat und Asparagin (G+A) Lösung ²
250 µl	100 mM		L-Methionine-sulphoximine in PBS ²

mit Nukleotid Lösung: je 35 mg Adenosin, Cytidine, Guanosin und Uridine
12 mg Thymidine

auf 100 ml mit H₂O_{deion.} Auffüllen, mit 0,2 µm Filtern
(Schleicher & Schuell, Dassel) sterilfiltrieren und zu 10 ml aliquotieren

G+A Lösung: 600 mg Na-Glutamat
600 mg Asparagin

auf 100 ml mit H₂O_{deion.} auffüllen, mit 0,2 µm Filtern
(Schleicher & Schuell, Dassel) sterilfiltrieren und bei 4 °C lagern

Das fertige Zellkulturmedium wurde mit 0,2 µm Cellulosenitratmembran-Filtereinheiten (Nalgene, Hamburg) sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

¹ GibcoLife Technologies, Eggenstein

² Sigma Aldrich, Deisenhofen

2.3.2 Glutamin-Synthetase Expressionssystem

Für die Expression des Prion-Proteins in hohen Konzentrationen wurde ein Glutamin-Synthetase Genvervielfältigungssystem gewählt (Bebbington & Hentschell, 1987). Chinesische Hamster Ovarien (CHO)-Zellen benötigen für ihr Wachstum und ihr Überleben Glutamin, das sie entweder aus dem Medium aufnehmen oder aus Glutamat und Ammonium mit der Glutamin-Synthetase synthetisieren können. Die Glutamin-Synthetase kann durch L-Methionine-sulphoximine (MSX) inhibiert werden (Sanders & Wilson, 1984) und somit eine spezifische Genexpression von transfizierten Zellen in Glutamin-freiem, MSX-haltigen Medium erzielt werden (Cockett *et al.*, 1990).

Der offene Leserahmen (ORF) des Prion-Proteins des Syrischen Hamsters wurde in den pEE-12-27-Vektor (modifizierter pEE-12-Vektor, Celltech, Slough, Berkshire, UK) kloniert. Wie in Abbildung 2.1 gezeigt, steht der ORF unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-Promotor. Als Selektionsmarker trägt dieser Vektor die Glutamin-Synthetase cDNA unter der Kontrolle des frühen SV-40 Promotors. Die transfizierten CHO-K1-Zellen wachsen nur bei ausreichender Expression der Glutamin-Synthetase unter den selektionierenden Bedingungen mit MSX.

Der CHO-Klon 30C3-1, der PrP^C im Vergleich zum Hirngewebe des Syrischen Hamsters etwa 14fach stärker expremiert (Blochberger *et al.*, 1997), wurde uns freundlicherweise von Hana Serban (Arbeitsgruppe Prusiner, UCSF, USA) zur Verfügung gestellt.

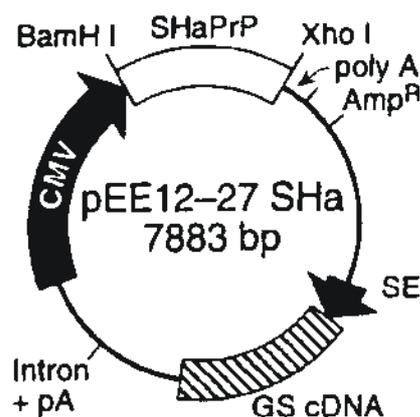


Abbildung 2.1 Prion-Protein-Glutaminsynthetase-Konstrukt zur Transfektion der CHO-Zellen:

SHaPrP entspricht dem offenen Leserahmen des Syrischen Hamster Prion-Proteins, der unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-Promoter (CMV) steht. Die Selektion erfolgte über die Glutaminsynthetase, deren cDNA (GS cDNA) unter der Kontrolle des frühen SV40-Promotors (SE) steht. Amp^R markiert die Position des Ampicillin-Resistenzgens.

2.4 Prion-Proteine

Prion-Proteine wurden mittlerweile für sehr viele Spezies beschrieben. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Prion-Proteine mit der Sequenz des Syrischen Hamsters eingesetzt.

2.4.1 Rekombinante Prion-Proteine

Das rekombinante PrP(29-231), d.h. mit der Sequenz von Aminosäure 29 bis 231, und recPrP(90-231) wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Prusiner (UCSF, USA) kloniert und uns als teilaufgereinigte Lyophilisate zur Verfügung gestellt. Da recPrPs in prokaryotischen Zellsystemen exprimiert werden, zeigen sie keine posttranslationalen Modifikationen. Während recPrP(29-231) dem Volllängen Prion-Protein ohne den ersten sechs N-terminalen Aminosäuren entspricht, ist das recPrP(90-231) mit dem N-terminal verkürzten PrP27-30 vergleichbar.

2.4.2 Natürliche Prion-Proteine

Als natürliche Prion-Proteine werden posttranslational modifizierte Prion-Proteine bezeichnet. Sie weisen neben dem C-terminalen Glykosyl-phosphatidyl-Anker (GPI) zwei N-Glykosylierungen an Aminosäure Asparagin 181 und Asparagin 197 auf.

PrP 27-30

Das N-terminal verkürzte, infektiöse PrP27-30 wurde gemäss dem standardisierten Protokoll (Prusiner *et al.*, 1983) von der Arbeitsgruppe Prof. Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) aus Scrapie-infizierten Syrien-Hamster-Hirnen (Lak:LVG; Charles River Laboratories) präpariert und uns als Saccharosegradientenfraction zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden mit H₂O_{deion.} auf < 25 % Saccharose verdünnt und PrP27-30 ü.N. bei 100.000 g und 4 °C im SW28-Rotor in der L8-55 Ultrazentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA) pelletiert.

Hamster-Hirn PrP^C

Zelluläres Prion-Protein (PrP^C) aus Hamster-Hirn wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt. Die Aufreinigung erfolgte aus gesunden Hamster-Hirnen nach dem Protokoll von Pan *et al.* (1992).

2.5 Molekulares Chaperon GroEL/ES

Das molekulare Chaperon GroEL und das Co-Chaperon GroES wurden mir freundlicherweise von Dr. Jörg Tatzelt (Max-Planck-Institut München) zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Protein-Präparationen zeigten ihre Funktionalität in verschiedenen anderen Faltungsexperimenten, unter anderem mit denaturierter Rhodanese.

2.6 Kontrollproteine

Rinderserumalbumin (BSA): Lyophilisat in der Reinheit „Fraktion V“
(Boehringer Mannheim GmbH)

α -Lactalbumin (α -La): Lyophilisat (Sigma Aldrich, Deisenhofen)

2.7 Antikörper

Für den immunologischen Nachweis der auf Membranen aufgebrauchten Proteine wurden folgende Antikörper eingesetzt:

3F4-Antikörper: erkennt das Epitop AS 112-115 im Hamster Prion-Protein
monoklonales Immunglobulin G aus Maus
(Arbeitsgruppe Prof. Prusiner, UCSF, USA)

GroEL-Antikörper: Polyklonales Kaninchenserum Antikörper gegen GroEL
(Arbeitsgruppe Jörg Tatzelt, MPI, Martinsried)

Als Zweit-Antikörper wurden spezies-spezifische monoklonale Antikörper, die mit Peroxidase gekoppelt waren, eingesetzt (beide Amersham, Buckinghamshire, GB).

Der 3F4-Antikörper wurde zusätzlich zur immunologischen Aufreinigung des CHO-PrP^C eingesetzt (Kapitel 3.1.3).

3 Methoden

3.1 Aufarbeitung der lyophilisierten rekombinanten Prion-Proteine

Die über hochauflösende Flüssigkeitschromatographie aufgereinigten Lyophilisate der verschiedenen rekombinanten Prion-Proteine (Kapitel 2.4.2) enthielten Acetonitril und Trifluoressigsäure. Sie mussten daher denaturiert und wieder renaturiert werden, um sie in die native Struktur zu überführen. Die Denaturierung/Renaturierung erfolgte nach einer auf dem Protokoll aus San Francisco (Mehlhorn *et al.*, 1996) basierende Methode, die für die hier durchgeführten Experimente optimiert wurde (Jansen, 1998).

Etwa ein Milligramm des Lyophilisates wurden in 200 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ aufgenommen. Die Konzentration wurde in einer 1:100 Verdünnung in 10 mM NaP_i über die Absorption bei 280 nm bestimmt (recPrP(90-231) $\epsilon_{280\text{nm}} = 2,472 \text{ M}$; recPrP(29-231) $\epsilon_{280\text{nm}} = 2,493 \text{ M}$) und nachfolgend auf 5 mg/ml Protein eingestellt. Das Protein wurde durch Zugabe des vierfachen Volumens 8 M GdnHCl (Endkonzentration 6,4 M) vollständig denaturiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde die GdnHCl-Konzentration durch schnelles Verdünnen mit 25 mM Tris /HCl, pH 8,0 und 5 mM EDTA gesenkt (1:10-Verdünnung, Endkonzentration 0,6 M GdnHCl). Je nach eingesetzter Proteinmenge wurden die Lösungen in Centriplus-Röhrchen mit einem Ausschlußvolumen von 3000 Da (Amicon Inc., Beverly, USA) durch Zentrifugation auf 2 ml eingeeengt (ca. 4 Stunde bei 3000 g; 4600 rpm im Rotor GA10, Beckman, Palo Alto, USA). Anschließend (bei kleineren Volumina direkt) erfolgte die weitere Aufkonzentrierung in Centricon-Röhrchen mit dem gleichen Ausschlußvolumen (Amicon Inc., Beverly, USA) ebenfalls durch Zentrifugation (ca. drei Stunden bei max. 7500 g; 6400 rpm im Rotor GA10, Beckman, Palo Alto, USA). Die Centricon-Röhrchen wurden zuvor mit einer 5 %igen PEG-Lösung über Nacht abgesättigt, um die Verluste von recPrP durch Adhäsion an die Membran zu verringern. Zum Pufferwechsel wurde das Konzentrat dreimal mit 10 mM NaP_i wieder auf 2 ml aufgefüllt und nochmals aufkonzentriert. Der Überstand, der also recPrP in 10 mM NaP_i ohne SDS enthielt, wurde abgenommen. Das Protein ist in diesem Puffer aber nur begrenzt löslich, so daß der größte Teil des Proteins an der Membran oder an den Wänden des Röhrchens haftet. Dieser Anteil konnte durch Zugabe von 0,5 ml 10 mM NaP_i mit 0,2 % SDS wieder in Lösung gebracht werden. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur und mehrfachem Vortexen wurde die Lösung durch nochmalige Zentrifugation aufkonzentriert. Diese zweite Fraktion in 0,2 % SDS enthielt den größten Anteil an recPrP.

3.2 Solubilisierung von PrP27-30

Die Herstellung von solubilisierten PrP27-30 (solPrP27-30) erfolgte nach der Methode von Post *et al.* (1998). Die Pellets der Prionstäbchen (siehe 2.6.1.2) wurden mit 350 ng/440µl in 10 mM NaP_i gelöst und anschließend auf 0,2 % SDS eingestellt. Das resuspendierte PrP27-30 wurde in max. 500 µl Gesamtvolumen in einem Labsonic-U-Becherultraschallgerät (B. Braun Diessel Biotech, Melsungen) für fünf Minuten kontinuierlich bei ca. 70 Watt im *low*-Modus sonifiziert. Die Bechersonde wurde über einen sekundären Kühlkreislauf auf 4 °C gegengekühlt. Die effektive Beschallungsleistung wurde über die Aufheizung der Bechersonde während der Ultabeschallung überprüft; die durchschnittliche Temperaturerhöhung lag zwischen 6-10 °C. Die Trennung der löslichen Fraktion, im folgenden als solPrP27-30 bezeichnet, von den Prionstäbchen erfolgte durch Zentrifugation in dickwandigen 1,4 ml Polycarbonatgefäßen in der TL-100 Ultrazentrifuge mit einem Ausschwingrotor TLS-55 bei 50000 rpm für 2,5 Stunden und 4 °C (Beckman, Palo Alto, USA). Es wurden 50 µl der Meniskusfraktion abgenommen und ca. 50 µl über dem Pellet stengelassen. Die solPrP27-30-Fraktion wurde auf ihre Reinheit und PrP-Gehalt analysiert, die Ausbeuten betragen in der Regel ca. 10-20 %.

3.3 Aufreinigung des CHO-PrP^C

Die Zellkultur und anschließende Aufreinigung des CHO-PrP^C erfolgte in Anlehnung an Protokolle aus der Arbeitsgruppe Prusiner (UCSF, San Francisco, USA), letztere basierten auf der Aufreinigung von PrP^C aus Hamster-Hirn (Pan *et al.*, 1992). Die Etablierung und Optimierung der Aufreinigung von CHO-PrP^C wurde gemeinsam mit Kerstin Elfrink im Rahmen ihrer Diplom-Arbeit in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt (Elfrink, 2001).

3.3.1 CHO-Zellkultur

Die von Blochbeger *et al.* (1997) stabil transfizierten CHO-Zellen waren auf Suspensionskultur adaptiert. Die Anzucht erfolgte in *Spinner-Flasks* (Bellco Glass Inc., USA) in einem Zellkultur-Inkubator (Nunc GmbH, Wiesbaden-Biebrich) bei bis zu 5 % Kohlendioxid und 37 °C. Die Lebend-Zellzahl wurde durch eine Trypanblau-Färbung (0,4 % Trypanblau-Lösung, Life-Technologies, Eggenstein) ermittelt. Färbelösung und Zellkultur-medium wurden in gleichen Teilen gemischt und mittels Neubauer Zählkammer unter dem Mikroskop bei 40-facher Vergrößerung bestimmt. Die Zellzahl pro Milliliter ergab sich nach folgender Formel:

$$y = \frac{n * 2}{x} * 10^4 \text{ Zellen/ml mit } n := \text{Anzahl lebender Zellen}$$
$$x := \text{Anzahl gezählter Felder}$$

Eine neue Suspensionkultur wurde mit einer Zelldichte von $3-4 * 10^5$ Zellen/ml gestartet. In der Regel verdoppelte sich die Zellzahl nach ein bis zwei Tagen. Neue Nährstoffe wurden durch Zugabe von frischem Medium (Kapitel 2.3) zugeführt, dabei wurde eine Zelldichte von $3 * 10^5$ Zellen/ml nicht unterschritten. Zur Aufreinigung und Analyse wurden eine entsprechende Menge an Zellen bei 500 g für 5 min in der Untertischzentrifuge GS-6 KR mit dem Rotor S/N 15688 (Beckman, Palo Alto, USA) pelletiert.

3.3.2 Zellyse

Bei PrP^C handelt es sich um ein Membranprotein, daher wurde als erster Schritt der Aufreinigung eine Membranextraktion gewählt, um cytosolische Proteine zu entfernen. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

Die pelletierten Zellen ($\leq 5 * 10^8$ Zellen/ml) wurden im Dounce-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Mit einem engen Dounce-Homogenisator (B. Braun Diessel Biotech, Melsungen) wurde die Suspension 20-30 mal behandelt und anschließend mit Tonicity-Puffer die Osmolarität wiederhergestellt, um ein Aufbrechen der Kerne zu vermeiden. Die Kerne wurden durch Zentrifugation für fünf Minuten bei 1000 g in der Untertischzentrifuge GS-6 KR mit dem Rotor S/N 15688 (Beckman, Palo Alto, USA) pelletiert. Daraufhin wurde der Überstand S1 (nach Supernatant) für eine Stunde bei 100.000 g im SW28-Rotor in der L8-55 Ultrazentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA) zentrifugiert, dabei pelletierten die Membranen während die cytosolischen Proteine im Überstand verblieben. Die Solubilisierung des CHO-PrP^C erfolgte durch Inkubation des Pellets P2 mit 0,5 % NP-40 und 0,5 % DOC im Lysis-Puffer für eine Stunde unter schütteln bei 4 °C. Lösliche Bestandteile wurden von unlöslichen durch Zentrifugation für 15 min bei 10.000 g im SW28-Rotor in der L8-55 Ultrazentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA) abgetrennt. Der Überstand S3 wurde auf die IMAC-Säule (Kapitel 3.3.3) aufgegeben.

Teilweise wurde auf die Entfernung der cytosolischen Proteine verzichtet und die Zellyse direkt durch Inkubation in Lysis-Puffer durchgeführt.

Dounce-Puffer:	10 mM NaPi, pH 7,2	0,5 % DOC
	0,5 mM MgCl ₂	10 mM NaPi, pH 7,2
	1 μM Pepstatin	0,5 mM MgCl ₂
	1 μM Leupeptin	1 μM Pepstatin
	2 mM PMSF	1 μM Leupeptin
		2 mM PMSF
Tonicity-Puffer:	10 mM NaP _i , pH 7,2	1 mM EDTA
	0,6 M NaCl	
	1 μM Pepstatin	
	1 μM Leupeptin	
	2 mM PMSF	
Lysis-Puffer:	0,5 % NP-40	

3.3.3 Kupfer- immobilisierte Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)

Das Prinzip einer IMAC basiert auf einer spezifischen Wechselwirkung von Proteinen mit immobilisierten zweiwertigen Kationen. In diesem Fall kann CHO-PrP^C mit den Histidinen im Octarepeat Bereich (Kapitel 1.1.2) Cu²⁺ koordinativ binden. Dieser Octarepeat ist auch für Bindung von Cu²⁺ durch PrP^C *in vitro* und in Zellkultur (Brown *et al.*, 1997b) verantwortlich, über deren physiologische Bedeutung derzeit spekuliert wird. Die Elution erfolgte durch Verdrängung der Histidine durch Imidazol.

Eine Chromatographie-Säule (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) wurde mit 100 ml *Chelating Fast-Flow Sepharose* (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) gepackt. Die Beladung mit Cu²⁺ erfolgte durch Waschung mit 400 ml CuSO₄ (5 mg/ml). Anschließend wurde mit 200 ml H₂O_{deion.} und 300 ml 10 mM Imidazol in MOPBS gewaschen, wobei sich die Farbe des Säulenmaterials von einem blassem Blau zu einem leuchtendem Blau änderte.

Im Anschluss daran wird die Säule an die LKB-Peristaltikpumpe (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) angeschlossen und mit 200 ml 1 mM Imidazol, 0,2 % Zwittergent 3-12 in MOPBS equilibriert. Das solubilisierte Protein S3 (Kapitel 3.3.2) wurde auf 1 mM Imidazol eingestellt und mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die IMAC aufgetragen. Unspezifisch und oder schwach gebundene Proteine wurden durch Waschung mit 300-400 ml 1 mM Imidazol und 0,2 % Zwittergent 3-12 in MOPBS und 200 ml 15 mM Imidazol und 0,2 % Zwittergent 3-12 in MOPBS entfernt. Die Elution erfolgte durch 150 mM Imidazol und 0,2 % Zwittergent 3-12 in MOPBS.

Während der gesamten Chromatographie wurden Fraktionen unterschiedlicher Größe entweder per Hand oder mit Hilfe eines Fraktionssammlers LKB (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) gesammelt und die Absorption bei 280 nm und 400 nm im Spektralphotometer DU 640 (Beckman, Palo Alto, USA) bestimmt. Die Elutionsfraktionen, die Protein enthielten, wurden vereinigt und für die 3F4-Antikörper-Affinitäts-Chromatographie verwendet.

Die Regeneration der Säule erfolgte durch Waschen mit 250 ml 50 mM EDTA und 0,2 % Zwittergent 3-12 in MOPBS, gefolgt von 250 ml 0,1 M Salzsäure und 250 ml 0,1 M Natronlauge. Die Säule wurde mit MOPS-Puffer neutralisiert und in MOPBS mit 2 mM Na-Azid gelagert.

3.3.4 3F4-Antikörper-Affinitäts-Chromatographie

Die Antikörper-Affinitäts-Chromatographie basiert auf einer spezifischen Bindung des gewünschten Proteins an einen Antikörper. In der hier durchgeführten Affinitäts-Chromatographie wurde der PrP-spezifische monoklonale Antikörper 3F4 (Kascsak *et al.*, 1987) an Protein G-Agarose immobilisiert und durch den ImmunoPure Plus®-Kit (Perbio Science Deutschland, Bonn) kovalent verknüpft.

Die Antikörpersäule wurde mit 0,2 % Zwittergent 3-12 in MOPBS equilibriert und mit dem IMAC-Pool bei einer Flussrate von 0,5 ml/min beladen. Anschließend wurde mit 0,2 % Zwittergent 3-12 in MOPBS gewaschen. Die Elution erfolgte mit 0,2 % Zwittergent 3-12 und 150 mM NaCl in 0,1 M Essigsäure. Der pH-Wert des Eluats wurde durch Vorlegen eines entsprechenden Volumens an 100 mM NaP_i pH 7,2 neutralisiert. Auch hier wurden während der gesamten Chromatographie Fraktionen unterschiedlicher Größe entweder per Hand oder mit einem Fraktionssammlers (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) gesammelt und die Absorption bei 280 nm und 400 nm im Spektralphotometer DU 640 (Beckman, Palo Alto, USA) bestimmt. Die Elutionsfraktionen, die Protein enthielten, wurden vereinigt und in Centricon-Röhrchen mit 3000 kDa Ausschlußvolumen (Amicon Inc., Beverly, USA) aufkonzentriert (siehe unten).

Die Antikörpersäule wurde mit 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 neutralisiert und in MOPBS mit 2 mM Na-Azid gelagert.

3.3.5 Aufkonzentrierung und Umpufferungen

Das in dieser Arbeit verwendete *in vitro* Konversionssystem basiert auf geringen Konzentrationen von SDS im Ausgangsmaterial. Da das Eluat der Antikörpersäule in Zwittergent 3-12 vorliegt und um das CHO-PrP^C aufzukonzentrieren, wurden Centricon-Röhrchen mit 3000 kDa Ausschlußvolumen (Amicon Inc., Beverly, USA) verwendet. Die Centricon-Röhrchen wurden zuvor mit einer 5 %igen PEG-Lösung über Nacht abgesättigt: Das Eluat wurde durch Zentrifugation (ca. drei Stunden bei max. 7500 g; 6400 rpm im Rotor GA10, Beckman, Palo Alto, USA) auf < 200 µl eingeeengt, mit 2 ml 10 mM NaP_i, pH 7,2 aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde viermal wiederholt um das Detergenz vollständig zu entfernen. Anschließend wurde mit 500 µl 0,2 % SDS, 10 mM NaP_i, pH 7,2 aufgefüllt und erneut aufkonzentriert.

3.4 Induktion der *in vitro*-Aggregation

Nach dem von Post *et al.* (1998) etablierten *in vitro*-Konversionssystem (Kapitel 1.1.5) wird die Konversion durch Ausdünnen des SDS induziert. Dabei wurden entsprechende Konzentrationen des Proteins in 10 mM NaP_i mit 0,2 % SDS vorgelegt und anschließend mit 10 mM NaP_i verdünnt, so dass die SDS-Konzentration unter 0,01 % liegt.

Der Einfluss verschiedener zusätzlicher Komponenten wurde entweder durch Zugabe der Komponente vor oder mit dem Ausdünnen des SDS untersucht. Bei den Untersuchungen mit GroEL wurde darauf geachtet, dass GroEL nur unter niedrigen SDS-Konzentrationen (< 0,07 %, Kapitel 4.5) mit PrP vorinkubiert wurde. Teilweise wurden die Untersuchungen auch ohne Vorinkubation durchgeführt, so dass GroEL im Ausdünnungspuffer gelöst war.

3.5 Solubilisierungsspin

Durch differentielle Ultrazentrifugation kann die Löslichkeit eines Proteins bestimmt werden. Nach Hjelmeland (1984) gelten Partikel, die sich nach Zentrifugation für eine Stunde bei 100.000 g im Überstand befinden, als löslich. Die Proben wurden für eine Stunde mit 42.000 rpm (TLA-45 Festwinkel-Rotor) bei 25° C in der Beckman Optima TM TL Ultrazentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in 0,2 % SDS 10 mM NaP_i resuspendiert und für fünf Minuten bei 100 °C inkubiert. Der relative Proteinanteil in Überstand und Pellet wurde mittels Gelelektrophorese und Western-Blot (Kapitel 3.9 und 3.10.1) oder Dot Blot (Kapitel 3.10.2) bestimmt.

3.6 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Mit Hilfe der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie können Diffusionszeiten von Molekülen in Lösung bestimmt werden. Über die ermittelten Diffusionszeiten können Aussagen über das Molekulargewicht der untersuchten Teilchen gemacht werden. Erste theoretische Überlegungen zur konfokalen Fluoreszenzspektroskopie wurden schon 1916 von Smoluchowski gemacht, das Prinzip der FCS und erste Experimente stammen jedoch von Elson & Magde (1974) sowie Ehrenberg & Rigler (1974).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden mit einem Confocor® (Evotec BioSystems GmbH, Hamburg, und Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) gemacht. Als Probengefäß wurden Acht-Kammer Zellschalen (Nunc Inc., Naperville, USA) verwendet.

3.6.1 Prinzip der FCS-Messung

Fluoreszenzmarkierte Moleküle in einer Probe werden durch einen Laser angeregt. Mittels einer speziellen, dreidimensional abbildenden Lochblende wird nur die Fluoreszenz aus einem sehr kleinen, konfokalen Volumenelement detektiert (Abbildung 3.1A,B). Durch seine hohe Intensität und den geringen Öffnungswinkels des Lichtstrahles ist ein Laser hierfür besonders geeignet. Der beleuchtete Fokus hat ein Volumen von etwa einem Femtoliter, also 10^{-15} l und entspricht damit in etwa der Größe einer Bakterienzelle. Die zu untersuchenden Moleküle liegen in niedriger Konzentration (nanomolar) vor, so dass sich zu einem gegebenen Zeitpunkt nur wenige Moleküle, im Idealfall nur ein einziges, im Fokus befinden. Unter diesen Bedingungen ist die Fluktuation der Fluoreszenz am größten.

Diese Fluoreszenzfluktuation wird zeitaufgelöst vom Detektor aufgezeichnet (Abbildung 3.1C). Aus dieser Messung kann berechnet werden, wie lange sich ein einzelnes Molekül im Mittel im beleuchteten Volumenelement aufgehalten hat.

Die Auswertung der Fluoreszenzfluktuation erfolgt durch Autokorrelation, da der Diffusionsprozeß und damit die Bewegung der Moleküle durch den Fokus zufallsbedingt ist. Dabei wird die Abweichung der Fluoreszenz vom Mittelwert für einen bestimmten Zeitpunkt t gemessen und mit der Abweichung zum Zeitpunkt $t + \tau$ multipliziert. Dieses Produkt wird durch das Quadrat der mittleren Fluoreszenzintensität normalisiert. Jeder dieser Werte wird als zeitliches Mittel über die gesamte Messzeit, $\langle \rangle$, angegeben. Die Autokorrelationsfunktion lautet also:

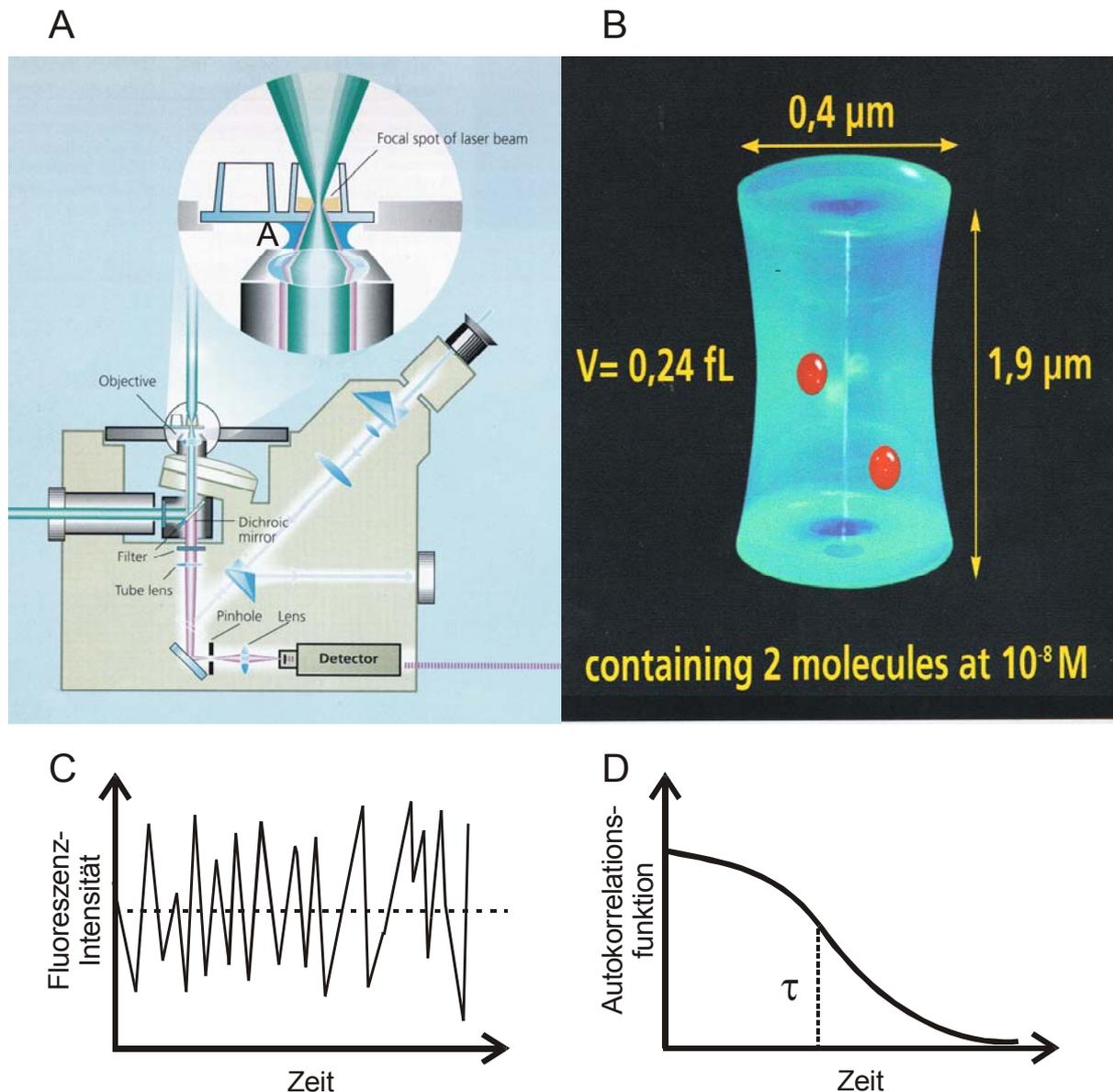


Abbildung 3.1 (A) Schematische Darstellung des Strahlenganges des FCS
 (B) Schematische Darstellung des konvokalen Volumenelementes aus dem die Fluoreszenz-Fluktuation aufgezeichnet wird.
 (C) Zeitaufgelöste Aufzeichnung der Fluoreszenz-Fluktuation.
 (D) Aus der Fluoreszenz-Fluktuation berechnete Autokorrelationsfunktion.

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} + 1 \quad \text{Gl. 1}$$

mit $\delta F(t)$ = Abweichung der Fluoreszenz vom Mittelwert zum Zeitpunkt t
 $\delta F(t + \tau)$ = Abweichung der Fluoreszenz vom Mittelwert zum Zeitpunkt $t + \tau$
 $\langle \rangle$ = zeitliches Mittel („Mittelwert“ über die gesamte Messzeit)
 $\langle F(t) \rangle$ = zeitliches Mittel der Fluoreszenz

An der Stelle $\tau = 0$ gilt:

$$G(0) = \frac{1}{\langle n \rangle} + 1 \quad \text{Gl. 2}$$

mit $\langle n \rangle$ als die mittlere Anzahl der Moleküle im Fokus. Wird G gegen τ aufgetragen (Abbildung 3.1D), so kann die mittlere Diffusionszeit der Moleküle, τ_c , durch den Wendepunkt der Kurve bestimmt werden.

Die Autokorrelation erfolgt automatisch während der Messung mit Hilfe einer Korrelatorkarte im Computer. Aus dieser Kurve können verschiedene Molekülparameter mit Hilfe der Access Fit[®] Software (Evotec BioSystems GmbH, Hamburg, Version 1.1 sowie 2.0) berechnet werden. Hierzu wird eine theoretische Autokorrelationsfunktion (Gl. 3) durch Variation der entsprechenden Parameter der gemessenen Kurve angenähert. Die Autokorrelationsfunktion zur Berechnung der Molekülparameter lautet:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{n} \left(\frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_c}\right) \sqrt{1 + \frac{\tau}{k^2 \cdot \tau_c}}} \right) \quad \text{Gl. 3}$$

- mit
- k = Strukturparameter (Eigenschaft des Beleuchtungsfokus)
 - n = mittlere Anzahl der Moleküle im Beleuchtungsfokus
 - τ = Korrelationszeit
 - τ_c = mittlere Diffusionszeit der Moleküle durch den Fokus

3.6.2 Messung mehrerer Komponenten

Befinden sich mehrere fluoreszierende Moleküle in der Probe, können die Diffusionszeiten dennoch durch FCS bestimmt werden. Bis zu drei verschiedene Molekülarten können gleichzeitig bestimmt werden. Die Korrelationskurve zeigt dann mehrere Wendepunkte (Abbildung 3.2), die den einzelnen Diffusionszeiten entsprechen. Da die Diffusionszeit proportional zur dritten Wurzel des Molekulargewichtes ist, führt ein Anstieg des Molekulargewichtes um Faktor acht nur zu einer Verdoppelung der Diffusionszeit. Daher sollten sich die Moleküle deutlich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden, d.h. um mindestens Faktor acht.

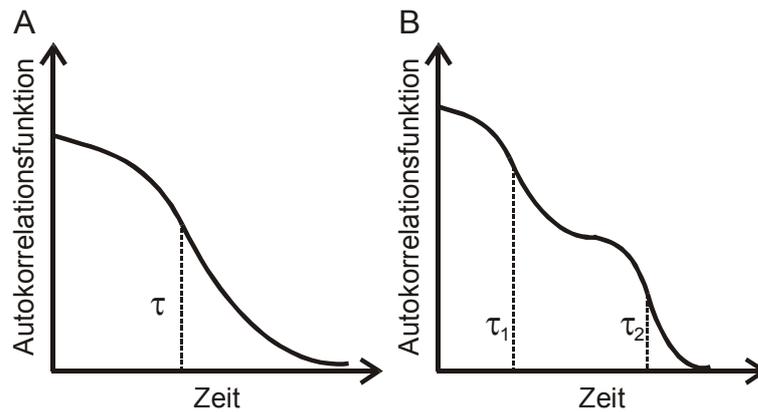


Abbildung 3.2 Korrelationskurven für eine Komponente (A) und für zwei Komponenten (B).

3.6.3 Fluoreszenzmarkierung von Proteinen für die FCS Messungen

Für die FCS Messungen werden fluoreszierende Partikel benötigt. Proteine können kovalent mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt werden. Für die Fluoreszenzmarkierung von recPrP wurde das grün fluoreszierende Cyanin FluoroLink™ Cy2™ (Amersham Life Science, Lit. Chalfont, GB; Abbildung 3.3), im folgenden als Cy2 bezeichnet, verwendet.

Cy2 ist ein verhältnismäßig großes Molekül (MW=897 Da), das aber im Gegensatz zu den meisten anderen Fluoreszenzfarbstoffen relativ hydrophil ist. Eine Eigenschaft die für die Untersuchung von Aggregationsprozessen entscheidend ist, da der Farbstoff alleine das Aggregationsverhalten möglichst nicht beeinflussen sollte und auf keinen Fall selbst die Aggregation induzieren darf.

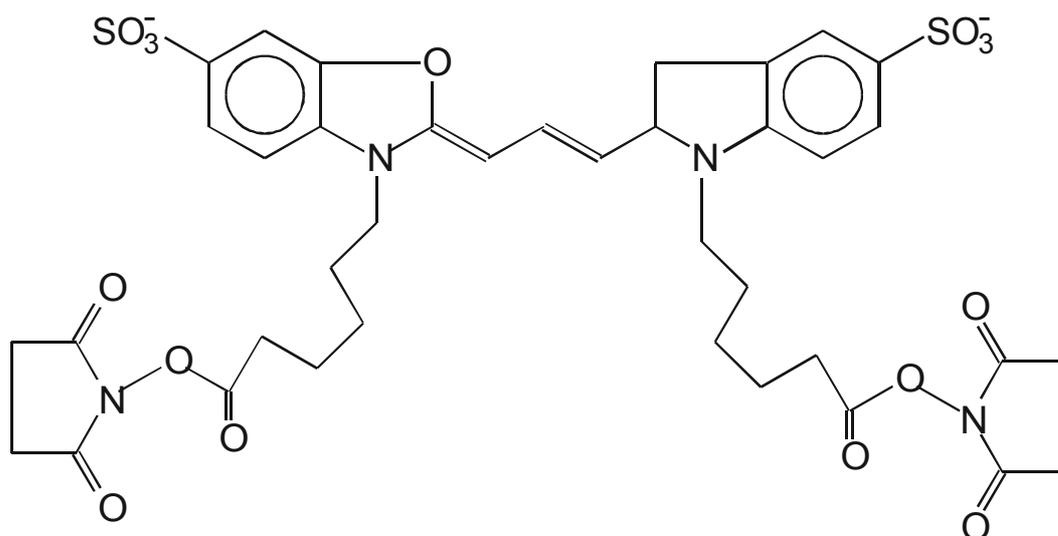


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung des Cyanin FluoroLink™ Cy2™

Die Kopplung an das Protein erfolgt durch Bildung eines Carboxamids aus einer primären Aminogruppe des Proteins und einer der beiden Succinimidylestergruppen des Farbstoffs (Abbildung 3.4).

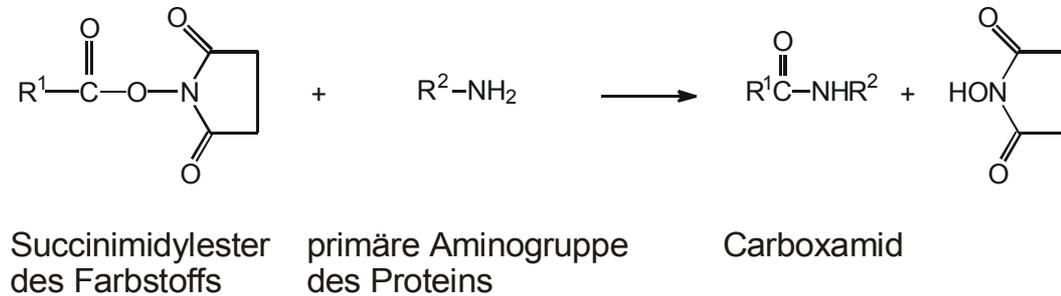


Abbildung 3.4 Reaktionsmechanismus der Bindung von Cy2 an Proteine.

Ansatz zur Fluoreszenzmarkierung: 10-50 µg Protein
 3 µl Cy2 in 30 µl DMSO
 0,2 % SDS
 20 mM Natriumphosphat pH 8,4

Die Markierung erfolgte durch Inkubation für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur, wobei der Ansatz mehrfach gevortext wurde.

Das markierte Protein wurde anschließend durch Größenausschlußchromatografie (NAPTM5 Säulen, Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) von überschüssigem freien Farbstoff getrennt: Die Säulen wurden mit 15 ml Elutionspuffer equilibriert. Anschließend wurde die Probe und 900 µl Elutionspuffer auf die Säule gegeben. Die ersten 400 µl des Eluats wurden verworfen und die folgenden 600 µl in Aliquots zu 150 µl gesammelt und im Spektralphotometer DU 640 (Beckman, Palo Alto, USA) analysiert. In der Regel enthielten die Fraktionen zwei und drei die größte Menge an Protein. Sie wurden auf eine zweite Säule aufgetragen und durch Zugabe von Elutionspuffer eluiert. Die ersten 550 µl des Eluats wurden verworfen. Danach wurden jeweils 150 µl Fraktionen gesammelt, die sowohl photometrisch wie auch durch FCS analysiert wurden. Die Abtrennung des freien Farbstoffs gelang mit der beschriebenen Methode nicht vollständig (ca. 40 bis 70 % nach FCS). Das störte bei den FCS-Messungen allerdings nicht, weil das markierte Protein und der freie Farbstoff sich in ihrem Molekulargewicht deutlich unterschieden und als zwei getrennte Komponenten erkannt wurden.

Elutionspuffer: 150 mM NaCl
 0,2 % SDS
 10 mM NaP_i, pH 7,2

3.7 Circular-Dichroismus-Spektroskopie

Asymmetrische Moleküle können verschiedene Absorptionskoeffizienten für rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht besitzen. Die Differenz dieser Absorptionskoeffizienten wird bei der Circular-Dichroismus (CD)-Spektroskopie gemessen. Der CD-Effekt bei Proteinen wird durch die asymmetrische Sekundärstruktur verursacht. Typische Sekundärstrukturelemente wie α -Helix oder β -Faltblatt zeigen jeweils unterschiedliche CD-Spektren im fernen UV-Bereich (170 - 260 nm). Durch Messung des CD-Spektrums lässt sich deshalb auf die relativen Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente zurückschließen (Abbildung 3.5).

Die im Rahmen dieser Arbeit gemessenen Spektren wurden mit dem Spectralpolarimeter J715 (Jasco® Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt) aufgezeichnet. Es wurden Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm (200 μ l Volumen) oder Mikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm (ca. 90 μ l Volumen; beide Helma, Müllheim) verwendet. Für Messungen wurden Proteinkonzentrationen von etwa 0,05-0,5 mg/ml bzw. 3,1-31 μ M recPrP(90-231) (1 mm Küvette) oder etwa 0,01 mg/ml bzw. 0,61 μ M recPrP(90-231) (0,1 mm Mikroküvette) eingesetzt.

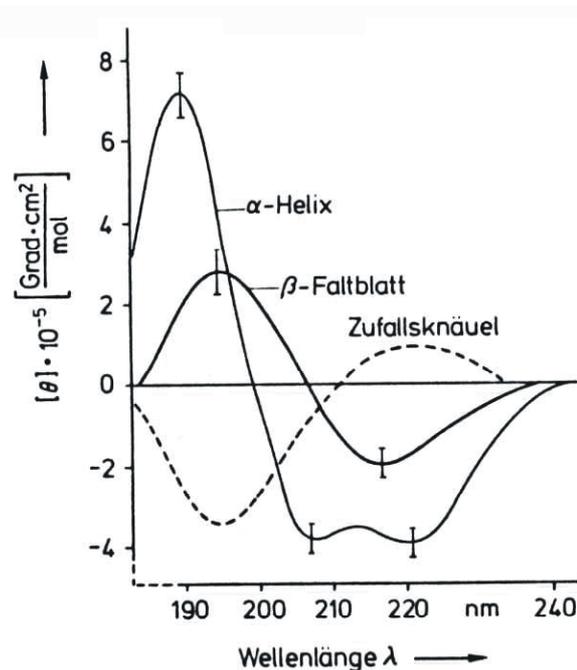


Abbildung 3.5 CD-Spektren typischer Sekundärstrukturelemente (nach Greenfield & Fasman, 1969)

Die Spektren wurden in der 1 mm Küvette bei Raumtemperatur von 185 bis 260 nm bei einer Auflösung von 1 nm und einer Responsezeit von 4 s aufgezeichnet. In den Mikroküvetten ist eine Messung unter 200 nm nicht möglich.

Um eine Ozonbildung zu unterbinden, wurde die Probenkammer für Messungen unter 200 nm mit max. 12 l Stickstoff pro Minute, sonst mit 4-6 l/min, gespült. Für jede Probe wurden 5-10 Spektren aufgenommen, gemittelt und um das entsprechende Pufferspektrum korrigiert. Zu Beginn jeder Messreihe wurde das Gerät mit Ammonium-d-Campher-10-sulfat geeicht.

Die Proteinkonzentration kann aus dem parallel aufgezeichneten Absorptionssignal über die Absorption der Peptidbindung bei 205 nm abgeschätzt werden. Nach Scopes (1974) entsprechen 31 Absorptionseinheiten bei 205 nm einem Milligramm Protein.

3.8 Proteinase K-Verdauung

Zur Charakterisierung der unter verschiedenen Bedingungen aggregierten Prion Proteine wurde die Proteinase K (PK)-Stabilität bestimmt. Dabei wurden die Proben für 1-60 min bei -4 bis 37 °C inkubiert. Die PK-Aktivität wurde durch Einstellen von 7,5 mM PMSF, Zugabe von einem Volumen Laemmli-Auftragspuffer und nachfolgender Denaturierung für 5 min bei 100 °C gestoppt. Die Verdauungen wurden in der Regel in silanisierten Reaktionsgefäßen durchgeführt, um ein irreversibles Anhaften der aggregierten Proteine an die Gefäßwand zu vermeiden. Die Silanisierung der Reaktionsgefäße erfolgte in Bechergläsern im Exikator. Etwas 200 µl Dimethyl-dichlorsilan (Fluka, Neu-Ulm) wurden in ein mit Reaktionsgefäßen gefülltes 250 ml Becherglas gegeben und nach mehrfachem Vakuumziehen und belüften über Nacht im Exikator inkubiert.

3.9 Proteingelelektrophorese

Mit Hilfe einer denaturierenden, diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (1989). Hierzu wurde eine Hoefer SE 600 Gelelektrophoresekammer von Pharma Biotech (San Fransisco, USA) mit vertikalen Plattengelen verwendet. Zunächst wurde, wenn nicht anders angegeben ein 12 %iges Trenngel gegossen und mit Isobutanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isobutanol abgegossen und mit einem 3 oder 5 %igem Sammelgel überschichtet.

Die Proben wurden mit Auftragspuffer gemischt und 5 Minuten bei 100° C inkubiert und nach dem Auftragen für 15-20 Minuten bei 180 V ins Sammelgel einlaufen gelassen. Anschließend wurde das Gel für ca. zwei bis drei Stunden bei 210 V oder über Nacht bei 30-40 V elektrophoresiert. Zur Molekulargewichtsbestimmung der Probe wurde ein Molekulargewichtsmarker (Tabelle 3.1) aufgetragen.

Tabelle 3.1 Molekulargewichtsmarker (GIBCO BRL® (Life Technologies, USA))

gefärbte Proteine	Molekulargewicht [kDa]	apparentes Molekulargewicht [kDa]
Lysozym	14,3	14,530
β-Lactoglobulin	18,4	19,740
Carboanhydrase	29,0	28,685
Ovalbumin	43,0	45,475
Rinderserumalbumin	68,0	71,775
Phosphorylase	97,4	96,730
Myosin (H-Kette)	200,0	220,950

10 x Laemmli (Gelelektrophoresepuffer)

0,25 M Tris/HCl pH 8,3
1,9 M Glycin

Bei der Elektrophorese wurde eine 1:10-Verdünnung eingesetzt, der 0,1 % SDS (Endkonzentration) zugesetzt wurde.

Auftragspuffer nach Laemmli

70 mM Tris/HCl, pH 6,8
5 % 2-β-Mercaptoethanol
2 % SDS
5 % Glycerin
0,05 % Bromphenolblau

Angegeben sind die Endkonzentrationen in den für die Elektrophorese vorbereiteten Proben.

Trenngel

380 mM Tris/HCl, pH 8,8
12 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)
0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)
0,1 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
0,1 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)

Sammelgel

124 mM 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
3 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)
0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)
0,1 % TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)
0,1 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)

3.9.1 Silberfärbung

Mit Hilfe der Silberfärbung kann bis zu 50 ng Protein pro Bande nachgewiesen werden (Merril *et al.*, 1981; Keukeshoven *et al.*, 1985). Die Silberfärbung von Proteingelen ist somit sensitiver als die Coomassie-Färbung (Kapitel 3.9.2), sie lässt aber keine quantitativen Aussagen zu.

Fixierung:	50 % Ethanol	20 min
	10 % Essigsäure	(optional über Nacht)
Waschung:	10 % Ethanol	10 min
	5 % Essigsäure	

Oxidierer:	0,05 %	Natriumcarbonat	1 min
	0,15 %	Kaliumhexacyanoferrat	
	0,3 %	Natriumthiosulfat	
Waschung:		H ₂ O _{deion}	3x 10 min
Färbung:	0,2 %	Silbernitrat	20 min
Waschung:		H ₂ O _{deion}	3x 5 min
Entwicklung:	3 %	Natriumcarbonat	nach Bedarf
	0,02 %	Formaldehyd	
Waschung:	1 %	Essigsäure	10 min

3.9.2 Coomassie-Färbung

Die Proteingele wurden nach Neuhoff *et al.* (1985) zum Proteinnachweis Coomassie gefärbt. Die Coomassiefärbung hat eine Nachweisempfindlichkeit von 5-10 ng Protein pro Bande und kann zur vergleichenden quantitativen Proteinkonzentrationsbestimmung herangezogen werden.

Fixierung:	25 %	Isopropanol	1 h
	10 %	Essigsäure	
Färbung:	0,1 %	Coomassie Brilliant Blue G-250	2 h
	50 %	Methanol	(optional über Nacht)
Entfärbung:	50 %	Methanol	nach Bedarf
	10 %	Essigsäure	

3.10 Blotting-Techniken

3.10.1 Semi-Dry-Blot

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung können Proteine durch den Semi-Dry-Blot auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen werden. In der Regel wurde das Sammelgel vom Trenngel getrennt und verworfen. Das Gel wurde, ebenso wie die Chromatografiepapiere und die durch Ethanol-Benetzung aktivierte Membran, 10 min in 1 x Laemmlipuffer (Kapitel 3.9.1) geschwenkt. Der Aufbau in der „Semi-Dry Electrophoresis Transfer Cell“ (Biorad, Hercules, USA) bestand aus drei Chromatografiepapieren, der Membran, dem Gel und weiteren drei Papieren. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei 150 mA pro Gel und max. 20 Volt.

3.10.2 Dot-Blot

Beim „Dot-Blot“-Verfahren wird das zu untersuchende Protein direkt unter Vakuum auf eine PVDF-Membran (Millipore GmbH, Neu Issenburg) übertragen. Es wurde eine Apparatur mit 96 Probenlöchern (S & S Minifold I, Schleicher & Schuell, Dassel) verwendet. Die PVDF-Membran wurde durch Benutzung mit Ethanol aktiviert und anschließend zusammen mit einem Chromatografiepapier (Whatman 3MM Chr) in TBST geschwenkt. Der Aufbau bestand aus der unteren Kammer, dem Chromatografiepapier, der Membran und der oberen 96-Lochplatte. Nach Anlegen des Vakuums wurde zunächst jedes Loch zweimal mit je 100 μ l 10 mM NaP_i gespült. Dann wurden die Proben mit einem Volumen von ca. 100 μ l unter geringem Vakuum pipettiert. Anschliessend folgten zwei weitere Waschschrirte mit je 100 μ l 10 mM NaP_i. Die Detektion des Proteins erfolgte durch immunologischen Nachweis (3.11). Da der PrP-spezifische Erstantikörper 3F4 besser denaturiertes Protein erkennt, wurde die Membran vor Durchführung des immunologischen Nachweises für 5 min in 1 % KOH geschwenkt.

3.11 Immunologischer Proteinnachweis

Die freien Bindestellen für Proteine auf der PVDF-Membran wurden zunächst durch Schwenken in TBST mit 5 % Milchpulver (Frema-Reform, DE-VAU-GE, Lüneburg) für zwei Stunden (optional über Nacht) abgesättigt. Dann wurde die Membran kurz mit TBST abgespült und mit einem spezifischen Erstantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (optional über Nacht bei 4°C). Anschließend wurde die Membran dreimal für je fünf Minuten mit TBST gewaschen. Als Nachweisantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper aus dem ECL-Western-Blot Detection System (Amersham, Chalmont, GB) verwendet. Er wurde in einer 1:5000-Verdünnung in TBST eingesetzt, die Inkubation erfolgte für eine Stunde. Durch dreimaliges Waschen für jeweils 10 min wurde nicht gebundener Antikörper entfernt.

Der Nachweis erfolgte durch Chemolumineszenz. Das Detektionsreagenz enthält Luminol, das von der an den Zweitantikörper gekoppelten Peroxidase oxidiert wird. Bei dieser Reaktion wird Energie in Form von Licht abgegeben (Abbildung 3.6). Die Lichtemission hält etwa eine Stunde lang an. Die Membran wurde für eine Minute mit Detektionsreagenz benetzt, und die Lumineszenz wurde durch 0,5 bis 5-minütiger Exposition eines Röntgenfilms (Kodak-X-OMAT TM, Sigma, St. Louis, USA) detektiert.

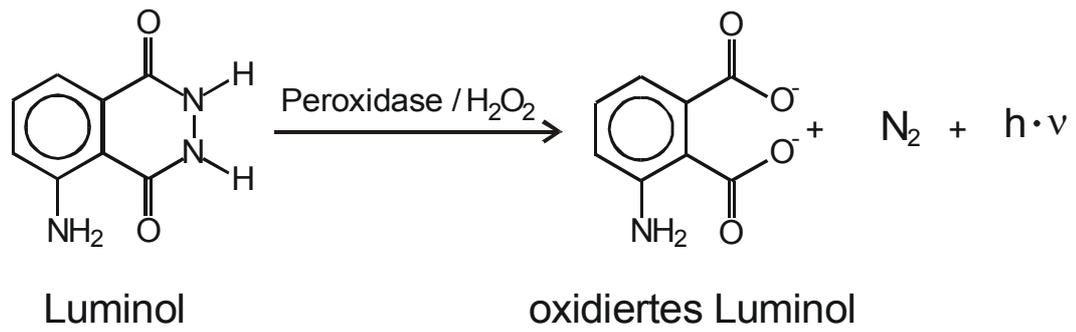


Abbildung 3.6 Reaktionsmechanismus für die Lumineszenzreaktion mit dem ECL-System.

TBST (Tris Buffer Sodium Tween):	10 mM	Tris/HCL pH 8,0
	150 mM	NaCl
	0,01 %	Tween 20

4 Ergebnisse

4.1 Aufreinigung von CHO-PrP^C

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst ein Zellkultursystem für die Expression von posttranslational modifiziertem PrP mit anschließender Aufreinigung etabliert werden. Hierfür war die Einrichtung eines zusätzlichen Labors für tierische Zellkulturen unter S2-Bedingungen notwendig. Die transfizierten CHO-Zellen wurden uns aus dem Labor S.B. Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt. In Abbildung 4.1 ist die verwendete Strategie zur Aufreinigung des PrP^C dargestellt, sie bestand aus drei Schritten: Lyse und Solubilisierung, Cu-IMAC und 3F4-Antikörper-Affinitätschromatographie. Sie beruht auf einem in San Francisco etablierten Protokoll, dass auf einem Protokoll zur Aufreinigung von PrP^C aus Hamster-Hirn basierte (Pan *et al.* 1992).

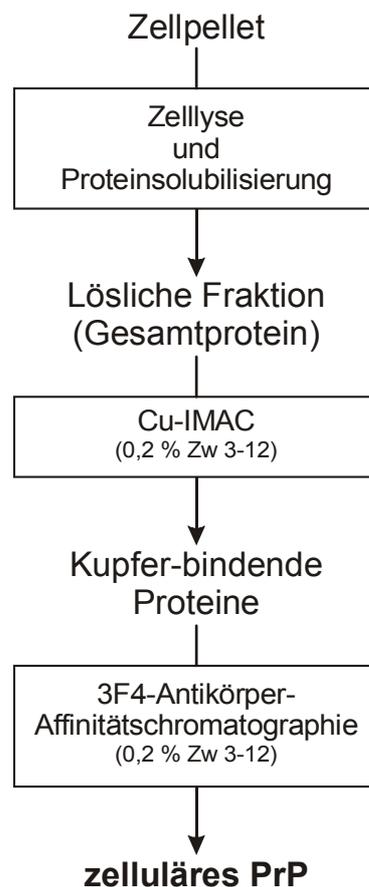


Abbildung 4.1 Strategie zur Aufreinigung des PrP^C aus CHO-Zellkultur.

Die in Suspensionskultur vermehrten Zellen wurden abzentrifugiert und lysiert. Die Solubilisierung des PrP^C aus der Zellmembran erfolgte entweder im Anschluss an eine Membranpräparation oder direkt während der Zellyse mit verschiedenen Detergenzien. Die weitere Reinigung erfolgte in zwei Schritten mittels Cu-IMAC und 3F4-Antikörper-Affinitätschromatographie. Bei der Chromatographischen Aufreinigung erfolgte ein Wechsel vom Solubilisierungs-Detergenz auf Zwittergenz 3-12 (Zw 3-12).

4.1.1 Zellyse und Solubilisierung des CHO-PrP^C

Zellyse und Solubilisierung des membranständigen PrP^C war der erste Schritt bei der Aufreinigung, da Löslichkeit die Voraussetzung für die weitere chromatographische Aufreinigung war. Alternativ konnte beides zusammen in einem Schritt erfolgen oder eine vorherige Membranpräparation mit anschließender Solubilisierung der Membranproteine durchgeführt werden. Im ersten Fall wurden die pelletierten Zellen in Detergenz enthaltenden Puffern inkubiert und anschließend die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen durch Zentrifugation getrennt. Dabei erhielt man sowohl die löslichen cytosolischen als auch die solubilisierten Membranproteine. Der Zusatz von Detergenzien soll die Zellen aufbrechen, aber die Zellorganellen intakt lassen, da vor allem freigesetzte DNA die weitere Probenhandhabung erschwert. Es wurden verschiedene Detergenzien einzeln oder in Kombination getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Tabelle 4.1 Vergleich verschiedener Detergenzien bei der Aufreinigung von CHO-PrP^C:

Detergenz	Methode*	DNA Freisetzung	Solubilisierungs Ergebnisse	Chromatographische Reinigung
0,5 % NP-40, 0,5 % DOC	Lyse Dounce	nein	gut	gut
Octylglucoside (versch. Konz.)	Lyse Dounce	nein	gut	nicht getestet ¹
Zwittergent 3-12 (versch. Konz.)	Lyse Dounce	nein	mässig gut	nicht getestet gut
Triton X-100	Lyse	nein	sehr gut	nicht möglich
0,2 % SDS	Lyse	ja	schlecht	nicht getestet
0,4 % Saponin, 1 % DOC	Lyse	ja	schlecht	nicht getestet

* Lyse: Zellyse und Solubilisierung in einem Schritt

Dounce: mechanische Zellyse und anschließende Solubilisierung

¹ Ergebnisse der Solubilisierung waren mit anderen Detergentien vergleichbar, so dass auf die chromatographische Reinigung aus Kostengründen verzichtet wurde.

Triton-X-100 hatte gute Solubilisierungseigenschaften, war aber für die weitere chromatographische Aufreinigung über die Cu-IMAC ungeeignet. Dieses Ergebnis stimmten mit Erfahrungen aus der Aufreinigung von PrP^C aus Hamster-Hirn überein, wonach sehr große Micellen durch Triton-X-100 gebildet werden und dadurch eine Löslichkeit vorgetäuscht wird (Persönliche Mitteilung J. Safar). Zur zusätzlichen Reinigung des CHO-PrP^C wurde eine Membranpräparation vor der Solubilisierung durchgeführt. Dabei wurden die

Zellen hypertonisch mit einem Dounce-Homogenisator aufgebrochen, die Kerne abgetrennt und anschließend die Membranen pelletiert (Kapitel 3.2.2). Das CHO-PrP^C wurde anschließend mit verschiedenen Detergenzien aus den Membranen solubilisiert. Auch diese Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Durch die Membranpräparation konnte der größte Teil des cytosolischen Proteins bereits im ersten Schritt entfernt werden. Ein erheblicher Teil des PrP^C ging allerdings schon bei der Pelletierung der Kerne verloren.

Spätere Optimierungen der Solubilisierung mit anschließender standardisierter Chromatographie, die im Rahmen einer Diplomarbeit durchgeführt wurden (Elfrink, 2001), zeigten, dass die Aufreinigung ohne eine Abtrennung der cytosolischen Proteine am effektivsten, bezogen auf das Verhältnis von Reinheit zu Ausbeute, war. Die Zellen wurden vor der chromatographischen Aufreinigung in 0,5 % NP-40 und 0,5 % DOC lysiert und das PrP^C solubilisiert.

4.1.2 Chromatographische Aufreinigung des CHO-PrP^C

Die unterschiedlich lysierten und solubilisierten CHO-PrP^C Präparationen wurden mit einer Kupfer- immobilisierten Metallaffinitätschromatographie und einer Antikörperaffinitätschromatographie aufgereinigt. Die Etablierung und Optimierung der chromatographischen Schritte wurde in enger Zusammenarbeit mit Kerstin Elfrink im Rahmen ihrer Diplom-Arbeit durchgeführt.

Abbildung 4.2 zeigt die Charakterisierung zweier mit unterschiedlicher Zellyse und Solubilisierung durchgeführten Aufreinigungen. Die anschließende chromatographische Aufreinigung erfolgte für beide Proben mit einer Econo-Chromatographieanlage bei 4 °C. Diese Präparationen wurden während eines Studienaufenthaltes in San Francisco durchgeführt. In beiden Aufreinigungen wurden etwa 4×10^8 Zellen eingesetzt, wobei die eine Probe direkt in 0,5 % NP-40 und 0,5 % Deoxycholat lysiert und PrP^C solubilisiert wurde. Bei der anderen Probe wurde PrP^C nach Membranpräparation mit 2 % Zwittergent 3-12 solubilisiert. Im Western-Blot (Abbildung 4.2A) ist deutlich zu erkennen, dass in beiden Fällen CHO-PrP^C aufgereinigt wurde, wobei die Ausbeute ohne Dounce-Lyse deutlich größer ist. Wie im Silbergel (Abbildung 4.2B) zu erkennen, war das CHO-PrP^C nach beiden Präparationen relativ sauber. Allerdings wurde teilweise bei der Elution von der 3F4-Antikörper-Säule auch der 3F4-Antikörper eluiert (←). Dies war abhängig von dem jeweiligen Alter der 3F4-Antikörper Säule. Im Vergleich zu PrP^C aus Hamster-Hirn weist CHO-PrP^C ein verzögertes Laufverhalten auf. Während PrP^C aus Hamster-Hirn ein apparentes

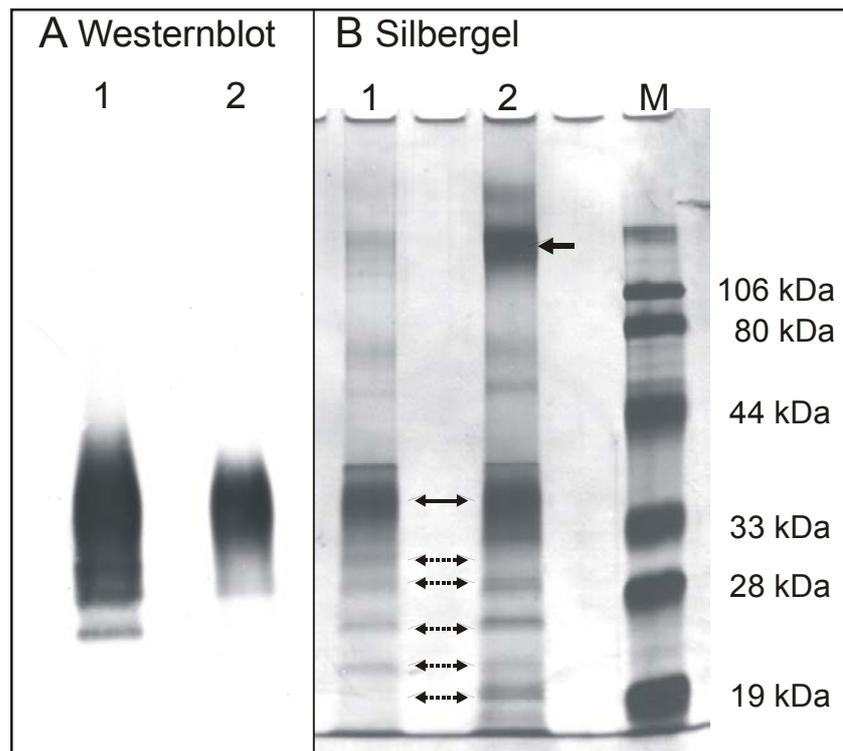


Abbildung 4.2 Charakterisierung von CHO-PrP^C nach vollständiger Aufreinigung:

A) Die Solubilisierung des CHO-PrP^C erfolgte in 0,5 % NP-40, 0,5 % DOC (1) bzw. nach Dounce-Homogenisation in 0,2% Zwittergent 3-12 (2). Beide Ansätze wurden über eine Cu-IMAC und eine 3F4/Protein A-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Je 10 µl der 3F4-Eluate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (Erst-Antikörper: 3F4; ECL-Detektion).

B) Parallel wurden 200 µl (1) bzw. 400 µl (2) des 3F4-Eluats nach TCA-Fällung in einer 12 %-igen PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und Silber gefärbt. (Auftragspuffer jeweils ohne β-Mercaptoethanol) PrP^C (↔); eluierter Antikörper (←); Degradationsprodukte (↔↔)

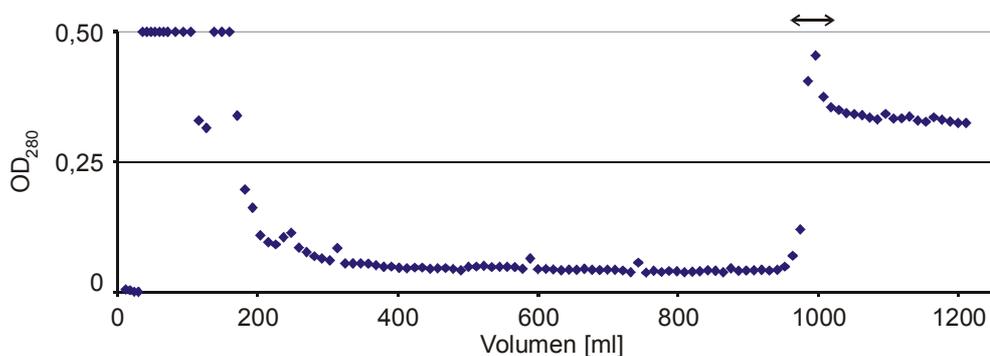
Molekulargewicht von 30 bis 35 kDa hat, hatte CHO-PrP^C (↔) ein apparentes Molekulargewicht von 35 bis 40 kDa. Dies ist wahrscheinlich auf größere, verzweigtere N-Glykosylierungen zurückzuführen, weil nach PNGase F Behandlung beide ein gleiches apparentes MW aufwiesen (Blochberger *et al.*, 1997, Elfrink, 2001). Die Banden mit den niedrigeren apparenten MW (↔↔) sind wahrscheinlich auf Abbauprodukte des CHO-PrP^C zurückzuführen. Teilweise wurden sie durch den 3F4-Antikörper im Western-Blot erkannt.

Die chromatographische Aufreinigung des CHO-PrP^C in Düsseldorf erfolgte mit einer Peristaltik-Pumpe und teilweise mit einem zeitgesteuerten Fraktionssammler (Kapitel 3.3.3 und 3.3.4). Die Absorption jeder Fraktion wurde separat in einem Spektralphotometer bestimmt. Dabei variierten die Bedingungen (Flussraten, Fraktionsgrößen) teilweise recht stark, so dass eine Optimierung schwierig war.

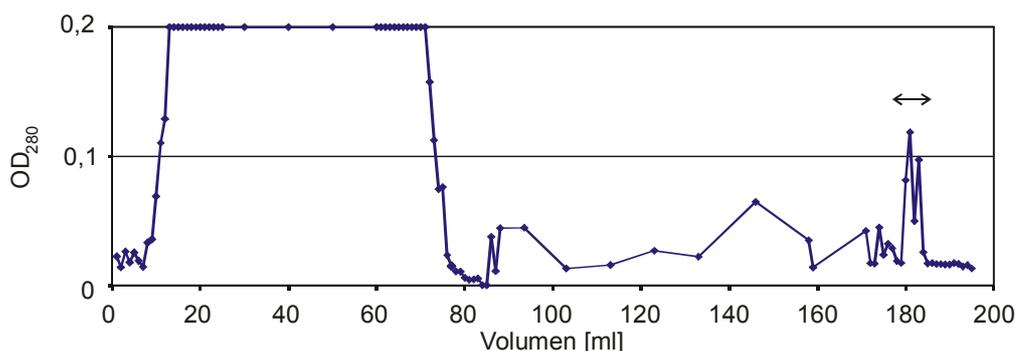
Im Folgenden ist die Aufreinigung des CHO-PrP^C, das für die *in vitro*-Konversion im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde (Kapitel 4.2.3 und 4.6), dargestellt. Das Zellpellet von etwa 5×10^9 Zellen wurde in einem hypertonischen Medium mechanisch aufgebrochen und

die Kerne abzentrifugiert. Anschließend wurden die Membranen pelletiert und die Membranproteine in 0,5 % NP-40, 0,5 % DOC in Lysis-Puffer solubilisiert. Unlösliche Bestandteile wurden bei 10.000 g für 15 min abgetrennt und der Überstand chromatographisch aufgereinigt. Abbildung 4.3 zeigt die Chromatogramme der beiden zur Aufreinigung durchgeführten Chromatographien. Die weiterverwendeten Elutionsfraktionen sind jeweils markiert (\leftrightarrow). Die Absorptionsschwankungen vor allem in der Waschphase der 3F4/ProteinA-Antikörpersäule waren auf Probleme bei der separaten Absorptionssaufzeichnung zurückzuführen. In diesen Fraktionen waren im Gegensatz zu den Elutionsfraktionen keine entsprechenden Mengen an Gesamtprotein oder CHO-PrP^C detektierbar. Die vereinigten Elutionsfraktionen der 3F4/ProteinA-Antikörpersäule wurden in Centriconröhrchen aufkonzentriert und mehrfach mit 10 mM NaP_i, pH 7,2 gewaschen. Dieses Konzentrat wurde mit 0,2% SDS, 10 mM NaP_i, pH 7,2 aufgefüllt und erneut aufkonzentriert. Die gelelektrophoretische Analysen dieser und einer parallel aufkonzentrierten Probe, die noch im Labor Prusiner (UCSF, USA) präpariert wurde, sind in Abbildung 4.3C gezeigt. Es wird deutlich, dass die Ausbeuten und die Reinheit des in Düsseldorf präparierten CHO-PrP^C noch gesteigert werden muss, um eine biophysikalische Charakterisierung zu ermöglichen. Diese weitere Optimierung der Aufreinigung erfolgte später mit Hilfe einer ÄktaPrime-Chromatographieanlage im Rahmen einer Diplomarbeit (Elfrink, 2001).

A) Cu-I-mac-Chromatographie



B) 3F4/Protein A-Chromatographie



C)

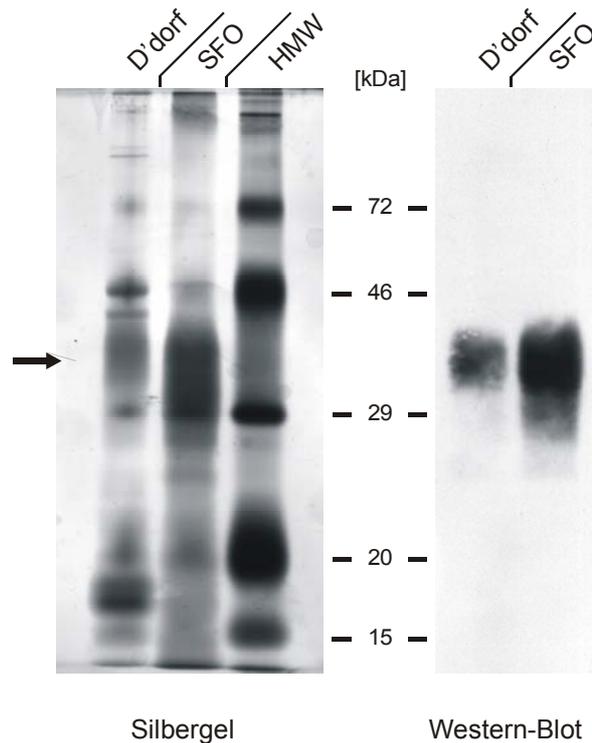


Abbildung 4.3 PrP^C Aufreinigung aus CHO-Zellen:

Etwa 5×10^9 Zellen wurden geerntet und das CHO-PrP^C nach Membranpräparation und Solubilisierung chromatographisch aufgereinigt.

A) Cu-IMAC-Säule (80 ml): 25 ml der in 0,5% NP-40 und 0,5% DOC solubilisierten Membranfraktion wurden in 1 mM Imidazol auf die Säule gegeben. Gewaschen wurde mit ca. 500 ml 10 mM und ca. 300 ml 15 mM Imidazol in 0,2% Zwittergent 3-12, MOPBS-Puffer. Die Elution erfolgte durch 150 mM Imidazol in 0,2% Zwittergent 3-12, MOPBS-Puffer. Die Flussrate betrug 2 ml/min (Bindung) bzw. 4 ml/min (Waschungen und Elution) und es wurden Fraktionen mit 6 bzw. 11 ml (3 min Takt) gesammelt. Die Absorption wurde im Spektralphotometer für jede Fraktion bestimmt (Differenz OD₂₈₀-OD₅₀₀).

B) 3F4-Ak/Protein A-Säule (5 ml): Die Elution-Fraktionen (↔) der Cu-IMAC-Säule wurden vereinigt (ca. 60 ml) und auf die Antikörper-Säule aufgegeben. Gewaschen wurde mit 0,2% Zwittergent 3-12, MOPBS-Puffer (ca. 120 ml). Die Elution erfolgte mit 0,1 M Essigsäure (pH 2,8). Die Flussrate betrug 1 ml/min und Fraktionen mit 1 ml (1 min Takt, während der Beladung und Waschung teilweise auch Fraktionen mit 10 ml) wurden gesammelt. In den Elutionsfraktionen wurden 250 µl 1 M Tris/HCl pH 8,0 vorgelegt, um die Proben sofort zu neutralisieren. Die Absorption wurde für jede Fraktion separat bestimmt (Differenz OD₂₈₀-OD₅₀₀).

C) 5 ml des 3F4-Eluats (↔) und eine in San Francisco präparierte Probe wurden in Centricons auf ca. 130 µl eingengt und dabei auf 0,2% SDS, 10 mM NaP_i eingestellt. Beide Proben wurden in einem 12%igen PAA-Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung (je 10 µl) bzw. Western-Blot (je 1 µl; 1.-Antikörper: 3F4; ECL-Detektion).

4.2 *In vitro*-Konversion verschiedener Prion-Proteine

Natürliche Prion-Proteine weisen posttranslationale Modifizierungen auf. Neben den N-Glykosylierungen sind sie über einen GPI-Anker in der äußeren Plasmamembran verankert. Welchen Einfluss diese Modifizierungen auf die Konversion haben, ist derzeit nicht bekannt. Aus diesem Grunde wurden *in vitro*-Konversionen für rekombinante und natürliche Prion-Proteine untersucht.

4.2.1 Löslichkeit rekombinanter Prion-Proteine

Prion-Proteine tendieren in wässrigen Lösungen stark zur Aggregation. Da die in der Literatur beschriebene Methoden zur Aufreinigung in rein wässrigen Lösungen durchgeführt werden (Mehlhorn *et al.*, 1996; Zahn *et al.*, 1997; Birkmann, 2000), ist nicht auszuschließen, dass es durch Aggregation zu hohen Verlusten kommen kann. Durch Zugabe von 0,2 % SDS können rekombinante Prion-Proteine stabil in Lösung gehalten werden. Abbildung 4.4 zeigt die Löslichkeit von recPrP(90-231) in Abhängigkeit von der Zugabe von Detergenz. Es wurden je 300 ng ohne SDS aufgereinigtes recPrP(90-231) auf 1 mM NaAc, pH 4,0 ohne bzw. mit 0,2 % SDS eingestellt. Parallel wurden Proben ohne bzw. mit 0,2 % SDS auf 10 mM NaPi, pH 7,2 eingestellt. Alle Proben wurden direkt nach dem Ansetzen für eine Stunde bei

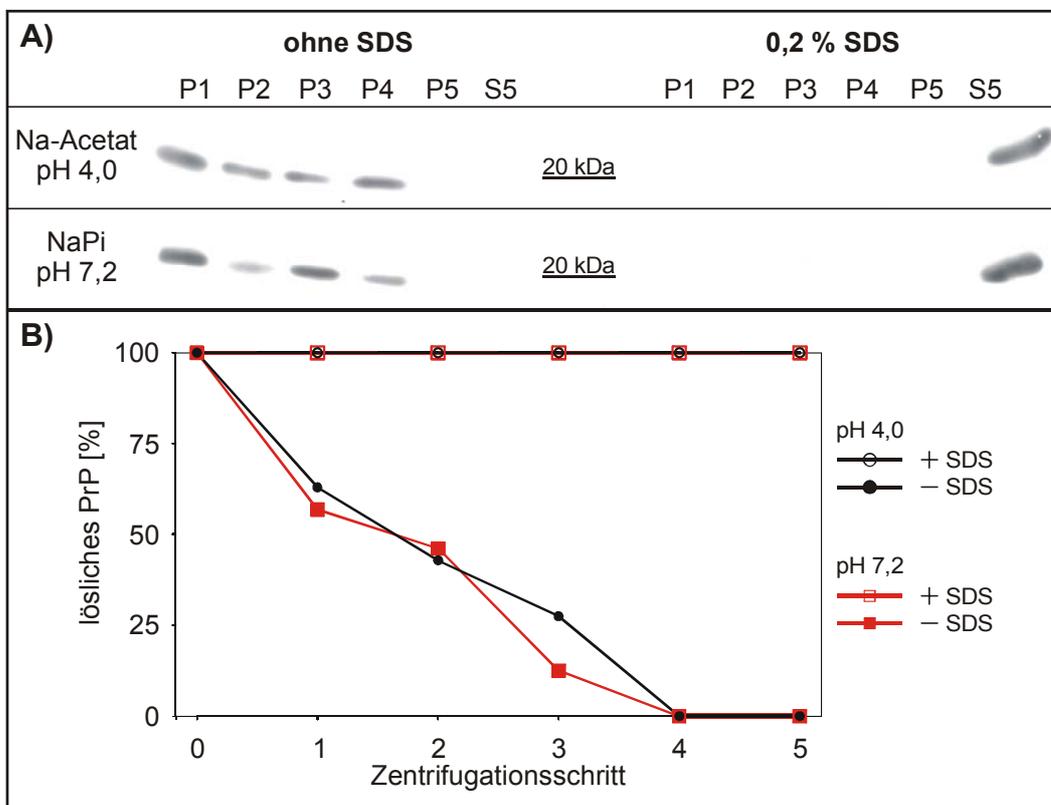


Abbildung 4.4 Die Löslichkeit von recPrP(90-231) ist Detergenz abhängig:

A) Ohne Detergenz aufgereinigtes recPrP(90-231) ist nur bedingt löslich. Je 7,5 ng/μl in Na-Acetat aufgereinigtes recPrP(90-231) wurden auf die angegebenen Bedingungen eingestellt. Jeder Ansatz wurde sofort nach dem Ansetzen, nach einem, zwei, drei und vier Tagen für 1 h bei 100.000 g und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils in einen neuen Beckman-Zentrifugenbecher überführt und weiter bei 37 °C (1. und 2. Tag) bzw. bei -20 °C (3. und 4. Tag) inkubiert. Die Pellets (P) wurden mit 100 μl des jeweiligen Puffers gewaschen, erneut für 10 min zentrifugiert und in Laemmli-Auftragspuffer resuspendiert. Die verschiedenen Pellets und der Überstand S5 wurden in einer 12 %-igen PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (1.-Antikörper: 3F4; ECL-Detektion).

B) Densitometrische Auswertung des Western-Blottes: das Signal über alle Banden wurde summiert und als 100% gesetzt. Die Signale der Banden nach dem jeweiligen Zentrifugationsschritt wurden ebenfalls summiert und das prozentuale Verhältnis zum Ausgangssignal bestimmt.

100.000 g und 25 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und bei 37 °C inkubiert. Das Pellet wurde im 2-fachen Volumen mit dem jeweiligen Puffer gewaschen und 10 min bei 100.000 g zentrifugiert. Diese Pellets wurden in Laemmli-Auftragspuffer resuspendiert und später per Western-Blot analysiert, während die Überstände verworfen wurden. Diese Prozedur wurde 5 mal wiederholt, wobei die Überstände vor Zentrifugation bei RT über Nacht inkubiert wurden bzw. bei – 20 °C über Nacht gelagert wurden. Der nach der fünften Zentrifugation abgenommene Überstand S5 wurde ebenfalls analysiert. Es ist deutlich zu erkennen, dass ohne Detergenz recPrP(90-231) nicht vollständig löslich war. Bei jedem Löslichkeitstest pelletierte ein Teil des recPrP(90-231). Dieses Verhalten war reproduzierbar, wobei das Verhältnis zwischen Pellet und Überstand variierte von überwiegend löslich bis hin zu 60 - 70 % pelletiertes rPrP(90-231). Im Gegensatz dazu war in 0,2 % SDS das recPrP(90-231) auch nach den verschiedenen Inkubationen und Zentrifugationen immer löslich. Die Unlöslichkeit in Abwesenheit von SDS war nur bei Zentrifugation zu beobachten, weil es hierbei wahrscheinlich zu lokalen Konzentrationserhöhungen kommt. Im CD konnten solche Proben durchaus über mehrere Tage untersucht werden, ohne dass eine deutliche Abnahme des Signals, aufgrund einer Konzentrationsabnahme durch Aggregation, beobachtet wurde. Dies steht in Übereinstimmung mit NMR-Analysen oder anderen Daten, die mit diesem eingeschränkt löslichen Protein gewonnen werden konnten (Riek *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999; Jackson *et al.*, 1999).

Lösliches sPrP27-30 bzw. recPrP(90-231) in 0,2 % SDS war das Ausgangsmaterial für das von Post *et al.* (1998) etablierte *in vitro*-Konversionssystem. Nach Entfernung des SDS durch Verdünnung auf unter 0,01 % wurde die *in vitro*-Konversion induziert. Dabei konnten einige Eigenschaften des PrP^{Sc} wiederhergestellt werden, wobei *de novo* Infektiösität nicht nachgewiesen werden konnte. Da solPrP27-30 als Folge der Präparation durch die PK N-terminal verkürzt wurde und auch recPrP(90-231) der Aminosäuresequenz des solPrP27-30 entspricht, konnte mit diesen beiden Ausgangsmaterialien nur eine erhöhte PK-Stabilität gezeigt werden. Eine PrP^{Sc}-spezifische N-terminale Verkürzung durch Proteinase K konnte nicht untersucht werden. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit das von Post *et al.* (1998) etablierte *in vitro*-Konversionssystem auf die Vollängen Proteine recPrP(29-231) und CHO-PrP^C übertragen.

4.2.2 *In vitro*-Konversion rekombinanter Prion-Proteine

Wie in Kapitel 1.1.5 beschrieben weist recPrP(90-231) in SDS-Konzentrationen über 0,05 % überwiegend Eigenschaften von PrP^C auf. Es ist löslich, PK-sensitiv, überwiegend α -helikal und nicht infektiös. Nach Ausdünnen des SDS (< 0,01 %) findet eine schnelle Strukturumlagerung zu einer überwiegenden β -Faltblattstruktur statt, gefolgt von einer anschließende Aggregation zu teilstrukturierten Aggregaten, ohne amyloide Fibrillen zu bilden (Post *et al.* 1998). Ob recPrP(29-231), welches dem Volllängen-PrP^C bis auf die ersten 6 N-terminalen Aminosäuren entspricht, ebenfalls diese *in vitro*-Konversion bezogen auf die Löslichkeit und PK-Resistenz vollzieht war die Fragestellung für die folgende Untersuchung. Im Gegensatz zum recPrP(90-231) kann mit recPrP(29-231) auch die für PrP^{Sc} spezifische PK-Resistenz, bei der ein PK-resistentes C-terminales Fragment (PrP27-30) erhalten bleibt, getestet werden.

Abbildung 4.5 zeigt vergleichend die Löslichkeit von recPrP(90-231) und recPrP(29-231) in 0,2 % SDS bzw. 0,01 % SDS nach Inkubation über Nacht unter den jeweiligen Puffer Bedingungen. Sowohl recPrP(90-231) als auch recPrP(29-231) waren in 0,2 % SDS löslich und verblieben im Überstand, während nach Ausdünnen des SDS beide Prion-Proteine unlöslich wurden und im Pellet zu finden waren. Auch recPrP(29-231) lagerte sich, wie recPrP(90-231) nach Ausdünnen des SDS schnell in eine überwiegend β -Faltblatt-reiche Struktur um (Birkmann, 2000).

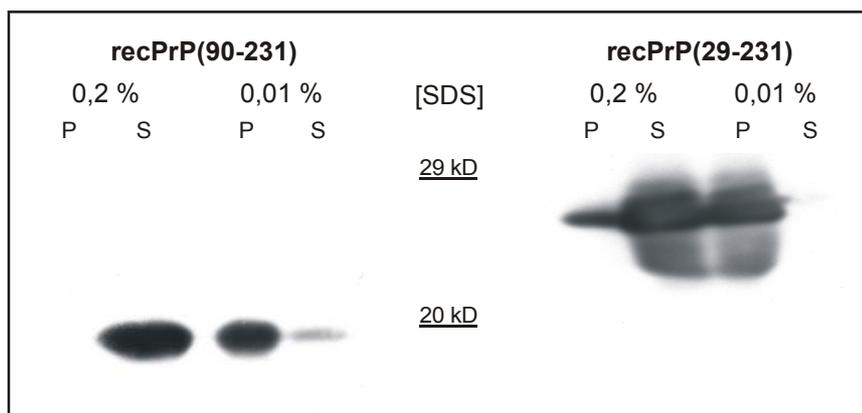


Abbildung 4.5 SDS-abhängige Löslichkeit von recPrP(90-231) und recPrP(29-231):

Je ein Ansatz wurde über Nacht in 0,2 % SDS bzw. in 0,01 % SDS bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 h bei 20 °C und 100.000 g wurden Pellet (P) und Überstand (S) getrennt und das Pellet im gleichen Volumen resuspendiert. Die Proben wurden in einer 12 %-igen PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (1.-Antikörper: 3F4; ECL-Detektion).

Die übergeordnete Struktur dieser Aggregate wurde mittels Proteinase K-Verdauung untersucht. Es wurden jeweils 4 parallele Ansätze mit je 20 ng/μl recPrP(29-231) über Nacht in 0,01 % bzw. 0,2 % SDS bei 37 °C inkubiert und anschließend für eine Stunde bei 100.000 g zentrifugiert. Alle Proben wurden verschieden lang mit 5 ng/μl PK bei RT behandelt und die Reaktion durch Einstellen von 7,5 mM PMSF bei Zugabe von einem Volumen Laemmli-Auftragspuffer und anschließender Denaturierung gestoppt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 dargestellt. Die Proben in 0,2 % SDS zeigten keinerlei Proteinase-Resistenz, auch bei kurzer PK-Inkubation wurde recPrP(29-231) deutlich abgebaut. Hierbei waren zwei Abbauprodukte zu beobachten, wobei es sich bei dem ca. 16 kDa großen Fragment um das N-terminal verkürzte Fragment handeln könnte. Die Proben in 0,01 % hingegen wiesen eine erhöhte PK-Stabilität auf, die mit der bereits beschriebenen von recPrP(90-231) vergleichbar war. Im Gegensatz zu PrP^{Sc} bezog sich diese erhöhte PK-Stabilität auf das gesamte Protein, es wurde auch bei 15 min Inkubation kaum abgebaut. Eine spezifische Stabilität des C-Terminus war also nicht zu beobachten, was wiederum auf amorphe Aggregate hindeutete, wie sie auch bei aggregiertem recPrP(90-231) mittels Elektronenmikroskopie nachgewiesen wurden (Post *et al.*, 1998).

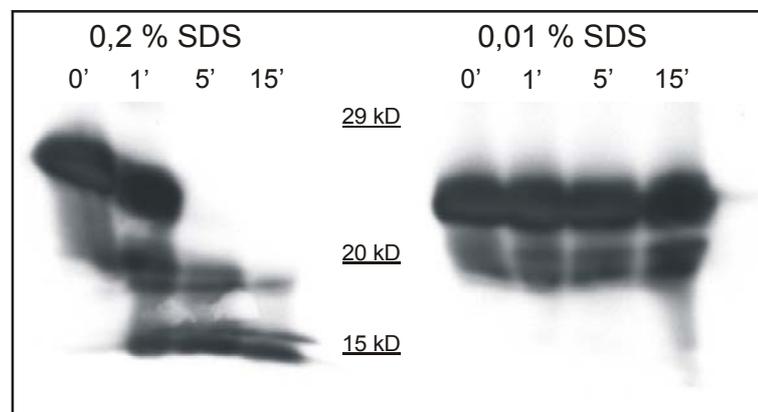


Abbildung 4.6 Vergleich der proteolytischen Stabilität von löslichem und aggregiertem recPrP(29-231):

Je 4 Ansätze mit 20 ng/μl recPrP(29-231) wurden über Nacht in 0,2 % SDS bzw. in 0,01 % SDS bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 h bei 20 °C und 100.000 g wurden die Ansätze resuspendiert und mit 5 ng/μl PK bei RT inkubiert. Die Verdauung wurde nach 0', 1', 5' und 15' durch Zugabe von 1 Volumen Laemmli-Auftragspuffer mit 7,5 mM PMSF und 5-minütiges Kochen gestoppt. Die Proben wurden in einer 12%-igen PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (Erst-Antikörper: 3F4; ECL-Detektion). Das lösliche und monomere recPrP(29-231) in 0,2 % SDS wurde durch PK abgebaut. Dagegen wurde das in 0,01 % SDS aggregierte recPrP(29-231) über diesen Zeitraum nicht abgebaut. Eine spezifische Verkürzung des recPrP(29-231) wie bei PrP^{Sc} ist bisher nicht zu beobachten.

Mit diesen Untersuchungen konnte somit gezeigt werden, dass recPrP(29-231) nach Ausdünnen des SDS ebenfalls aggregiert und eine erhöhte PK-Stabilität aufweist. Hierbei war eine PrP^{Sc}-spezifische N-terminale Verkürzung nicht zu beobachten.

4.2.3 Natürliche Prion-Proteine

In vitro Konversionssysteme anderer Arbeitsgruppen (Kapitel 1.1.5) zeigen eine effizientere Umwandlung mit nicht modifiziertem PrP. Dabei wird das metabolisch radioaktiv markierte PrP aus Säugetierzellkulturen gewonnen, die unter Tunicamycin-Einfluss kultiviert wurden (Caughey *et al.*, 1995, Kocisko *et al.*, 1995, DeBurman *et al.*, 1997). Tunicamycin inhibiert die Glycosylierung von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum. Das von Post *et al.* (1998) in unserer Arbeitsgruppe etablierte *in vitro*-Konversionssystem verwendete zwar N-glycosyliertes und GPI-geankertes PrP aus Prion-Stäbchen, war aber aufgrund seiner Herkunft mit Restinfektiösität versehen und nicht in den für strukturelle Untersuchungen erforderlichen Mengen verfügbar. Daher sollte das *in vitro*-Konversionssystem auf posttranslational modifiziertes PrP^C aus CHO-Zellkulturen (CHO-PrP^C) übertragen werden.

Hierfür wurde das aufgereinigte und in 0,2 % SDS aufkonzentrierte CHO-PrP^C auf seine Löslichkeit in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration untersucht. Dabei wurde das CHO-PrP^C auf SDS-Konzentrationen zwischen 0,2 % und 0,002 % SDS eingestellt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für eine Stunde bei 25 °C und 100.000 g wurden Pellet (P) und Überstand (S) getrennt. In Abbildung 4.7 ist deutlich zu sehen, dass das CHO-PrP^C der Präparation A erst ab 0,002 % SDS aggregierte. Bei den anderen SDS-Konzentrationen aggregierte es nicht und verblieb im Überstand. Nicht alle Präparationen des CHO-PrP^C aggregierten nach dem Ausdünnen des SDS. Wie Präparation B zeigt, aggregierte das CHO-PrP^C unter allen angegebenen SDS-Konzentrationen nicht, während recPrP(90-231) in 0,01 % teilweise und in 0,005 % SDS vollständig aggregierte. Wurden CHO-PrP^C und recPrP(90-231) unter diesen SDS-Konzentrationen zusammen inkubiert, so aggregierte weder das CHO-PrP^C noch das recPrP(90-231). Dies könnte zum einen auf eine Inhibierung der Aggregation durch das zelluläre PrP zurückzuführen sein. Wahrscheinlicher ist aber, dass die SDS-Konzentrationen in den aufkonzentrierten Proben unterschiedlich sind. Vorläufige massenspektrometrische Untersuchungen zeigten, dass sich bei der Aufkonzentrierung von SDS-haltigen Lösungen in Centricon-Röhrchen auch das SDS aufkonzentrierte. Nach Angaben des Herstellers passieren bei 0,01 % SDS mehr als 90 %, bei 0,1 % SDS zwischen 40 – 89 % und bei 1 % SDS weniger als 40 % des SDS die Membran. Die angegebenen SDS-Konzentrationen müssen daher immer als rechnerische SDS-Konzentration angesehen werden, da von den eingestellten 0,2 % SDS ausgegangen wurde. Eine genaue Bestimmung der SDS-Konzentration ist derzeit noch nicht möglich (Kapitel 5.2.2).

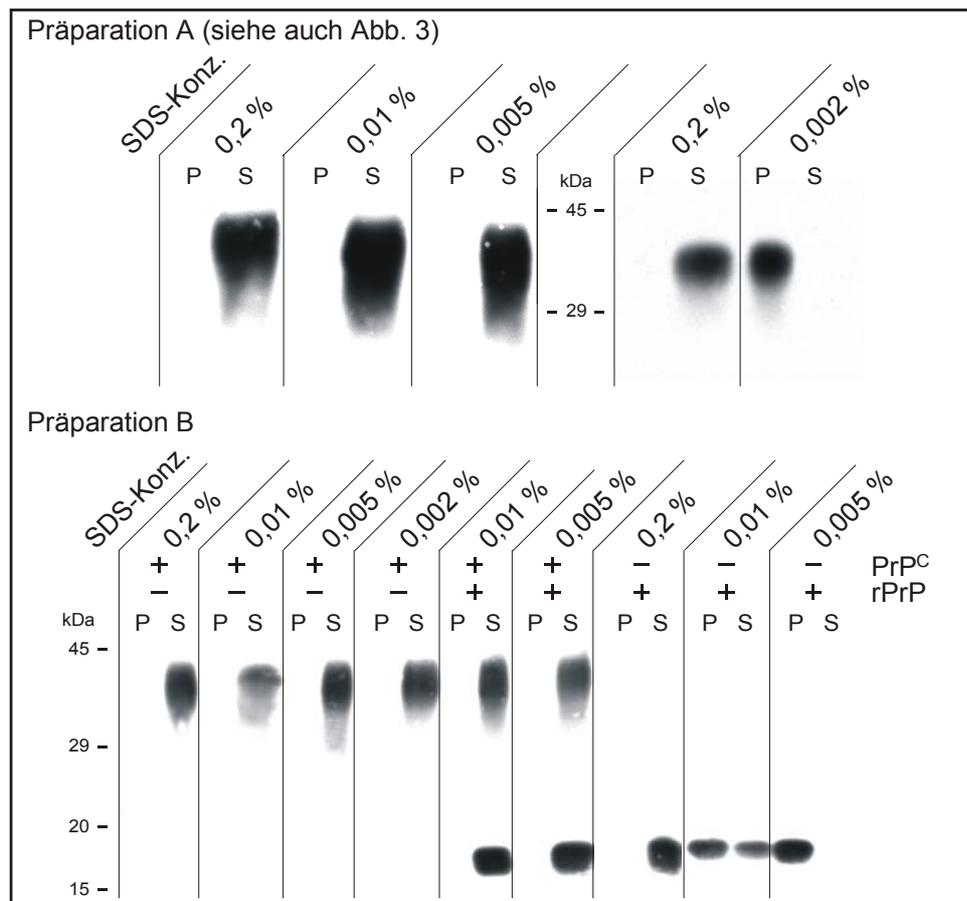


Abbildung 4.7 Induktion der Reaggregation von CHO-PrP^C:

Das CHO-PrP^C verschiedener Aufreinigungen (Präparation A vom Mai 2000; Präparation B vom Nov. 1999) wurde unter den angegebenen Bedingungen über Nacht 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 h bei 20 °C und 100.000 g wurden Pellet (P) und Überstand (S) getrennt und das Pellet im gleichen Volumen resuspendiert. Die Proben wurden in einer 12 %-igen PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (Erst-Antikörper: 3F4; ECL-Detektion). Die Molekulargewichtsangaben trennen jeweils 2 parallel durchgeführte Gelelektrophoresen. **A)** Das CHO-PrP^C dieser Präparation aggregierte erst bei einer SDS-Konzentrationen von 0,002 %. **B)** Das CHO-PrP^C dieser Präparation aggregierte unter den angegebenen Bedingungen nicht. Obwohl recPrP(90-231) unter diesen Bedingungen aggregierte, aggregierte es in Kombination mit CHO-PrP^C nicht mehr.

Nachdem gezeigt werden konnte, das CHO-PrP^C nach Ausdünnen des SDS ebenfalls aggregierte, wurde im Folgenden untersucht, ob sich auch die Sekundärstruktur bei diesem Übergang ändert. Da die Stammlösung für die Aggregation stark verdünnt werden musste (Faktor 100), konnten die Proben aufgrund der geringen Konzentration nicht direkt mittels CD-Spektroskopie vermessen werden. Deshalb wurde das 10-fache Volumen (benötigt wurden 100 µl für eine Messung) mit der maximalen Konzentration in 0,002 % SDS über Nacht bei 37 °C inkubiert und mit 100.000 g für eine Stunde bei 25 °C zentrifugiert. Ungefähr 100 µl des Überstandes wurden über dem Pellet stehen gelassen und das Pellet resuspendiert. Zusätzlich wurde die Probe für eine Minute in einer Bechersonde sonifiziert. Diese Probe wurde in einer Mikroküvette im CD-Spektrometer vermessen (Abbildung 4.8). In 0,2 % SDS war das typische α -helikale bzw. Zufallsknäuel-Spektrum zu beobachten, wie es auch für recPrP

oder solPrP27-30 zu beobachten ist (Post *et al.* 1998, Jansen *et al.*, 2001). Nach Ausdünnen des SDS und Zentrifugation entsprach das CD-Spektrum einem β -Faltblatt-Spektrum, was durch die Verschiebung des Nulldurchgangs und der Ausbildung nur eines Minimums bei ungefähr 216 nm gekennzeichnet war. Nach Verringerung des Volumens und bei vollständiger Pelletierung war die Konzentration der an CHO-PrP^C in beiden Ansätzen gleich. Das aggregierte CHO-PrP^C lies sich nur noch schlecht in Lösung bringen, weshalb das Spektrum des aggregierten CHO-PrP^C ein schlechtes Signal zu Rausch-Verhältnis aufweist.

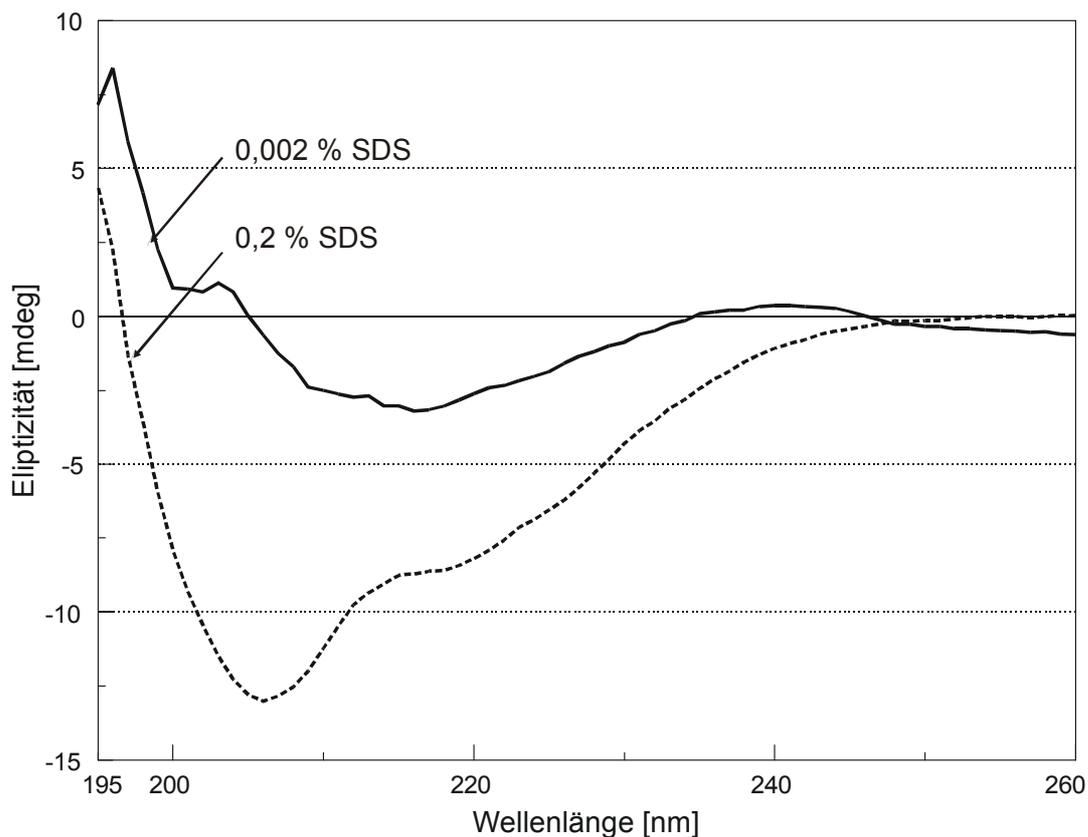


Abbildung 4.8 Strukturumlagerung bei der Reaggregation von CHO-PrP^C:

CD-Spektren von löslichem (0,2% SDS) und aggregiertem (0,002 % SDS) CHO-PrP^C. Nach über Nacht Inkubation wurde das aggregierte CHO-PrP^C pelletiert und in 1/10 des Volumens resuspendiert und 1 min in einer Bechersonde sonifiziert. Das CHO-PrP^C in 0,2 % wurde in einer 10fach höheren Konzentration eingesetzt. Da die exakten Konzentrationen nicht bekannt waren und nur die Strukturänderung verfolgt werden sollte, wurden hier die Eliptizitäten nicht in molare Eliptizitäten umgerechnet. Es wurden jeweils 10 Spektren akkumuliert und gegen die Pufferspektren korrigiert.

Hiermit konnte aber zum ersten Mal eine *in vitro*-Konversion für natürliches PrP^C gezeigt werden. Nach Ausdünnen des SDS kommt es zu einem Strukturübergang des natürlichen PrP^C zu β -Faltblatt und zur Aggregation. Eine spezifische N-terminale Verkürzung durch Proteinase K konnte aufgrund der geringen Konzentrationen an CHO-PrP^C nicht analysiert werden (Kapitel 5.2.2).

4.3 Einfluss chemischer Chaperone auf die *in vitro*-Konversion

Chemische Chaperone wie Dimethyl-Sulfoxide (DMSO), Trimethyl-Aminooxid (TMAO) und Glycerol beeinflussen die Hydratisierung und damit die Struktur von Proteinen in wässrigen Lösungen (1.2.1). Der Einfluss dieser Substanzen auf die *in vitro*-Konversion von recPrP wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

4.3.1 Löslichkeit von recPrP

Wie in Kapitel 4.2.2 gezeigt wurde, bildet recPrP(90-231) nach Ausdünnen des SDS unlösliche Aggregate. Um den Einfluss von chemischen Chaperonen auf die Löslichkeit von recPrP(90-231) zu analysieren, wurde recPrP(90-231) über Nacht in 10 mM NaP_i mit 0,2 % SDS bzw. 0,005 % SDS inkubiert. Beim Ausdünnen des SDS wurden die Ansätze zusätzlich noch auf unterschiedliche DMSO- oder Glycerol-Konzentrationen eingestellt. Alle Ansätze wurden für 1 h bei 100.000 g und 25 °C zentrifugiert, Überstand von Pellet getrennt und mittels Dot-Blot analysiert. Abbildung 4.9 zeigt, dass die Löslichkeit von recPrP(90-231) durch die SDS-Konzentration bestimmt wird. Trotz hoher DMSO bzw. Glycerol Konzentrationen kam es nach Ausdünnen des SDS (0,005 %) zu einer überwiegenden Pelletierung des recPrP(90-231). Die geringen Anteile von recPrP(90-231) im Überstand waren nicht signifikant.

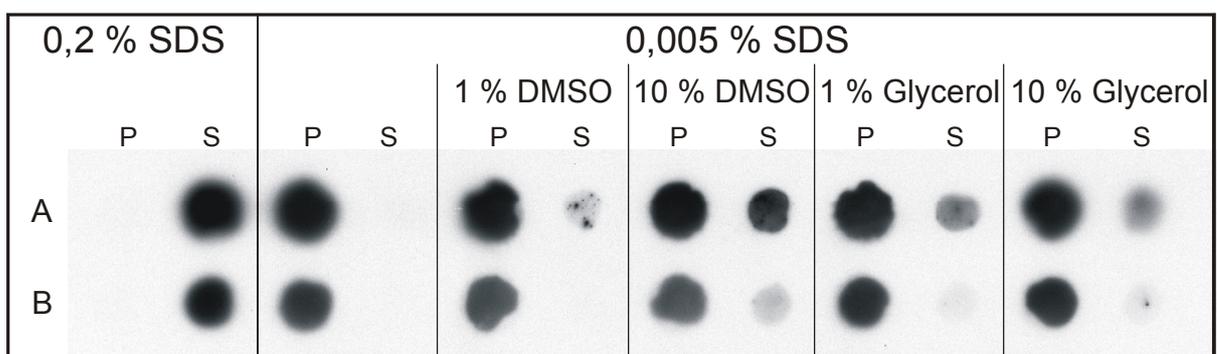


Abbildung 4.9 Einfluss chemischer Chaperone auf die Löslichkeit von recPrP(90-231):

Je 250 ng recPrP(90-231) wurden über Nacht unter den angegebenen Bedingungen bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 h bei 25 °C und 100.000 g wurden Pellet (P) und Überstand (S) getrennt und das Pellet im gleichen Volumen resuspendiert. Die Proben wurden mittels Dot-Blot analysiert (1.-Antikörper: 3F4; ECL-Detektion; Reihe A enthält eine dreifach höhere Menge an recPrP(90-231) wie Reihe B).

Somit konnte keines der beiden chemischen Chaperone, DMSO und Glycerol, die Aggregation von recPrP in unserem *in vitro*-Konversionssystem verhindern und die Löslichkeit beeinflussen.

4.3.2 Beeinflussung der Aggregationskinetik

Wie im vorigen Kapitel gezeigt, haben chemische Chaperone *in vitro* keinen Einfluss auf die Löslichkeit des Prion-Proteins haben. In wie weit sie allerdings die Aggregationskinetik beeinflussen, konnte damit nicht gezeigt werden. Dies sollte mittels *de novo* Aggregation im Fluoreszenz-Korrelations-Spektrometer analysiert werden.

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ermöglicht die Bestimmung der Diffusionszeiten von Fluoreszenz-markierten Partikeln in Lösung (Kapitel 3.6). Bei der FCS-Methode wird die Fluoreszenz-Fluktuation aus einem kleinen, konfokalen Bereich der Lösung über die Zeit aufgenommen. Durch Autokorrelation dieser Fluoreszenz-Fluktuation kann die mittlere Aufenthaltszeit eines Moleküls im Fokus und damit seine Diffusionszeit bestimmt werden. Da die Diffusionszeiten proportional zur dritten Wurzel vom Molekulargewicht sind, kann durch eine zeitaufgelöste Bestimmung der Diffusionszeiten der Aggregationsverlauf verfolgt werden (Schäfer, 1997, Pitschke 1999). Unmarkiertes recPrP(90-231) wurde mit einem Unterschuss an Cy2-markiertem recPrP(90-231) in 0,2 % SDS gemischt, anschließend mit Puffer auf die entsprechenden Bedingungen eingestellt und die Diffusionszeiten über einen Zeitraum von 60 min bestimmt. Abbildung 4.10 zeigt die Aggregationskinetiken der *de novo* Aggregation unter den verschiedenen DMSO-Konzentrationen. Bei der Kontrolle, bei der das SDS nicht ausgedünnt wurde, war keine Aggregation zu beobachten, die Diffusionszeiten blieben konstant bei etwa 0,35 ms. Wurde die SDS-Konzentration mit 10 mM NaP_i auf 0,01 % ausgedünnt, aggregierte recPrP(90-231) schnell zu Oligomeren, was durch den Anstieg der Diffusionszeiten von 0,35 ms auf ungefähr 0,7 ms innerhalb der ersten 30 min zu beobachten war. Während in 1 % DMSO nach Ausdünnen des SDS kein signifikanter Unterschied zu beobachten war, stiegen die Diffusionszeiten in 10 % DMSO deutlich schneller an und es wurden höhere Diffusionszeiten erreicht.

Neben DMSO wurde auch der Einfluss von Glycerol auf die *in vitro*-Aggregationskinetiken von recPrP(90-231) untersucht. Unmarkiertes recPrP(90-231) wurde mit Cy2-markiertem recPrP(90-231) in 0,2 % SDS gemischt und anschließend mit 10 mM NaP_i auf 0,01 % SDS und die jeweiligen Glycerol-Konzentrationen eingestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Da die ermittelten Diffusionszeiten τ von der jeweiligen Diffusionskonstanten abhängen und diese wiederum umgekehrt proportional zur Viskosität der Lösung sind, wurden die ermittelten Diffusionszeiten gegen die unterschiedlichen Viskositäten korrigiert:

$$\tau_{kor} = \frac{\tau_{erm}}{\eta/\eta_0} \quad \text{und} \quad \eta/\eta_0 = \frac{\text{abs. Viskosität der Lösung bei } 20^\circ\text{C}}{\text{abs. Viskosität von Wasser bei } 20^\circ\text{C}}$$

mit $\eta/\eta_0 = 1,29$ für 10% Glycerol bzw. $\eta/\eta_0 = 1,02$ für 1% Glycerol

Es wird deutlich, dass 1% Glycerol die Kinetik der *in vitro*-Aggregation nicht beeinflusst, die Diffusionszeiten nahmen mit und ohne Glycerol vergleichbar zu. Sie stiegen von ca. 0,25 ms schnell auf ca. 0,7 ms, welches für die Kurzeitkinetiken typisch ist (Post *et al.*, 1998). Mit 10% Glycerol waren die viskositätskorrigierten Diffusionszeiten schon zu Beginn der Messung erhöht gegenüber den Messungen ohne Glycerol. Die weitere Zunahme der Diffusionszeiten und damit die weitere Aggregation verlief dagegen deutlich langsamer.

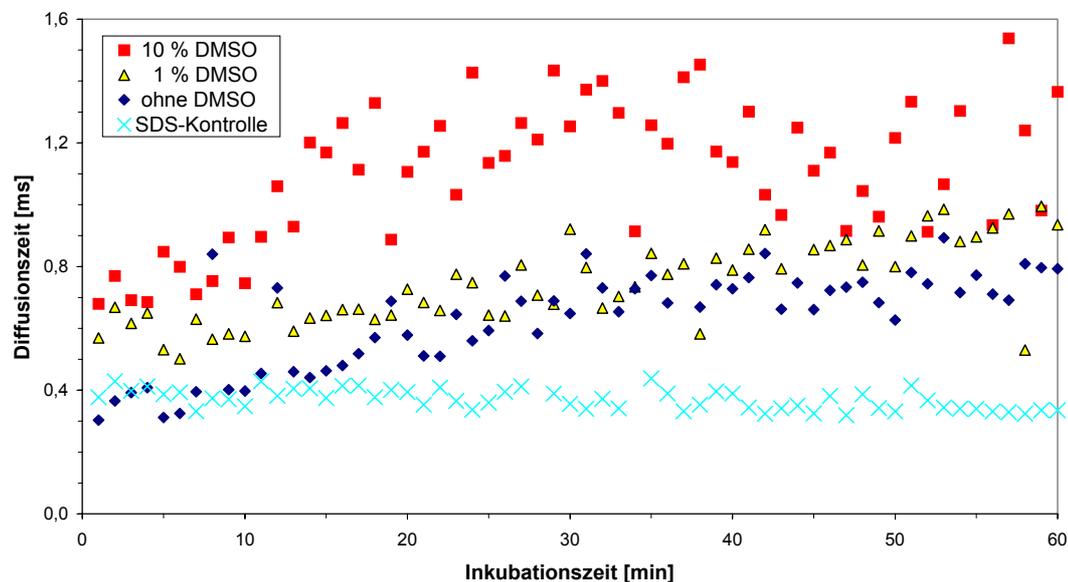


Abbildung 4.10 Einfluss von DMSO auf die Aggregationskinetik von recPrP(90-231):

In allen Ansätzen wurden recPrP(90-231) und Cy2-markiertes recPrP(90-231) auf die angegebenen Bedingungen in 0,01% SDS, 10 mM NaP_i, pH 7,2 eingestellt und im FCS analysiert. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz in 0,2% SDS, 10 mM NaP_i, pH 7,2 (x) vermessen, bei dem keine Zunahme der Diffusionszeit beobachtet wurde. Jede Diffusionszeit entspricht einer als 2-Komponentensystem autokorrelierten Fluoreszenz-Fluktuationskurve einer FCS-Messung, die für jeweils 60 s aufgezeichnet wurden. (End-Konzentration recPrP(90-231): 1 ng/μl).

Nach über Nacht-Inkubation waren in allen Ansätzen große Aggregate mit hohen Diffusionszeiten messbar. Abbildung 4.12 zeigt die übereinandergelagerten Fluoreszenz-Fluktuationskurven der Proben aus Abbildung 4.11 nach über Nacht-Inkubation. Aufgrund der gehäuften Einzelereignisse (hochmarkierte Aggregate, Peaks) in den Fluoreszenz-Fluktuationskurven ohne (A) und mit 1% Glycerol (B) im Gegensatz zu 10% Glycerol (C) schwankten die berechneten Diffusionszeiten sehr stark bzw. waren teilweise nicht auswertbar. Es wurden aber bewusst alle Fluoreszenz-Fluktuationskurven von jeweils 30 Messungen unter den gleichen Bedingungen als 2-Komponentensystem autokorreliert, ohne auf die

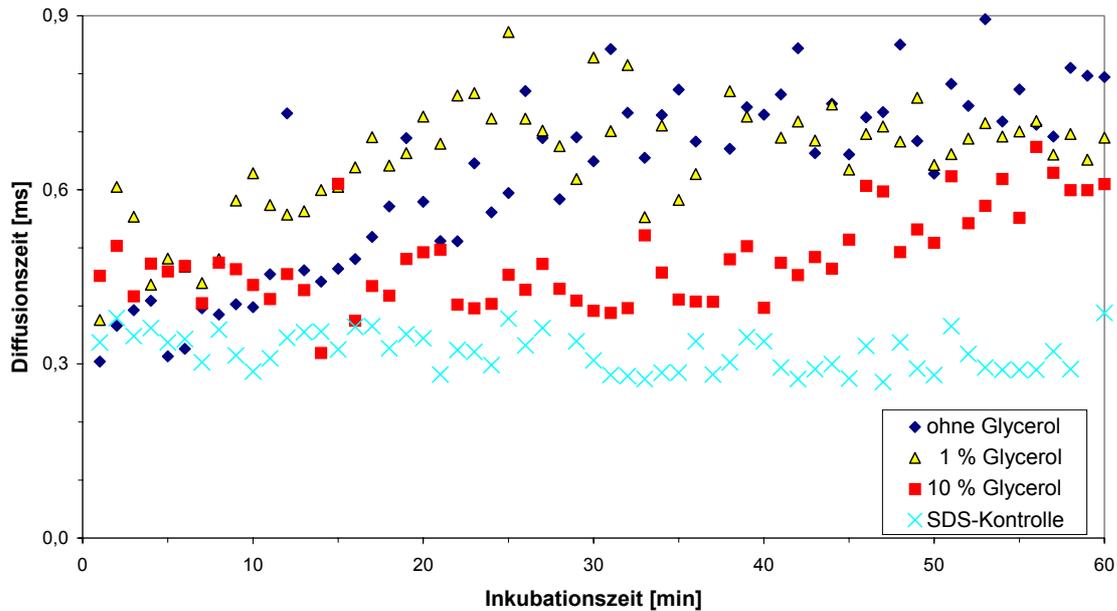


Abbildung 4.11 Aggregationskinetiken in Abhängigkeit der Glycerolkonzentration:

In allen Ansätzen wurden recPrP(90-231) und Cy2-markiertes recPrP(90-231) auf die angegebenen Bedingungen in 0,01 % SDS, 10 mM NaP_i, pH 7,2 eingestellt und im FCS analysiert. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz in 0,2 % SDS, 10 mM NaP_i, pH 7,2 (x) vermessen, bei dem keine Zunahme der Diffusionszeit beobachtet wurde. Jede Diffusionszeit entspricht einer als 2-Komponentensystem autokorrelierten Fluoreszenz-Fluktuationkurve einer FCS-Messung, die für jeweils 60 s aufgezeichnet wurde. Die Diffusionszeiten wurden bezogen auf die unterschiedliche Viskosität der Lösungen korrigiert. (End-Konzentration recPrP(90-231): 1 ng/μl).

Qualität der angenäherten Autokorrelationsfunktionen zu achten. Die schwankenden Diffusionszeiten zwischen 0,34 und 4,86 ms (A) bzw. 0,57 und 2,43 ms (B) wiesen auf heterogene Aggregatgrößen hin und sind auf die Peaks zurückzuführen. Die berechneten Mittelwerte mit der dazugehörige Standardabweichung sind in Abbildung 4.12 mitaufgeführt. In 10 % Glycerol (C) waren dagegen keine Einzelereignisse zu beobachten und die Diffusionszeiten lagen zwischen 0,74 und 1,19 ms. Dies könnte auf eine geordnetere, gleichmäßigere Aggregation in Glycerol deuten.

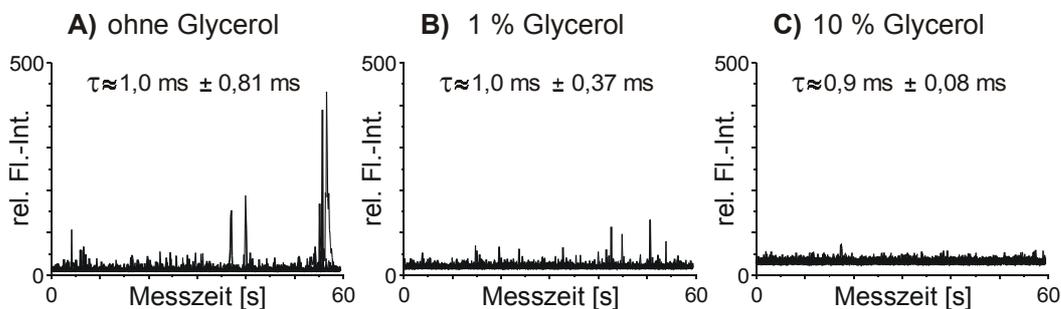


Abbildung 4.12 Langzeitaggregation von recPrP(90-231) in Abhängigkeit von der Glycerolkonzentration:

Die Ansätze der *de novo* Aggregation (Abbildung 4.11) wurden über Nacht bei RT inkubiert und im FCS analysiert. Die jeweils 30 aufgezeichneten Fluoreszenz-Fluktuationkurven wurden übereinandergelegt und als Zwei-Komponentensystem autokorreliert (1. Komponente: freier Farbstoff festgesetzt). Die Diffusionszeiten wurden bezogen auf die unterschiedliche Viskosität der Lösungen korrigiert, angegeben sind die jeweiligen Mittelwerte mit Standardabweichung.

Zusammenfassend ergab sich für DMSO und Glycerol keine inhibierende Wirkung auf die Aggregation. Ein Einfluss auf den Aggregationsverlauf war jedoch zu beobachten, der bei Glycerol deutlicher als bei DMSO war. Die Fragestellung, in wie weit dadurch auch die Struktur der gebildeten Aggregate verändert wurde, konnte mit den im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung stehenden Methoden nicht abschließend behandelt werden. Sekundärstrukturanalysen und PK-Verdauungen erlauben zwar indirekte Informationen auf die Struktur der Aggregate, aber nur elektronenmikroskopische Aufnahmen ermöglichen eine eindeutige Bestimmung der Aggregatstruktur. Die Elektronenmikroskopie wird derzeit in unserem Institut etabliert, um damit unter anderem auch diese Fragestellung zu behandeln. Vorläufige Sekundärstrukturanalysen mittels CD-Spektroskopie zeigten bereits eine geringe, für sich alleine jedoch nicht signifikante Erhöhung des β -Faltblattanteils.

4.4 Abhängigkeit der *in vitro*-Konversion von den Pufferbedingungen

Die Abhängigkeit der *in vitro*-Konversion von verschiedenen Pufferbedingungen wurde im Folgenden mittels FCS untersucht. Diese Untersuchungen wurden erforderlich, weil GroEL für die Freisetzung seines Substrates K^+ und Mg^{2+} Ionen essentiell benötigt.

Die Aggregation von recPrP(90-231) unter Einfluss der monovalenten Kationen Na^+ und K^+ war im FCS nicht mehr quantitativ über die Diffusionszeiten auswertbar. Deshalb wurden die Fluoreszenz-Fluktuationskurven nur qualitativ ausgewertet. In Abbildung 4.13 wurden die ersten 10 Fluoreszenz-Fluktuationskurven eines Aggregationsansatzes überlagert. Messungen in 10 mM NaP_i , pH 7,2 ohne zusätzliche Salze zeigten typische Fluoreszenz-Fluktuationskurven in 0,2 % und 0,01 % SDS, die jede einzeln autokorreliert werden konnten. Die Diffusionszeiten blieben konstant bei ca. 0,3 ms oder stiegen von 0,3 ms auf ca. 0,5 ms innerhalb von 10 min (ca. 0,7 ms nach 60 min) an. Mit KCl-Konzentrationen von 10 mM und 50 mM waren die Diffusionszeiten schon nach 12 min bzw. von der ersten Minute an nicht mehr auswertbar. Ein Vergleich der überlagerten Fluoreszenz-Fluktuationskurven zeigt eine Zunahme der Abweichungen von der mittleren Fluoreszenzrate (Einzelereignisse). Aufgrund einer beschleunigten Aggregation sind die Proben heterogen bezogen auf die Größe und des Markierungsgrades zusammengesetzt. NaCl zeigte einen ähnlichen, aber deutlich schwächeren Effekt wie KCl. In 50 mM NaCl (E) konnten die Diffusionszeiten der ersten 15 min ausgewertet werden, sie stiegen von etwa 0,4 ms auf über 0,8 ms. Eine Zunahme der Einzelereignisse wurde dagegen in 80 mM NaCl (F) schon innerhalb der ersten 10 min beobachtet und

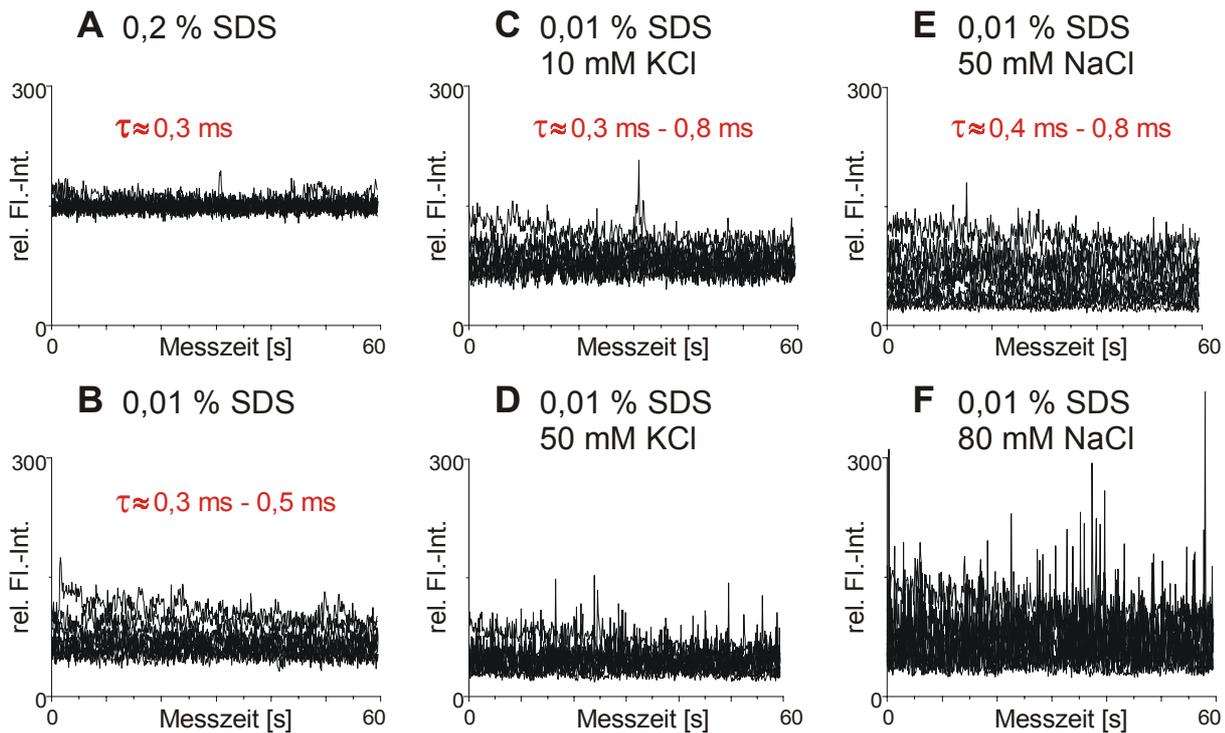


Abbildung 4.13 Einfluss monovalenter Kationen auf die *in vitro*-Aggregation von recPrP(90-231):

Je 100 ng recPrP(90-231) und Cy2-markiertes recPrP(90-231) wurden gemischt und auf die jeweiligen Bedingungen in 10 mM NaP_i, pH 7,2 eingestellt (Endkonzentration: 2,5 ng/μl). Die ersten 10 Fluoreszenz-Fluktuationsspektren jeder FCS-Messung wurden übereinander gelegt und wenn möglich die Diffusionszeiten bestimmt. A) 0,2 % SDS: konst. $\tau \approx 0,3$ ms; B) 0,01 % SDS: $\tau \approx 0,3$ ms – 0,5 ms (innerhalb von 10 min); C) 0,01 % SDS und 10 mM KCl: $\tau \approx 0,3$ ms – 0,8 ms (innerhalb von 12 min.); D) 0,01 % SDS und 50 mM KCl: keine Auswertung möglich; E) 0,01 % SDS und 50 mM NaCl: $\tau \approx 0,4$ ms – 0,8 ms (innerhalb von 15 min, anschl. keine Auswertung mehr möglich); F) 0,01 % SDS und 80 mM KCl: keine Auswertung möglich

Diffusionszeiten konnten nicht mehr bestimmt werden. In 0,2 % SDS aggregierte recPrP(90-231) auch mit NaCl nicht, die Diffusionszeiten blieben wie in Ansatz A konstant und die Fluoreszenz-Fluktuationsspektren waren identisch (Daten nicht gezeigt). Mit Kaliumchlorid konnte diese Kontrolle nicht durchgeführt werden, da das Löslichkeitsprodukt von Kalium-SDS sehr niedrig ist. Auch in Lösungen mit 0,01 % SDS war ein Kalium-SDS Niederschlag sichtbar. Wenn die Beschreibung der Aggregationskinetiken über die Diffusionszeiten nur sehr eingeschränkt möglich war, waren unter allen Bedingungen zeitliche Verläufe qualitativ über die Zunahme der Einzelereignisse in den Fluoreszenz-Fluktuationsspektren zu beobachten. Dies ist exemplarisch für den Ansatz E in Abbildung 4.14 gezeigt.

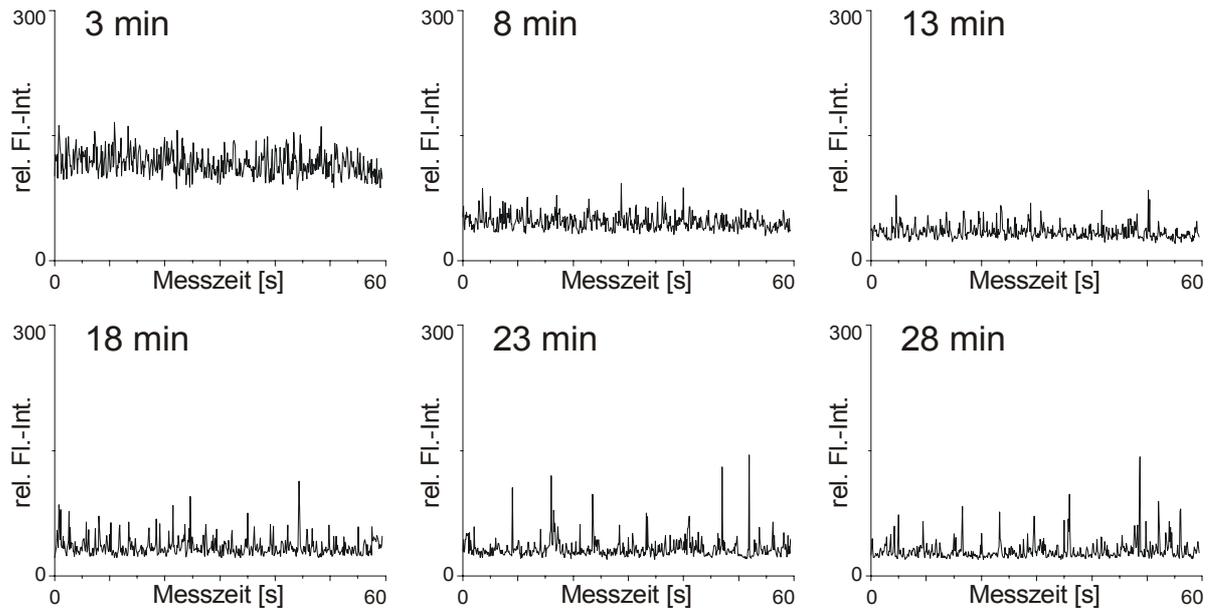


Abbildung 4.14 Aggregationskinetik von recPrP in Gegenwart von 50 mM Na⁺:

100 ng recPrP(90-231) und Cy2-markiertes recPrP(90-231) wurden gemischt und auf 0,01 % SDS mit 50 mM NaCl in 10 mM NaP_i, pH 7,2 eingestellt (Endkonzentration: 2,5 ng/μl; Ansatz E Abb. Abbildung 4.13). Die Fluoreszenz-Fluktuationskurven zu unterschiedlichen Zeitpunkten der FCS-Messungen sind dargestellt. Eine Bestimmung der Diffusionszeiten war schon nach ca. 10 min nur noch ungenau und nach gut 20 min nicht mehr möglich.

Einen deutlich stärkeren Einfluss auf die Aggregationsgeschwindigkeit zeigte das bivalente Magnesium. Bereits in der ersten Minute traten hohe „Fluoreszenzbursts“ auf, die durch hochmarkierte Aggregate hervorgerufen werden. Abbildung 4.15 zeigt die übereinandergelagerten Fluoreszenz-Fluktuationskurven der ersten 10 Messungen von recPrP(90-231) und recPrP(90-231)-Cy2-in 10 mM MgAc, 10 mM NaP_i, pH 7,2. In 0,2 % SDS (A) aggregierte recPrP(90-231) nicht. Die Fluoreszenz-Fluktuationskurven und die berechneten Diffusionszeiten waren mit denen in 0,2 % SDS ohne Kationen bzw. mit NaCl vergleichbar.

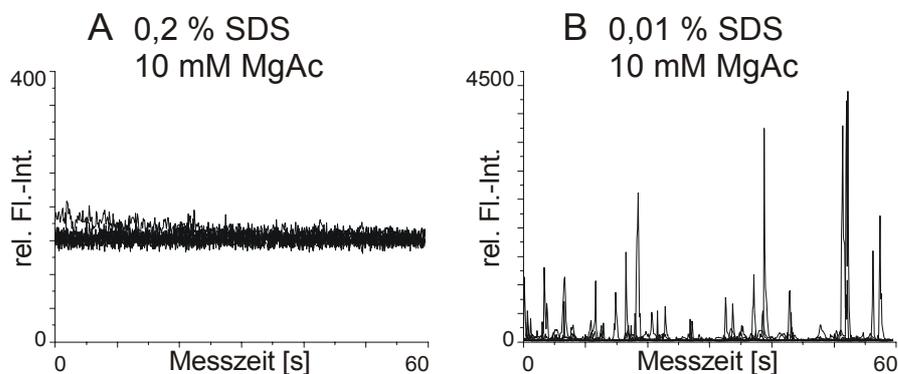


Abbildung 4.15 Einfluss von Mg²⁺ auf die *in vitro*-Aggregation von recPrP(90-231):

Je 100 ng recPrP(90-231) und Cy2-markiertes recPrP(90-231) wurden in 10 mM MgAc, 10 mM NaP_i, pH 7,2 und 0,2 % SDS (A) bzw. 0,01 % SDS (B) analysiert (Endkonzentration: 2,5 ng/μl). Die Fluoreszenz-Fluktuationskurven der ersten 10 FCS-Messungen wurden jeweils übereinandergelagert. Mit SDS (A) war die Diffusionszeit konstant ($\tau \approx 0,25$ ms) während ohne SDS (B) eine Bestimmung nicht möglich war.

Nach Ausdünnen des SDS (B) wurden große „Fluoreszenzbursts“ bis zu 4500 relativen Fluoreszenzeinheiten (> zehnfach erhöht im Vergleich zu den monovalenten Kationen) detektiert.

Wie bereits erwähnt benötigt GroEL für die Freisetzung seines Substrates Mg^{2+} und K^+ . Aufgrund der Wechselwirkung von K^+ mit SDS wurde eine möglichst niedrige Kaliumkonzentration gewählt. Die *de novo* Aggregation im Freisetzungspuffer (10 mM MgAc, 10 mM KCl, 80 mM NaCl, 10 mM 10 mM NaP_i pH 7,2) ist nicht von der *de novo* Aggregation in Anwesenheit von 10 mM MgAc zu unterscheiden. Eine Messung in 0,2 % SDS ist nicht möglich, da SDS Kalium ausfällt (Daten nicht gezeigt). Auch unter den erhöhten Salzbedingungen war die Aggregation PrP-spezifisch. Abbildung 4.16 zeigt den Vergleich von recPrP(90-231) und α -Lactalbumin in Freisetzungspuffer. Im Gegensatz zum Cy-2-markierten α -Lactalbumin aggregierte Cy-2-markiertes recPrP(90-231) in Freisetzungspuffer ohne Zusatz von unmarkiertem Protein. Es bildet hochmarkierte Aggregate, die durch Fluoreszenzbursts detektiert wurden. In Anwesenheit von unmarkiertem recPrP(90-231) wurde dieser Effekt deutlich verstärkt. Mit Cy-2-markiertem und unmarkiertem recPrP(90-231) traten deutlich mehr und auch stärker markierte Aggregate auf, die Fluoreszenzbursts waren um den Faktor 10 erhöht. Keine Aggregation war dagegen mit

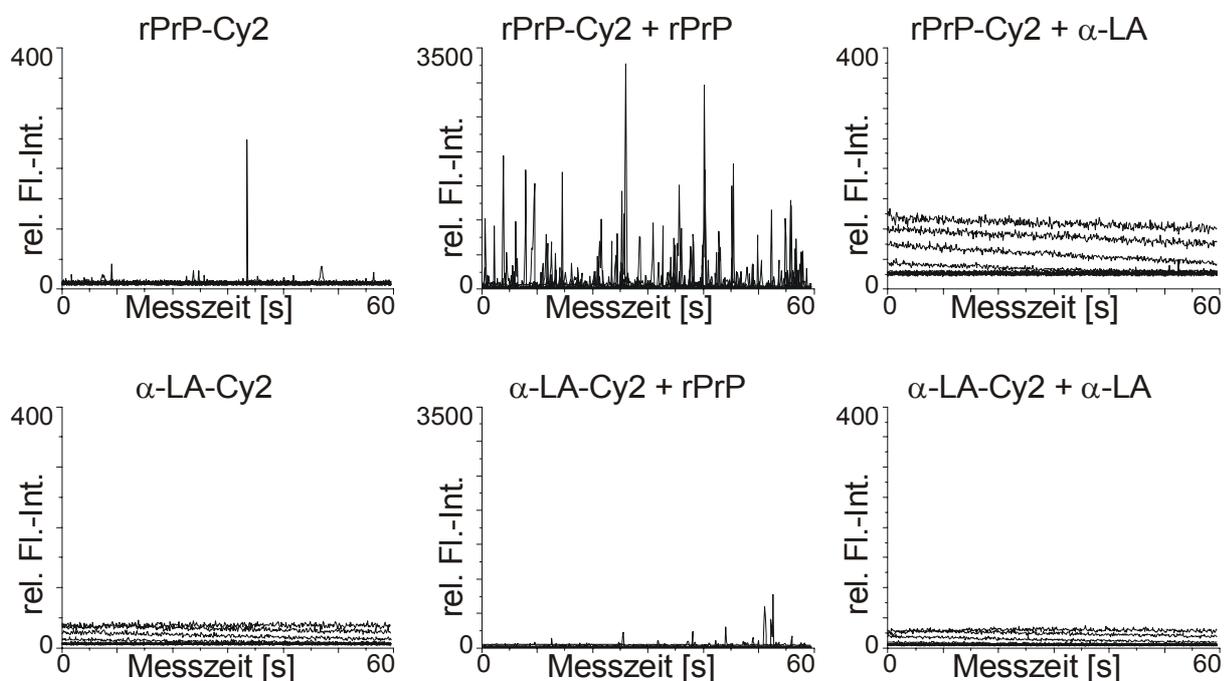


Abbildung 4.16 Spezifität der recPrP(90-231) Aggregation unter den Freisetzungsbedingungen:

Cy2-markiertes recPrP(90-231) bzw. α -Lactalbumin wurde ohne bzw. mit 2,5 ng/ μ l unmarkiertem in Freisetzungspuffer (0,01 % SDS, 10 mM MgAc, 10 mM KCL, 80 mM NaCl, 10 mM NaP_i , pH 7,2) analysiert. Die ersten 10 Fluoreszenz-Fluktuationsspektren der FCS-Messungen wurden jeweils übereinandergelagt.

unmarkiertem α -Lactalbumin zu beobachten. Auch bei Cy-2-markiertem α -Lactalbumin und unmarkiertem recPrP(90-231) waren Aggregate zu beobachten, die sich aber in ihrer Anzahl und Intensität deutlich von denen mit Cy2-markiertem recPrP(90-231) unterschieden. Diese waren auf unspezifische Einschlüsse bei der Aggregation mit unmarkierten α -Lactalbumin zurückzuführen. Auch in diesem Fall war keine Aggregation mit unmarkiertem α -Lactalbumin zu beobachten.

Mit diesen Untersuchungen konnte somit gezeigt werden, dass Kationen die Aggregation von recPrP deutlich beschleunigen. Hierbei haben bivalente Kationen gegenüber monovalenten Kationen einen deutlich stärkeren Einfluss. Die Aggregation ist auch unter den aufgrund der erhöhten Salzkonzentrationen beschleunigten Bedingungen von der SDS-Konzentration abhängig und für recPrP spezifisch.

4.5 Einfluss des molekularen Chaperons GroEL auf die *in vitro*-Konversion

4.5.1 Inhibierung der Aggregation in Natrium-Phosphat-Puffer

Molekulare Chaperone verhindern die vorzeitige oder falsche Faltung von Proteinen in der Zelle. Sie sind ubiquitär bei Pro- und Eukaryoten zu finden. Bei GroEL handelt es sich um ein prokaryotisches Chaperon, dessen eukaryotisches Homolog, das Hsp60 hauptsächlich in den Mitochondrien vorkommt. Strukturell unterscheiden sich diese beiden Chaperonen nicht.

Die Untersuchungen wurden zu Beginn in Analogie zu anderen Rückfaltungsexperimenten mit GroEL durchgeführt. Das Substrat wird in GdnHCl oder Harnstoff denaturiert. Durch Ausdünnen werden native Bedingungen wiederhergestellt, wobei das GroEL in der entsprechenden Konzentration im Ausdünnungspuffer gelöst wird.

Wurde GroEL in diesen Untersuchungen mit dem Ausdünnungspuffer dem recPrP(90-231) zugegeben, so wurden prinzipiell die gleichen Ergebnisse erzielt, die Aggregation wurde inhibiert. Eine bessere Reproduzierbarkeit der Messungen wurde allerdings erreicht, wenn recPrP(90-231) und GroEL vor dem eigentlichen Ausdünnen unter niedrigen SDS-Konzentrationen gemischt wurden. Diesen Konzentrationen (0,05 bis 0,07 % SDS) wurden so gewählt, dass recPrP(90-231) noch nicht aggregierte und eine möglichst niedrige SDS-Konzentration verwendet wurde. So konnte eine denaturierende Wirkung auf das GroEL unterbunden werden, was auch durch die mit und ohne schrittweiser Verdünnung vergleichbaren Ergebnisse gezeigt wurde.

In Abbildung 4.17 ist die Kinetik der *de novo* Aggregation von recPrP(90-231) unter verschiedenen Bedingungen im FCS gezeigt. Wie erwartet aggregierte recPrP(90-231) in 0,07 % SDS nicht, die Diffusionszeit war konstant bei etwa 0,3 ms. Nach Ausdünnen des SDS auf 0,01 % stiegen die Diffusionszeiten innerhalb von 20 min auf über 0,6 ms an. Bei Zugabe eines vierfachen molaren Überschusses an GroEL blieben die Diffusionszeit konstant bei etwa 0,5 ms. Die Erhöhung der Diffusionszeiten deutet auf eine Bindung des Cy-2-markierten recPrP(90-231) an das GroEL hin. In 0,07 % SDS mit einem Überschuss an GroEL war wiederum keine Aggregation zu beobachten, die Diffusionszeiten waren mit etwa 0,3 ms vergleichbar zu denen in 0,07 % SDS ohne GroEL. Dies spricht für eine GroEL-unabhängige Diffusion des Cy-2-markierten recPrP(90-231), eine Bindung an GroEL findet nicht statt. Die Bindung und Inhibierung der Aggregation war GroEL spezifisch. Ein Überschuss an bovinem Serum-Albumin (BSA) oder α -Lactalbumin hatte keinen Einfluss auf die Aggregation auch bei gleicher Proteinmenge (Daten nicht gezeigt, siehe Abbildung 4.18).

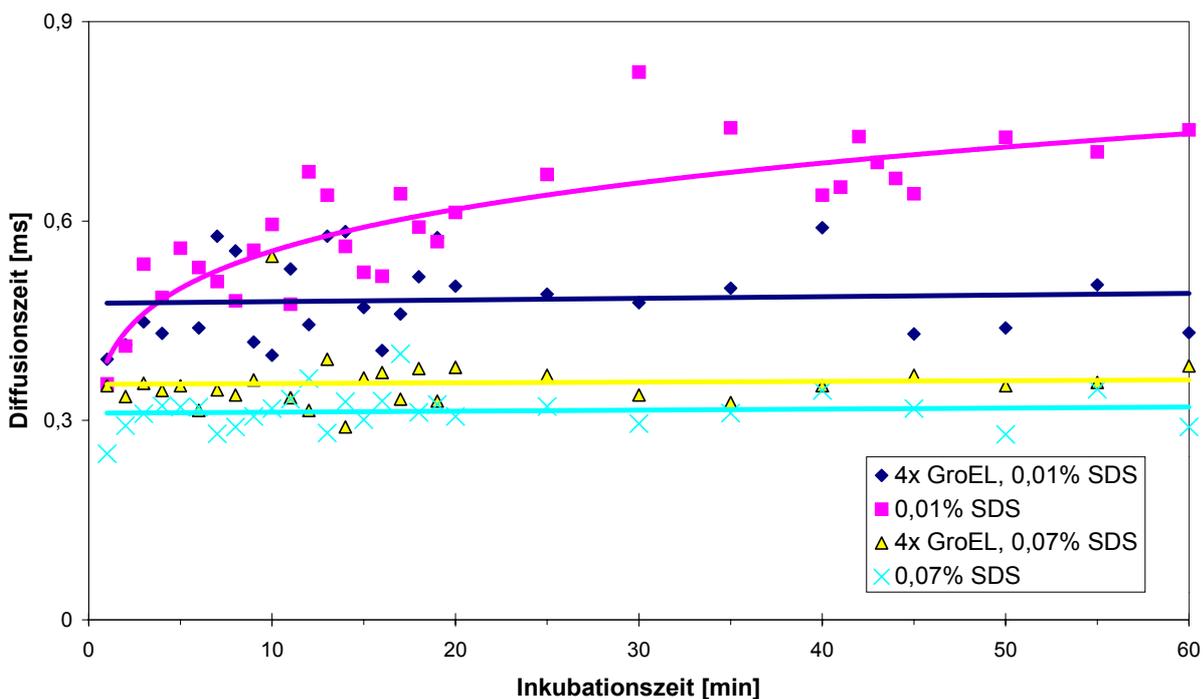


Abbildung 4.17 Einfluss von GroEL auf die *in vitro*-Aggregation recPrP(90-231):

In allen Ansätzen wurden recPrP(90-231) (100 ng) und Cy2-markiertes recPrP(90-231) \pm GroEL bei 0,07 % SDS, 10 mM NaP_i, pH 7,2 vorinkubiert und anschließend auf die angegebenen Bedingungen eingestellt (Endkonzentration recPrP(90-231): 2,5 ng/ μ l). Die Diffusionszeiten wurden aus den Fluoreszenz-Fluktuationskurven zeitabhängig bestimmt. Jede Diffusionszeit entspricht einer FCS-Messung (60 s).

Der Einfluss von GroEL auf die *in vitro*-Aggregation konnte auch durch Untersuchung der Löslichkeit von recPrP verifiziert werden. Dabei wurde recPrP(90-231) in 0,2 % SDS vorgelegt. Mit 10 mM NaP_i, die entweder kein weiteres Protein oder einem vierfachen

molaren Überschuss an GroEL bzw. an BSA enthielten, wurden die Proben auf 0,005 % SDS ausgedünnt. Zur Kontrolle wurde eine Probe auf 0,2 % SDS eingestellt. Abbildung 4.18 zeigt Löslichkeit von recPrP(90-231) nach über Nacht Inkubation bei 37 °C unter den verschiedenen Bedingungen. Mit einem Überschuss an GroEL wurde die Aggregation in 0,005 % SDS verhindert und recPrP(90-231) verblieb wie in 0,2 % SDS im Überstand, während recPrP(90-231) ohne GroEL aggregierte. Dieser Effekt war spezifisch für GroEL, andere Proteine wie BSA oder α -Lactalbumin beeinflussten die Löslichkeit nicht.

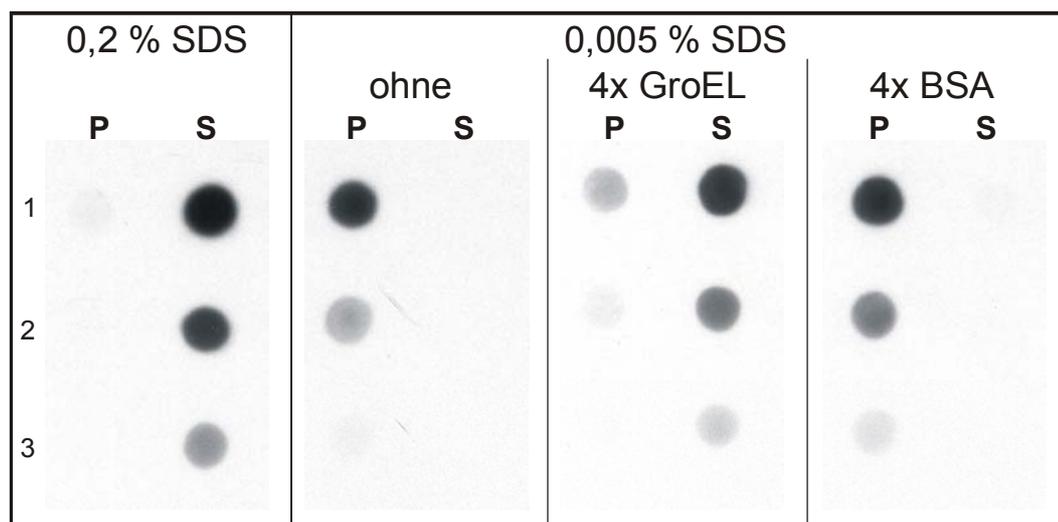


Abbildung 4.18 Spezifität der GroEL Inhibierung:

Je 250 ng recPrP(90-231) in 0,2 % wurden vorgelegt und mit 10 mM NaP_i , pH 7,2 (ohne oder mit einem vierfachen Überschuss an GroEL bzw. BSA) auf 0,005 % SDS ausgedünnt (End-Konzentration recPrP(90-231): 5 ng/ μl). Zur Kontrolle wurde eine Probe auf 0,2 % SDS eingestellt. Nach über Nacht-Inkubation bei 37 °C wurden die Proben für 1 h bei 20 °C und 100.000 g zentrifugiert, Pellet (P) und Überstand (S) getrennt und das Pellet im gleichen Volumen resuspendiert. Die Proben wurden mittels Dot-Blot analysiert (1.-Antikörper: 3F4; ECL-Detektion). Reihe 1 enthielt dreimal mehr recPrP als Reihe 2 und neunmal mehr als Reihe 3.

Die Inhibierung der recPrP(90-231)-Aggregation durch GroEL war konzentrationsabhängig. Abbildung 4.19 zeigt die Aggregationskinetiken von recPrP(90-231) mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen zu GroEL. Ohne GroEL aggregierte recPrP(90-231), die Diffusionszeiten stiegen von 0,3 ms auf ungefähr 0,6 ms. Ein vierfacher molarer Überschuss an GroEL inhibierte die recPrP(90-231)-Aggregation vollständig, die Diffusionszeiten waren konstant bei ungefähr 0,55 ms. Die Aggregationskinetiken bei einem ein- bzw. zweifachen Überschuss an GroEL zeigten eine zunehmend langsamere Aggregation. Durch die Bindung an das GroEL wurde die Konzentration an freiem recPrP(90-231) erniedrigt. Diese Aussage wird durch Untersuchungen gestützt, die die Konzentrationsabhängigkeit der *de novo* Aggregation des recPrP(90-231) ohne Bindung an andere Proteine zeigten (Schäfer, 1997). Zudem sind die Aggregation des recPrP(90-231) und die Bindung an das GroEL Konkurrenz-

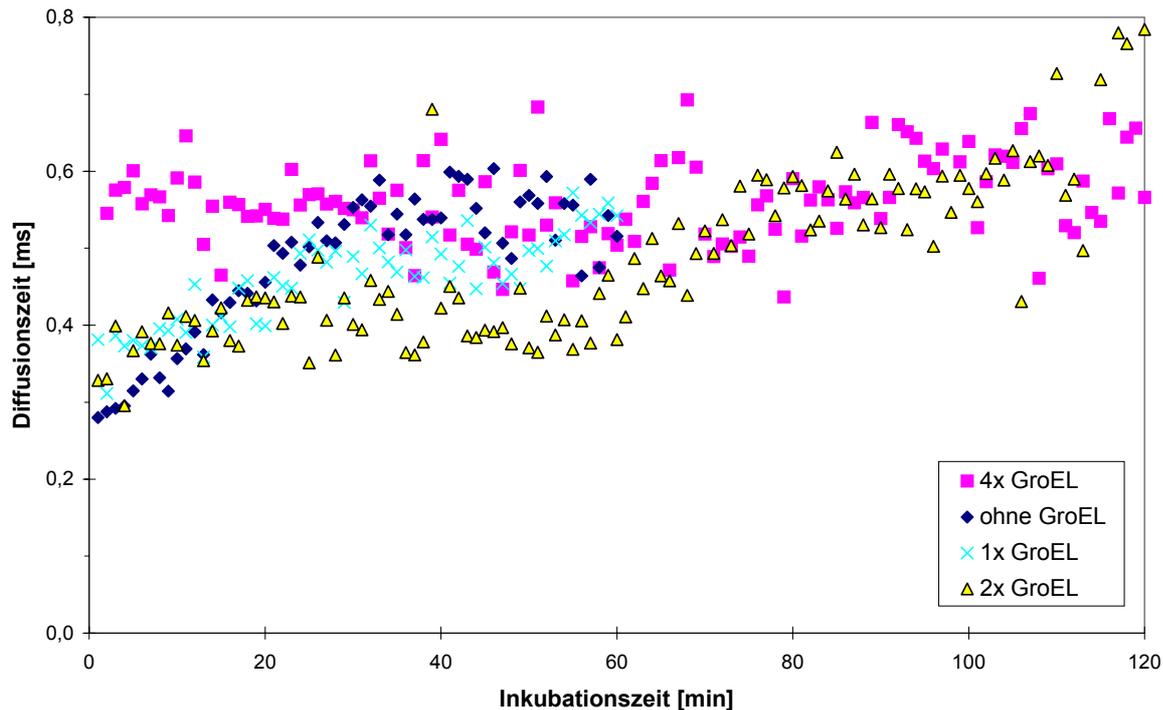


Abbildung 4.19 Konzentrationsabhängigkeit der Aggregationsinhibierung durch GroEL:

Je Ansatz wurden 40 ng recPrP(90-231) und Cy2-markiertes recPrP(90-231) in 0,2 % SDS vorgelegt und mit GroEL-haltiger Lösung verdünnt, so dass Endkonzentrationen von 0,01 % SDS, 1 ng/ μ l recPrP und 0x, 1x, 2x bzw. 4x GroEL eingestellt wurden. Dabei wurden unterschiedliche molare Verhältnisse zwischen recPrP(90-231) und GroEL im FCS zeitabhängig analysiert. Eine vollständige Inhibierung war erst bei einem 4x molaren Überschuss zu beobachten (konst. $\tau \approx 0,55$ ms). Alle Diffusionszeiten wurden als 2-Komponenten System ausgewertet, was für die unvollständige Inhibierung bei 1x bzw. 2x GroEL nicht optimal ist, aber eine bessere Vergleichbarkeit ermöglicht. Dadurch können nur qualitative Aussagen über den Aggregationsprozess gemacht werden, absolute Diffusionszeiten können nicht bestimmt werden.

reaktionen. Bei einem ein- bzw. zweifachen Überschuss an GroEL war die Wahrscheinlichkeit, das recPrP(90-231) auf recPrP(90-231) trifft, größer als bei einem vierfachen Überschuss. Es bildeten sich recPrP(90-231)-Oligomere. Mit zunehmender Größe der Aggregate können diese nicht mehr von GroEL gebunden werden und aggregieren weiter. Diese Ansätze weisen somit eine Heterogenität durch GroEL-gebundenes und aggregiertes recPrP(90-231) auf. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden jedoch alle FCS-Messungen als Zwei-Komponentensystem, mit freiem Cy-2 als erste Komponente ausgewertet. Deshalb können die berechneten Diffusionszeiten nur relativ und nicht absolut betrachtet werden, was für die gemachten Aussagen aber unerheblich ist.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen zeigten, dass ein vierfacher Überschuss an GroEL recPrP auch nach Ausdünnen des SDS löslich hält und dessen Aggregation vollständig unterbindet.

4.5.2 Inhibierung der Aggregation in Freisetzungspuffer

Wie in Kapitel 4.4 dargestellt, ist die Aggregation von recPrP(90-231) stark von der Pufferzusammensetzung abhängig. Daher wurde der Einfluss von GroEL auch im Freisetzungspuffer untersucht und mit anderen Proteinen verglichen.

Das recPrP(90-231) wurde in 0,07 % SDS, 10 mM NaP_i und den verschiedenen Proteinen inkubiert und anschließend mit Freisetzungspuffer verdünnt (Endkonzentration: 10 mM MgAc, 10 mM KCl und 80 mM NaCl). Die Ansätze wurden sofort im FCS analysiert. Die ersten 10 Fluoreszenz-Fluktuationskurven wurden in Abbildung 4.20 übereinandergelegt. Mit einem vierfachen molaren Überschuss (entspricht 20 µg) an GroEL (A) waren keine Fluoreszenzbursts zu beobachten, die Fluoreszenz-Fluktuationskurven konnten autokorreliert werden und die Diffusionszeiten lagen konstant bei ca. 0,55 ms. Ohne andere Proteine (B) waren die typischen Fluoreszenzbursts zu beobachten, d.h. recPrP(90-231) aggregierte wie in Kapitel 4.4 beschrieben. Auch im Freisetzungspuffer war die Inhibierung GroEL spezifisch, ein äquimolarer bzw. 20 µg Überschuss an BSA (C; D) oder α-Lactalbumin (E; F) zeigten keinen Einfluss auf die Aggregation.

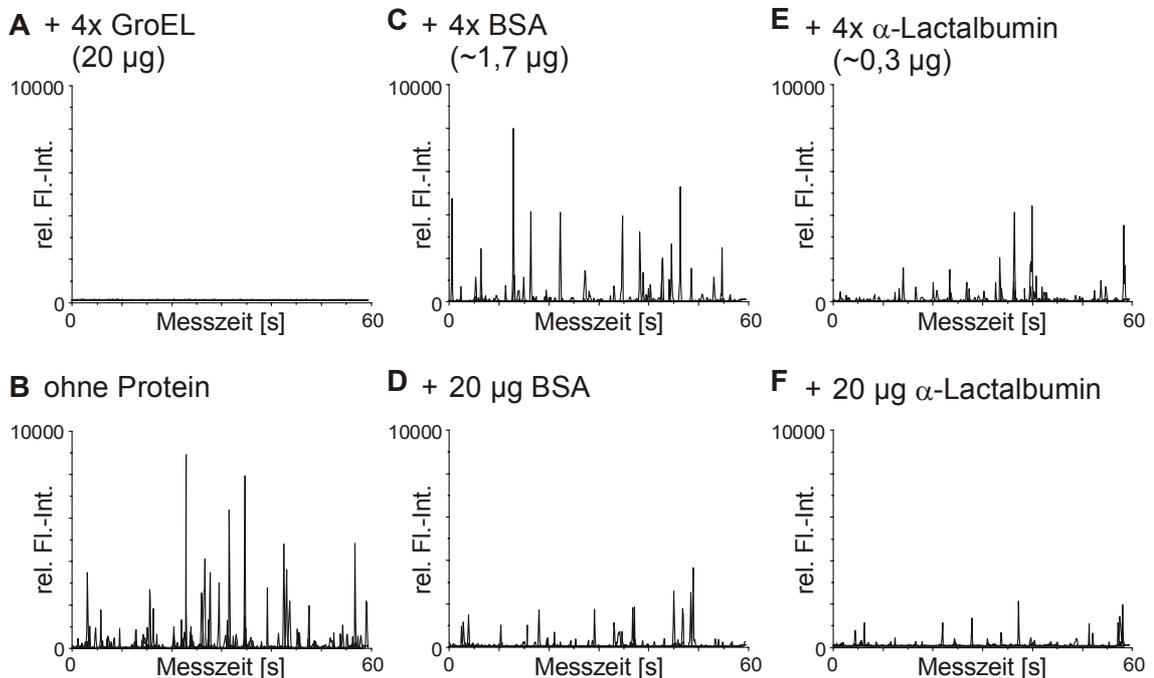


Abbildung 4.20 Spezifität der Aggregationsinhibierung durch GroEL in Freisetzungspuffer:

Je Ansatz wurden 100 ng recPrP(90-231) und Cy2-markiertes recPrP(90-231) nach kurzer Vorinkubation mit dem jeweiligen Protein bei 0,07 % SDS in 10 mM NaP_i, pH 7,2 auf 0,01 % SDS und Freisetzungspuffer eingestellt (Endkonzentration: 2,5 ng/µl). Die Fluoreszenz-Fluktuationskurven der ersten 10 FCS Messungen für jeden Ansatz wurden übereinander gelegt. A) 4x GroEL (\cong 20 µg); B) ohne Protein; C) 4x BSA; D) 20 µg BSA; E) 4x α-Lactalbumin; F) 20 µg α-Lactalbumin

4.5.3 Freisetzung von GroEL

Das molekulare Chaperone GroEL kann Proteine bei der *de novo* Faltung bzw. der Faltung unter Stressbedingungen assistieren (siehe Einleitung). Dabei bindet es das Protein im Inneren und setzt es anschließend ATP-abhängig wieder frei. Aber nicht jedes gebundene Substrat kann auch wieder freigesetzt werden. Bisher konnte gezeigt werden, dass GroEL recPrP als Substrat erkennt und bindet. Im Folgenden wurde untersucht, ob GroEL recPrP(90-231) auch wieder freisetzen kann und es damit recPrP(90-231) bei der Faltung assistieren kann.

Hierfür wurden recPrP(90-231), Cy2-markiertes recPrP(90-231) und vierfach GroEL bei 0,07 % SDS in 10 mM NaP_i, pH 7,2 vorinkubiert und anschließend auf 0,01 % SDS in Freisetzungspuffer eingestellt (End-Konzentration recPrP(90-231): 2,5 ng/μl). Ein Aliquot dieser Probe wurde sofort im FCS analysiert. Nach 30 min wurden ein weiteres Aliquot der Probe auf 3 mM ATP eingestellt und ein drittes mit dem gleichen Volumen H₂O_{deion.} versetzt. Beide Proben wurden parallel im FCS analysiert, wobei immer abwechselnd 5 Fluoreszenz-Fluktuationskurven für eine Probe aufgezeichnet wurden. Wie in Abbildung 4.21 dargestellt, war die Diffusionszeit der Probe in den ersten 30 min konstant ($\tau \approx 0,55$ ms). Nach Zugabe des ATP stiegen die Diffusionszeiten innerhalb von 20 min auf $\tau > 1,0$ ms an, während sie in

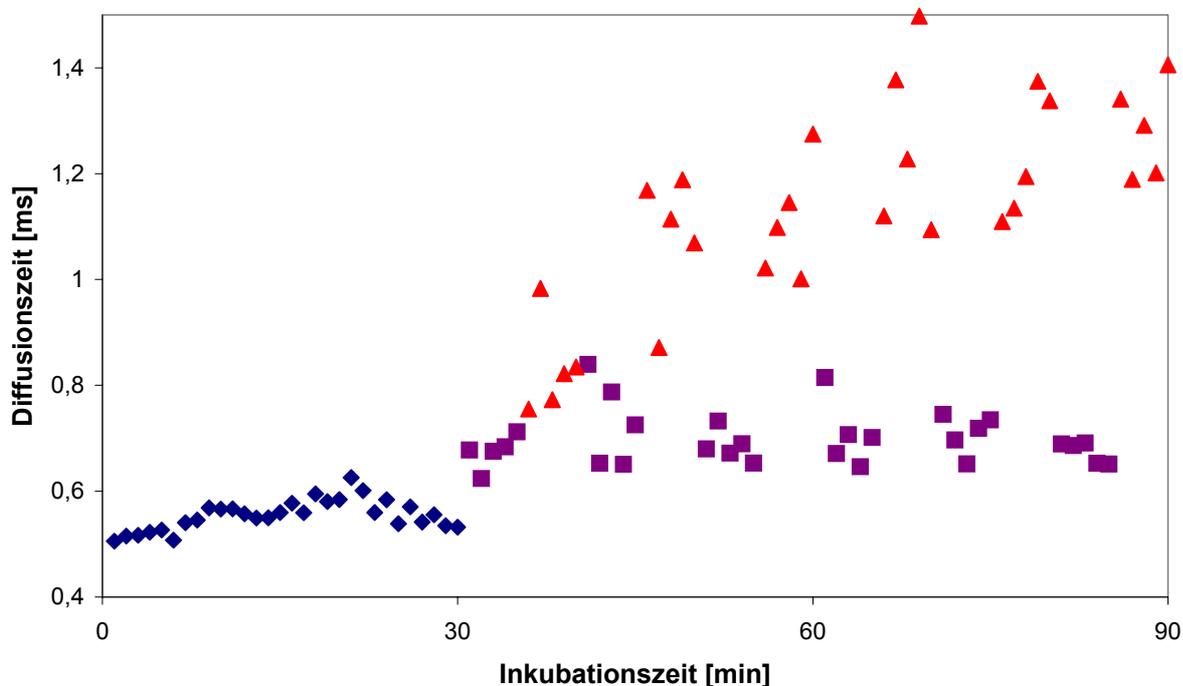


Abbildung 4.21 Freisetzung von rPrP(90-231) aus GroEL-Komplexen:

Je 250 ng recPrP(90-231), Cy2-markiertes recPrP(90-231) und 4x GroEL wurden bei 0,07 % SDS in 10 mM NaP_i, pH 7,2 vorinkubiert und anschließend auf 0,01 % SDS in Freisetzungspuffer eingestellt (End-Konzentration recPrP(90-231): 2,5 ng/μl). Ein Aliquot wurde sofort im FCS analysiert (◆). Nach 30 min wurde ein weiteres Aliquot auf 3 mM ATP eingestellt (▲), ein weiteres diente als Kontrolle ohne ATP (■). Die Fluoreszenz-Fluktuationskurven beider Proben wurden abwechselnd aufgezeichnet und autokorreliert.

der Kontrolle ohne ATP über den gesamten Zeitraum (bis zu 4,5 h) konstant blieben. Die leicht erhöhten Diffusionszeiten in der Kontrolle gegenüber den ersten 30 min waren messtechnisch bedingt.

Der Vergleich der Fluoreszenz-Fluktuationskurven (Abbildung 4.22) zeigt den deutlichen Unterschied zwischen der Aggregation in Freisetzungspuffer ohne GroEL und nach der ATP-abhängigen Freisetzung von GroEL. In Abwesenheit von GroEL aggregierte recPrP sehr schnell, es bildeten sich aufgrund des Mg^{2+} hochmarkierte Fluoreszenzbursts (Kapitel 4.4). Ohne ATP aggregierte recPrP aufgrund der Bindung an GroEL nicht und die Fluoreszenz-Fluktuationskurven konnten autokorreliert werden. Nach ATP-Zugabe und der dadurch bedingten Freisetzung von GroEL aggregierte recPrP wieder. Die Fluoreszenz-Fluktuationskurven waren unter diesen Bedingungen ebenfalls gut autokorrelierbar und der Anstieg der Diffusionszeiten zeigte die Aggregation des recPrP. Das unter den Bedingungen der Freisetzung die Fluoreszenz-Fluktuationskurven auswertbar waren, ist vermutlich auf eine im Gegensatz zu Ansätzen ohne GroEL, verlangsamte Aggregation zurückzuführen. Das recPrP in der Lösung wurde nicht auf einmal aus GroEL freigesetzt, so dass die Konzentration an aggregierendem recPrP geringer war als in den Ansätzen ohne GroEL.

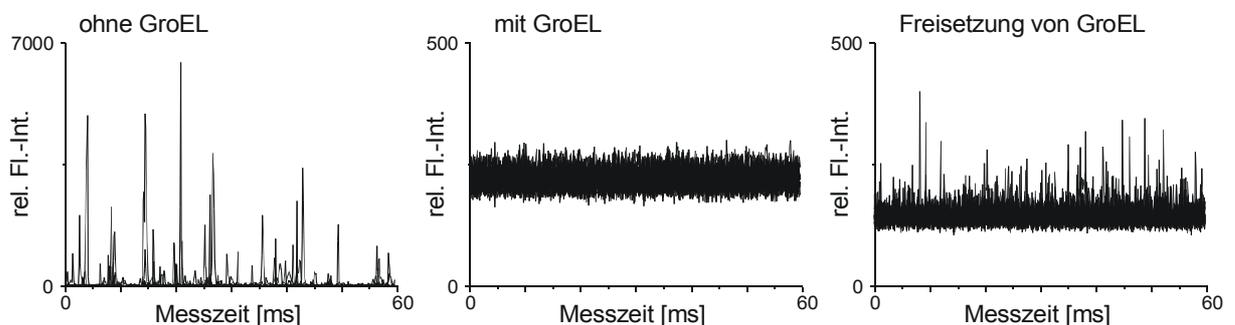


Abbildung 4.22 Freisetzung des recPrP(90-231) aus GroEL-Komplexen.

Die Fluoreszenz-Fluktuationskurven der Ansätze mit und ohne ATP aus Abbildung 4.21 wurden übereinandergelegt. Zum Vergleich wurde 10 Fluoreszenz-Fluktuationskurven eines Ansatzes in Freisetzung ohne GroEL ebenfalls übereinandergelegt, diese waren im Gegensatz zu den anderen nicht mehr autokorrelierbar und eine Bestimmung der Diffusionszeiten nicht möglich.

Die Freisetzung des recPrP(90-231) von GroEL sollte auch über die Löslichkeit bestimmt werden. Dafür wurden recPrP(90-231) und GroEL über Nacht in Freisetzungspuffer mit und ohne ATP inkubiert. Abbildung 4.23A zeigt, dass recPrP(90-231) in beiden Ansätzen ATP-unabhängig pelletierte. Ein Einfluss von GroEL auf die Löslichkeit konnte somit im Gegensatz zu den Untersuchungen in 10 mM NaP_i , pH 7,2 (4.5.1) nicht gezeigt werden. Da aber auch im Freisetzungspuffer eine Interaktion zwischen GroEL und recPrP(90-231) mittels FCS gezeigt werden konnte (dieses Kapitel und Kap. 4.5.2), wurden die Inkubationszeiten im

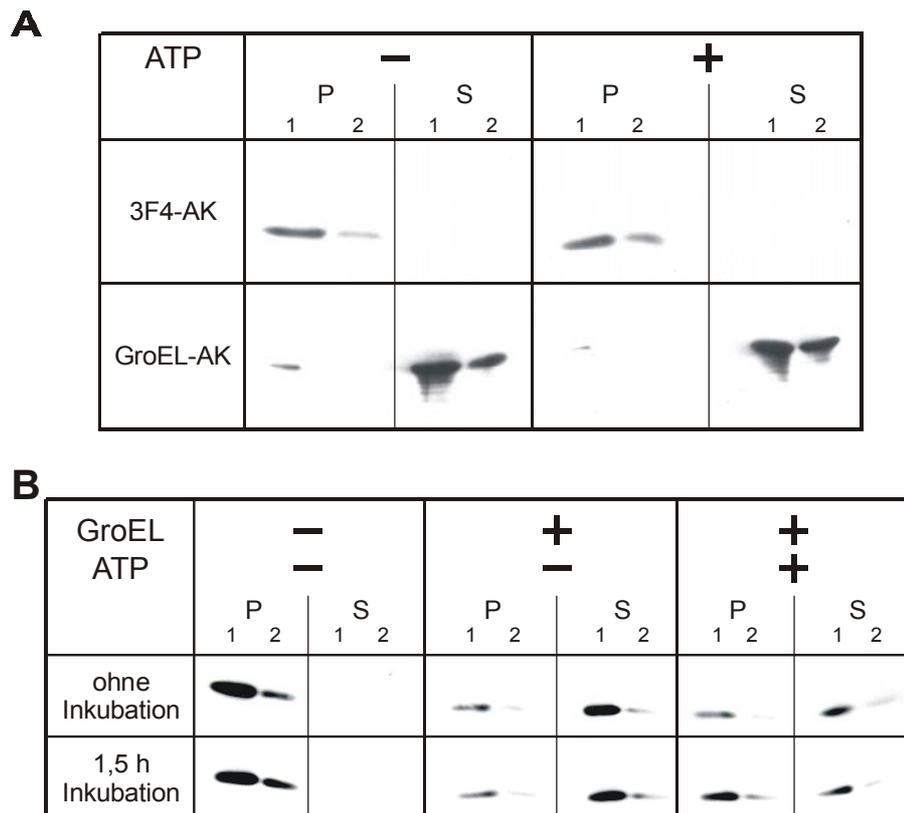


Abbildung 4.23 Western-Blot Analyse der Freisetzung von rPrP(90-231) aus GroEL Komplexen:

A) Je 250 ng recPrP(90-231) und 4x GroEL wurden über Nacht in Freisetzungspuffer \pm 3 mM ATP bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 h bei 25 °C und 100.000 g wurden Pellet (P) und Überstand (S) getrennt und das Pellet im gleichen Volumen resuspendiert. Die Proben wurden in einer 12 %-igen PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (1.-Antikörper: 3F4- bzw. GroEL-Antikörper; ECL-Detektion). **B)** Je 250 ng recPrP(90-231) und 4x GroEL wurden unter den angegebenen Bedingungen in Freisetzungspuffer für verschiedene Zeiten bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 h bei 25 °C und 100.000 g wurden Pellet (P) und Überstand (S) getrennt und das Pellet im gleichen Volumen resuspendiert. Die Proben wurden in einer 12 %-igen PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (1.-Antikörper: 3F4; ECL-Detektion). Die Spuren 1 enthielten eine dreifach höhere Konzentration wie die Spuren 2.

Löslichkeitstest deutlich verkürzt. Die gleichen Ansätze wie für Abbildung 4.23A wurden mehrfach angesetzt und direkt (0 h) und nach 1,5 h auf die Löslichkeit des recPrP(90-231) analysiert. Abbildung 4.23B zeigt, dass recPrP(90-231) alleine ohne Inkubation vollständig pelletierte, während durch Zugabe von GroEL der überwiegende Teil löslich blieb. Im Ansatz mit GroEL ohne Zugabe von ATP war recPrP(90-231) nach 1,5 h immer noch überwiegend löslich, während es mit ATP zu mehr als 50 % pelletierte. Mit zunehmender Inkubationszeit wurden die Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen wieder kleiner, bis der überwiegende Teil der Proben pelletierte. Unter den Freisetzungsbedingungen war die Bindung des recPrP an GroEL nicht so stabil wie im Natriumphosphat-Puffer, was insbesondere bei den Löslichkeitstest deutlich wurde. Bei den erhöhten Kräften, die durch die Zentrifugation auftreten, wurde recPrP nach über Nacht-Inkubation vollständig von GroEL entlassen.

Somit konnte in diesem Kapitel die ATP-abhängige Freisetzung von recPrP aus dem GroEL-Komplex gezeigt werden, was die Grundlage für eine produktive Interaktion mit GroEL ist.

4.5.4 Faltung durch GroEL/ES ist nicht möglich

Nachdem in den Kapitel 4.5.1 – 4.5.3 gezeigt werden konnte, dass GroEL recPrP als Substrat erkennt und ATP-abhängig freisetzen kann, musste die Produktivität der Faltung analysiert werden. Der Begriff produktive Faltung wird in Anlehnung an *in vitro* Renaturierungsexperimente verwendet. Ein Substrat wird nach Denaturierung erneut in native Bedingungen überführt und die unterschiedliche Rückfaltungseffizienz mit und ohne Chaperon verglichen. Da diese Effizienz in der Regel über eine Enzymaktivität des Substrates gemessen wird und diese mit Chaperon in der Regel deutlich erhöht ist, wird von einer produktiven Faltung gesprochen. Für PrP ist bisher keine Enzymaktivität beschrieben, so dass im Folgenden die Löslichkeit als Kriterium für die produktive Faltung analysiert wurde. Zur produktiven Faltung benötigt GroEL die Hilfe seines Co-Chaperones GroES. Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, inwieweit GroEL und sein Co-Chaperone GroES recPrP(90-231) in eine stabil-lösliche Struktur falten können.

Hierbei wurden wiederum recPrP(90-231), Cy2-markiertes recPrP(90-231) und 4x GroEL bei 0,07 % SDS in 10 mM NaP_i, pH 7,2 vorinkubiert. Zusätzlich wurde ein 8facher-molarer Überschuss an GroES zugegeben. Anschließend wurde auf 0,01 % SDS in Freisetzungspuffer eingestellt und ein Aliquot dieser Probe sofort im FCS vermessen. Nach 30 min wurden ein weiteres Aliquot der Probe auf 3 mM ATP eingestellt und ein drittes mit dem gleichen Volumen H₂O_{deion.} versetzt. Beide Proben wurden parallel im FCS analysiert, wobei immer abwechselnd 5 Fluoreszenz-Fluktuationskurven für eine Probe aufgezeichnet wurden. Wie in Abbildung 4.24 dargestellt, war die Diffusionszeit der Probe in den ersten 30 min konstant ($\tau \approx 0,55$ ms). Nach Zugabe des ATP stiegen die Diffusionszeiten innerhalb von 20 min auf $\tau > 1,2$ ms an, während sie in der Kontrolle ohne ATP über den gesamten Zeitraum (bis zu 4,5 h) konstant blieben.

Auch unter dem Einfluss des Co-Chaperones GroES wurde recPrP(90-231) ATP-abhängig freigesetzt und aggregierte nach der Freisetzung wieder. Eine produktive Faltung des recPrP in eine lösliche Form war unter den gegebenen Bedingungen durch den GroEL/ES-Komplex nicht möglich.

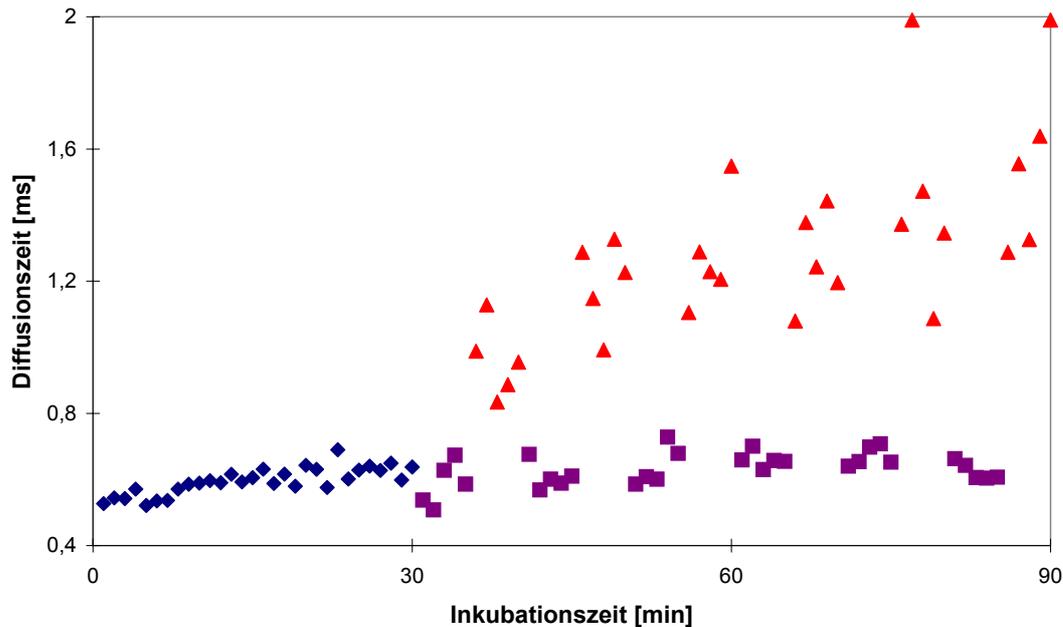


Abbildung 4.24 Freisetzung von rPrP(90-231) aus GroEL/ES-Komplexen:

Je 250 ng recPrP(90-231), Cy2-markiertes recPrP(90-231), 4x GroEL und 8x GroES wurden bei 0,07 % SDS in 10 mM NaP_i, pH 7,2 vorinkubiert und anschließend auf 0,01 % SDS in Freisetzungspuffer eingestellt (Endkonzentration recPrP(90-231): 2,5 ng/μl). Ein Aliquot wurde sofort im FCS analysiert (◆). Nach 30 min wurde ein weiteres Aliquot auf 3 mM ATP eingestellt (▲), ein weiteres diente als Kontrolle ohne ATP (■). Die Fluoreszenz-Fluktuationskurven beider Proben wurden abwechselnd aufgezeichnet und autokorreliert.

4.5.5 Charakterisierung der Aggregate

Die Aggregation von recPrP(90-231) und recPrP(29-231) konnte mit GroEL und GroES nicht dauerhaft, d.h. ohne permanente Bindung an GroEL, verhindert werden. Doch gab es deutliche Unterschiede in den Aggregationskinetiken nach Freisetzung aus dem GroEL bzw. GroEL/ES gegenüber der direkten Aggregation (Kapitel 4.5.3). Da auch eine andere Arbeitsgruppe in einem anderen *in vitro*-Konversionssystem zeigen konnte, dass GroEL die Umwandlung von metabolisch markiertem [S³⁵]-PrP^C in PrP^{res} förderte (DeBurman *et al.*, 1997), sollte die übergeordnete Struktur der Aggregate nach Freisetzung von GroEL über die PK-Resistenz charakterisiert werden. Wie in Kapitel 4.2.2 gezeigt, aggregierte recPrP(29-231) ohne die PrP^{Sc}-spezifische, C-terminale PK-Resistenz zu erhalten. Es interagierte ebenfalls mit GroEL und aggregierte nach Freisetzung wie recPrP(90-231). Da nur mit der Volllänge des rekombinanten Proteins (recPrP(29-231)) Aussagen über eine mögliche Spezifität einer erhöhten PK-Stabilität zu treffen sind, wurde die Charakterisierung mit der Volllänge durchgeführt. Je vier Ansätze mit 10 ng/μl recPrP(29-231) wurden mit GroEL in 0,05 % SDS in 10 mM NaP_i, pH 7,2 inkubiert und anschließend auf 0,01 % SDS in Freisetzungspuffer mit 3 mM ATP eingestellt. Parallel wurden vier Ansätze ohne GroEL angesetzt. Nach über Nacht Inkubation wurden die Ansätze für eine Stunde mit 100.000 g bei 25 °C zentrifugiert und der

Überstand abgenommen. Die Pellets wurden in PK-Puffer resuspendiert und je ein Ansatz mit und ohne GroEL für unterschiedliche Zeiten mit 5 ng/ μ l PK bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Einstellen von 7,5 mM PMSF bei Zugabe von einem Volumen Laemmli-Auftragspuffer und fünf Minuten Kochen gestoppt. Wie in Abbildung 4.25 gezeigt, unterschieden sich die PK-Stabilität der Aggregate ohne GroEL und nach Freisetzung von GroEL nicht signifikant voneinander, was durch weitere Untersuchungen gezeigt wurde. Die erhöhte recPrP-Konzentration nach Freisetzung von GroEL und 15-minütiger PK-Verdauung war auf eine durch GroEL erhöhte Gesamtprotein-Konzentration zurückzuführen. Eine spezifische Verkürzung auf ein N-terminal verkürztes Fragment, welches dem PrP²⁷⁻³⁰ entspricht, war nicht zu beobachten. Die im Vergleich zur Abbildung 4.6 geringere Stabilität der Aggregate war auf die geringere Konzentration des recPrP(29-231) zurückzuführen und war beabsichtigt, um eventuell kleinere Stabilitätsunterschiede zwischen den beiden Ansätzen zu sehen.

Mit der hier verwendeten Methode konnten somit keine Unterschiede in der Aggregatstruktur nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopische Untersuchungen könnten detailliertere Aussagen über die unter den verschiedenen Bedingungen gebildeten Aggregate liefern.

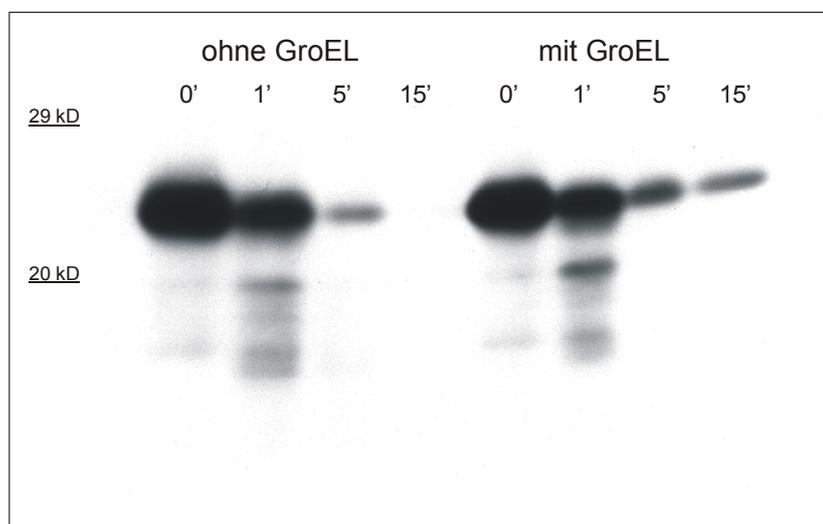


Abbildung 4.25 PK-Verdauung von recPrP(29-231) nach Freisetzung aus GroEL-Komplexen:

Je 4 Ansätze recPrP(90-231) (Endkonzentration: 10 ng/ μ l) wurden mit und ohne 4x GroEL in 0,05 % SDS vorinkubiert und anschließend auf Freisetzungspuffer mit 3 mM ATP eingestellt. Nach über Nacht-Inkubation wurden die Proben für 1 h bei 20 °C und 100.000 g zentrifugiert und Pellet (P) und Überstand (S) getrennt. Die Pellets wurden im gleichen Volumen PK-Puffer resuspendiert und für die angegebenen Zeiten mit 5 ng/ μ l PK inkubiert. Durch Zugabe von 1 Volumen Laemmli-Auftragspuffer mit 15 mM PMSF und 5 min Kochen wurde die PK-Verdauung gestoppt. Die Proben wurden in einer 12 %-igen PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (1.-Antikörper: 3F4; ECL-Detektion).

4.6 Kann GroEL/ES auch mit natürlichem PrP^C wechselwirken ?

Bisher konnte gezeigt werden, dass GroEL mit recPrP wechselwirken und die *in vitro*-Aggregation reversibel inhibieren kann. Eine produktive Faltung in eine entweder dauerhaft lösliche oder gar eine PrP^{Sc}-spezifische Form war nicht möglich. Wenn GroEL bzw. Hsp60 eine Rolle bei der *in vivo* Konversion in die PrP^{Sc} Form haben sollte, müsste es ebenfalls mit posttranslational modifiziertem PrP wechselwirken.

Über Nacht wurden verschiedene Präparationen von solPrP27-30 (Abbildung 4.26) unter verschiedenen Bedingungen inkubiert. Nach Zentrifugation für eine Stunde bei 100.000 g und 25 °C wurden Pellet (P) und Überstand (S) getrennt und mittels Western-Blot analysiert. In 0,2 % SDS war solPrP27-30 jeweils löslich und lies sich im Überstand nachweisen. Nach Ausdünnen des SDS auf 0,001 % und einem Überschuss an GroEL war es immer noch löslich und pelletierte nicht, wohin gegen es in der Kontrolle mit einem Überschuss an BSA pelletierte. Damit konnte gezeigt werden, das GroEL auch mit solPrP27-30 wechselwirkte und die Aggregation verhinderte. Die im Vergleich zu früheren Arbeiten (Post *et al.*, 1998) stärkere Verdünnung des SDS war nötig, da mit weniger PMSF gearbeitet wurde (Kapitel 5.2.2).

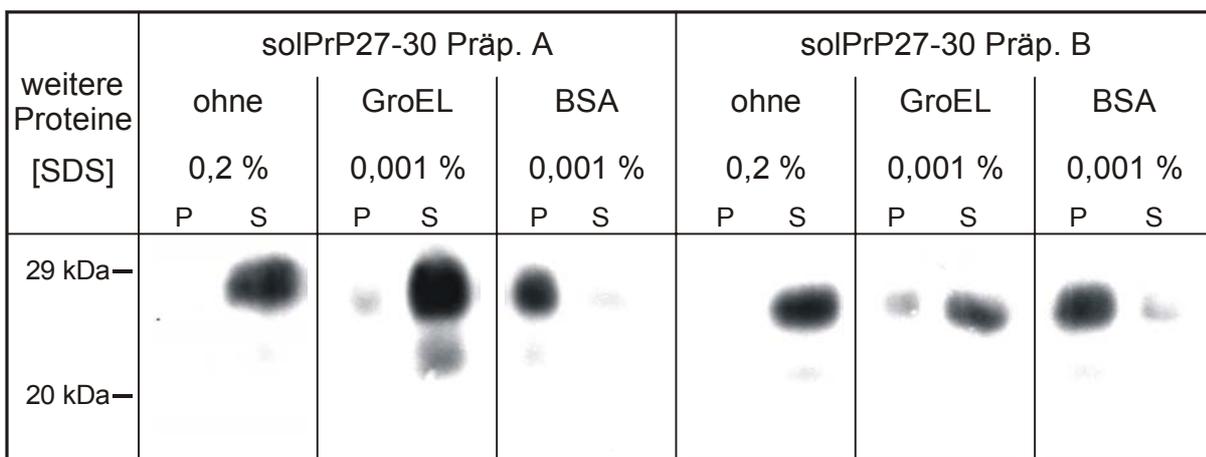


Abbildung 4.26 Einfluss von GroEL auf die *in vitro*-Aggregation von solPrP27-30:

SolPrP27-30 zweier verschiedener Präparationen wurde über Nacht unter den angegebenen Bedingungen bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 h bei 25 °C und 100.000 g wurden Pellet (P) und Überstand (S) getrennt und das Pellet im gleichen Volumen resuspendiert. Die Proben wurden in einer 12 %-igen PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (1.-Antikörper: 3F4; ECL-Detektion).

Dass GroEL nicht nur mit dem N-terminal verkürzten solPrP27-30 sondern auch mit dem Vollängen CHO-PrP^C wechselwirkte, ist in Abbildung 4.27 gezeigt. CHO-PrP^C wurde über Nacht bei 37 °C in 0,2 % SDS oder 0,002 % SDS in 10 mM NaP_i, pH 7,2 inkubiert und die Löslichkeit getestet. Wie schon in Kapitel 4.2.3 gezeigt aggregierte CHO-PrP^C in 0,2 % SDS nicht wohin gegen es nach Ausdünnen des SDS auf 0,002 % SDS aggregierte. Durch Zugabe

eines Überschusses an GroEL konnte die Aggregation auch bei CHO-PrP^C inhibiert werden. Ein Überschuss an BSA als Kontrolle hatte dagegen keinen Effekt, das CHO-PrP^C aggregierte. Im Überstand der Proben mit GroEL bzw. BSA war jeweils bei starker Exponierung eine inverse Färbung durch das nicht pelletierte Proteine zu erkennen (→).

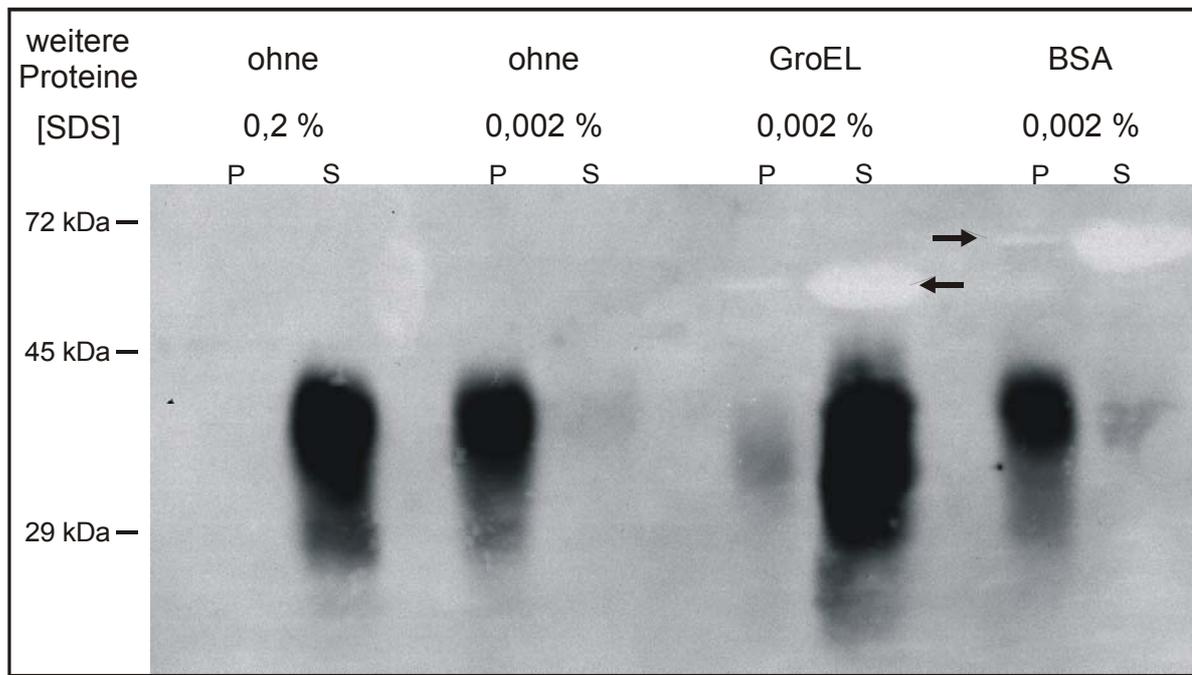


Abbildung 4.27 GroEL Einfluss auf Reaggregation von CHO-PrP^C:

Das CHO-PrP^C wurde über Nacht unter den angegebenen Bedingungen bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation für 1 h bei 25 °C und 100.000 g wurden Pellet (P) und Überstand (S) getrennt und das Pellet im gleichen Volumen resuspendiert. Die Proben wurden in einer 12 %-igen PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (1.-Antikörper: 3F4; ECL-Detektion).

In wie weit mit dem posttranslational modifiziertem PrP eine Faltung in eine lösliche Form möglich war, wurde durch Freisetzung aus GroEL/ES Komplexen analysiert. Abbildung 4.28 zeigt die Ergebnisse mit solPrP27-30 und CHO-PrP^C in Freisetzungspuffer mit 3 mM ATP nach über Nacht-Inkubation bei 37 °C. GroEL und GroES wurden im Überschuss mit einem Verhältnis von 1:1 bzw. 1:2 eingesetzt. Die Proben wurden für eine Stunde bei 100.000 g und 25 °C zentrifugiert, Pellet (P) und Überstand (S) getrennt und im Western-Blot analysiert. Auch nach Freisetzung aus den Komplexen mit GroEL/ES pelletierten die posttranslational modifizierten Prion-Proteine, eine Faltung in eine stabil lösliche Form war nicht möglich.

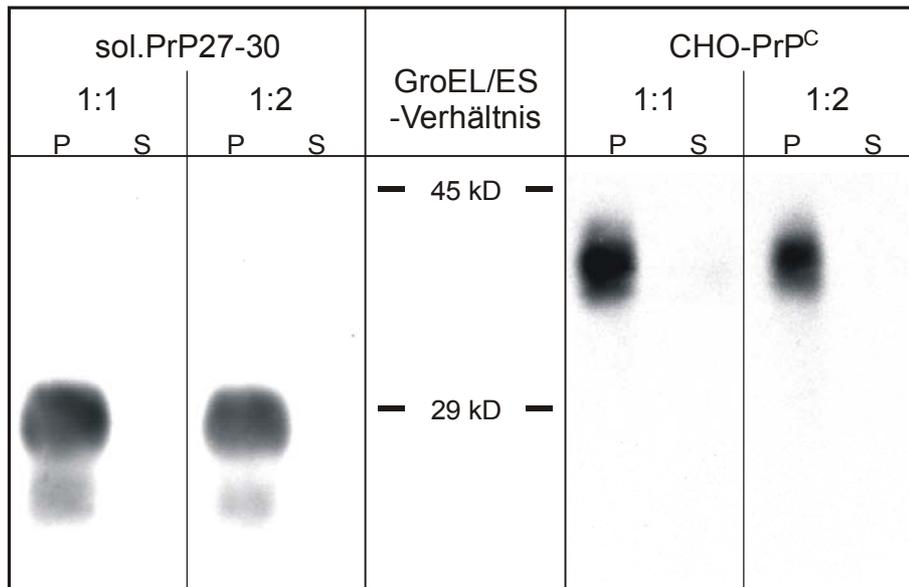


Abbildung 4.28 Freisetzung von PrP^C von GroEL/ES Komplexen:

SolPrP27-30 bzw. CHO-PrP^C wurden mit einem Überschuss GroEL bei 0,05 % SDS vorinkubiert und anschließend auf die angegebenen GroEL/ES-Verhältnisse und 0,002 % SDS in Freisetzungspuffer mit 3 mM ATP eingestellt. Nach über Nacht Inkubation bei 37 °C wurden die Proben für 1 h bei 25 °C und 100.000 g zentrifugiert. Der Überstand (S) und das Pellet (P) wurden getrennt und das Pellet im gleichen Volumen resuspendiert. Die Proben wurden in einer 12 %-igen PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (1.-Antikörper: 3F4; ECL-Detektion).

Für die posttranslational modifizierten Prion-Proteine konnte mit diesen Untersuchungen zum ersten Mal sowohl eine Interaktion mit GroEL, als auch die Freisetzung aus dem GroEL/ES-Komplex gezeigt werden. Gleichzeitig war eine Faltung in eine stabil-lösliche Form unter diesen Bedingungen wie bei recPrP nicht möglich.

5 Diskussion

5.1 Die *in vitro*-Konversion des Prion-Proteins

Das von S.B. Prusiner (1982c) postulierte Prion-Modell besagt, dass ein Erreger (Prionen) fast vollständig aus dem wirtseigenen Prion-Protein besteht. Die Replikation der Prionen erfolgt durch Konversion des zellulären PrP (PrP^{C}) in die krankheits-assoziierte Isoform (PrP^{Sc}). Obwohl eine Vielzahl von Indizien das Prion-Modell stützen, konnte es bis heute nicht endgültig bewiesen werden. Durch die *in vitro* Umwandlung von nicht-infektiösem PrP^{C} in infektiöses PrP^{Sc} wäre das Prion-Modell bewiesen. *In vitro*-Konversionssysteme, die diese Umwandlung nachzustellen versuchen, müssen grundsätzlich in Keim-induzierte-Modelle und *de novo*-Modelle unterschieden werden. Die Keim-induzierten-Modelle verwenden i.d.R. radioaktiv-markiertes PrP^{C} und einen Überschuss an teildenaturiertem PrP^{Sc} (Kocisko *et al.*, 1994; Caughey *et al.*, 1995). Das konvertierte PrP ist unlöslich und gegen PK-Verdauung resistent (PrP^{res}). Obwohl auch Stamm-spezifische Charakteristika (PK-Schnittstelle) des eingesetzten PrP^{Sc} erhalten blieben (Kocisko *et al.* 1995; Bessen *et al.*, 1995), konnte keine neue Infektiosität generiert werden (Hill *et al.*, 1999). Aufgrund des Überschusses an eingesetztem, infektiösem PrP^{Sc} ist der Nachweis neuer Infektiosität in diesem System schwierig und Untersuchungen der Proteinstruktur unmöglich. *De novo*-Modelle, wie unser SDS-abhängiges *in vitro*-Konversionssystem, arbeiten dagegen fast ausschließlich mit nicht-infektiösem, rekombinantem PrP. Die Konversion wird ohne Zugabe von PrP^{Sc} durch Änderungen im Lösungsmittel (pH-Wert, Detergenz-Konzentration) induziert. Dadurch kann das konvertierte Protein nicht nur biochemisch charakterisiert, sondern auch auf Sekundärstrukturänderungen und auf Infektiosität untersucht werden. Während die Keim-induzierten-Modelle die infektiöse Ätiologie von Prion-Erkrankungen nachstellen, spiegeln die *de novo*-Modelle die sporadischen Formen wieder. Sie können jedoch durch Zugabe von Keimen für die infektiöse Ätiologie erweitert werden.

Die vorliegende Arbeit basierte auf einem *in vitro*-Konversionssystem, das von in 0,2 % SDS solubilisierten PrP27-30 oder auf 0,2 % SDS eingestellten recPrP(90-231) ausgeht (Post *et al.*, 1998). Nach Entfernung des SDS durch Verdünnung auf unter 0,01 % kommt es nach einer schnellen Strukturumlagerung (Zunahme des β -Faltblattanteils) zu einer schnellen Aggregation. Neben dieser β -Faltblattstruktur und der Bildung unlöslicher Aggregate, wiesen insbesondere die recPrP(90-231)-Aggregate mit einer erhöhten PK-Stabilität und einem neurotoxischen Effekt ähnliche Eigenschaften wie PrP^{Sc} auf (Post *et al.*, 1998; Post *et al.*, 2000). Eine fibrilläre Struktur der Aggregate, wie sie für PrP27-30 gezeigt ist und

für PrP^{Sc} diskutiert wird, konnte bisher genauso wenig wie neugenerierte Infektiosität gezeigt werden. Durch den Einsatz von recPrP(29-231), das dem nicht modifiziertem Volllängen-Protein bis auf die sechs N-terminalen Aminosäuren entspricht, und von posttranslational modifiziertem CHO-PrP^C wurde unser *in vitro*-Konversionssystem erweitert.

5.1.1 *In vitro*-Konversion des rekombinanten PrP(29-231)

Prionen zeichnen sich unter anderem durch eine enorme Stabilität gegen Verdauung durch Proteinasen aus. PrP^{Sc} wird durch Proteinase K spezifisch N-terminal verkürzt (PrP27-30). Diese N-terminale Verkürzung konnte in den früheren Untersuchungen nicht gezeigt werden, da das eingesetzte solPrP27-30 aus dem bereits verkürzten PrP27-30 präpariert wurde (Post *et al.*, 1998). Das ebenfalls eingesetzte recPrP(90-231) entspricht in der Aminosäuresequenz ebenfalls der bereits verkürzten Form. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die *in vitro*-Konversion des recPrP(29-231) insbesondere mit Blick auf die PK-Prozessierung analysiert.

Wie in Kapitel 4.2.1 gezeigt, aggregierte recPrP(29-231) nach Ausdünnen des SDS. Dabei bildete sich wie bei recPrP(90-231) eine β -Faltblatt-reiche Struktur (Birkmann, 2000). Die gebildeten Aggregate zeigten eine erhöhte PK-Stabilität, die mit der beschriebenen PK-Stabilität für recPrP(90-231) vergleichbar ist (Post *et al.*, 1998). Unter diesen Bedingungen wurde über den Versuchszeitraum kein Abbau des aggregierten Volllängen Proteins beobachtet, während das in 0,2 % SDS lösliche recPrP(29-231) abgebaut wurde. Die erhöhte PK-Stabilität bezog sich also auf das Volllängen-Protein und nicht auf die für PrP^{Sc} typische Resistenz des C-Terminus. Die größere PK-Stabilität kann somit auf einer schlechteren Zugänglichkeit der gebildeten Aggregate für die Proteinase K beruhen, die durch die starke Zentrifugation noch verstärkt wurde. Beim Abbau des löslichen recPrP(29-231) bildeten sich verschiedene Zwischenprodukte, von denen das Größte dem N-terminal verkürzten PrP entsprechen kann. Dieser präferentielle N-terminale Abbau stimmt auch mit Untersuchungen zu den zellulären Abbauwegen des PrP^C überein (Jiménez-Huete *et al.*, 1998). Sie zeigten, dass PrP^C über verschiedene Zwischenprodukte vom N-Terminus aus abgebaut wird, wobei eines durch einen Schnitt zwischen Aminosäure 80 und 100 und das andere um Aminosäure 112 gebildet wurden und beide den intakten C-Terminus enthielten. Die NMR-Strukturen des recPrP zeigten neben einer gut definierten Struktur im C-terminalen Bereich ab Aminosäure 121 einen undefinierten, flexiblen N-terminalen Abschnitt (Riek *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 1999, Zahn *et al.*, 2000), welcher den präferentiellen Abbau erklären kann.

Die fehlende PrP^{Sc}-spezifische PK-Prozessierung würde so gegen eine wirkliche Umwandlung von recPrP, und damit gegen das von uns entwickelte *in vitro*-Konversionssystem sprechen (siehe Kapitel 5.1.3 und 5.3). Ihre Verwendung als Marker für die *in vitro*-Konversion ist aber zur Zeit nicht uneingeschränkt möglich. Infektiosität konnte zum einen trotz einer PrP^{Sc}-spezifischen PK-Prozessierung in einem Keim-induzierten *in vitro*-Konversionssystem nicht gezeigt werden (Hill *et al.*, 1999). Zum anderen wurde sogar Infektiosität ohne PK-resistentes Prion-Protein beschrieben (Lasmézas *et al.*, 1997; Safar *et al.*, 2000; Hill *et al.*, 2000), so dass PK-sensitive aber infektiöse Zwischenprodukte im Laufe einer Infektion entstehen müssen. Solche PK-sensitiven Zwischenprodukte können auch bei der *in vitro*-Konversion eine Rolle spielen. Zudem konnte bisher in keinem *in vitro*-Konversionssystem *de novo*, d.h. ohne externe PrP^{Sc}-Zugabe, eine PrP^{Sc}-spezifische PK-Prozessierung gezeigt werden.

5.1.2 *In vitro*-Konversion von natürlichem PrP

Die bisherigen Untersuchungen auf Infektiosität konnten nur mit rekombinantem PrP durchgeführt werden, das im Gegensatz zum zellulären PrP keine N-Glykosylierungen und keinen GPI-Anker aufweist. Es ist aber fraglich, ob recPrP überhaupt in eine infektiöse Form überführt werden kann, da *in vivo* sowohl PrP^C als auch PrP^{Sc} modifiziert vorliegen. Das von Post *et al.* (1998) ebenfalls verwendete solPrP27-30 war zwar modifiziert, aber aufgrund einer Hintergrundinfektiosität waren Aussagen über neu-generierte Infektiosität schwierig. Mit dem etablierten Aufreinigungsprotokoll (Kapitel 4.1 und Elfrink, 2001) für posttranslational modifiziertes PrP^C aus CHO-Zellkulturen steht nun natürliches, nicht infektiöses PrP als Ausgangsmaterial für die *in vitro*-Konversion zur Verfügung.

Durch starkes Ausdünnen des SDS (Faktor 100) konnte die Aggregation des auf 0,2 % SDS eingestellten CHO-PrP^C ebenfalls induziert werden. Hierbei wurde eine Umfaltung zu einer β -Faltblatt-reichen Struktur beobachtet (Kapitel 4.2.2). Wie auch in dieser Arbeit gezeigt aggregierten nicht alle Präparationen des CHO-PrP^C nach maximaler Ausdünnung des SDS. Untersuchungen mit recPrP zeigten ebenfalls Schwankungen in der SDS-Konzentration, bei der die Aggregation beobachtet wurde. Dies kann zum Teil auf die Präparation der Proteine zurückgeführt werden. Die Aufarbeitung des recPrP und der Detergenzwechsel des CHO-PrP^C wurden in Centrikon-Röhrchen durchgeführt. Bei der Zentrifugation mit 0,2 % SDS wurde hierbei das SDS mit aufkonzentriert. Laut Herstellerangaben passieren bei 0,1 % SDS nur zwischen 40 – 89 % und bei 1 % SDS weniger als 40 % des SDS die

Membran. Diese Ergebnisse konnten durch vorläufige, massenspektrometrische Untersuchungen tendenziell bestätigt werden, wobei die absolute SDS-Konzentration nicht genau bestimmbar war (Daten nicht gezeigt). Daher wurde bei den SDS-Angaben immer von der eingestellten SDS-Konzentration ausgegangen.

Die Aufkonzentrierung des SDS beim Detergenzwechsel alleine kann aber nicht den hohen Verdünnungsfaktor für die Induktion der Aggregation des CHO-PrP^C erklären. Wie im Kapitel 4.6 beschrieben, zeigte solPrP27-30 ein zu PrP^C ähnliches, gegenüber früheren Untersuchungen mit solPrP27-30 deutlich unterschiedliches, Aggregationsverhalten. Unter den vorherigen Bedingungen wurde das SDS auf 0,01 % ausgedünnt (Faktor 20; Post *et al.*, 1998), während das SDS unter den hier verwendeten Bedingungen deutlich stärker (Faktor 200) ausgedünnt werden musste, um die Aggregation zu induzieren. Wie bei den CHO-PrP^C-Präparationen aggregierten auch nicht alle solPrP27-30-Präparationen unter diesen Bedingungen bei maximaler Ausdünnung des SDS. Neben Präparations-bedingten Unterschieden, solPrP27-30 wird aus hochaufgereinigten Prion-Stäbchen solubilisiert, wurden die Bedingungen für die *in vitro*-Konversion geändert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zugabe von PMSF zur Inhibierung von Proteinaseaktivität bei den Inkubationen deutlich reduziert (1 – 2 mM), wobei vorhandene Proteinasen immer noch vollständig inaktiviert wurden. Bei den früher verwendeten 7,5 mM PMSF wurden die Lösungen während der Zugabe des PMSF durch Flockenbildung trüb, auch wenn sie mit der Zeit wieder deutlich aufklärten. Diese Flocken könnten die *in vitro*-Konversion mit induzieren, indem sie als unspezifische Keime für die weitere Anlagerung des solPrP27-30 dienen. Aus diesem Grund wurde versucht, die *in vitro*-Konversion unter Bedingungen zu induzieren, bei denen keine Flocken durch PMSF gebildet werden. Mit 7,5 mM PMSF aggregierten auch die hier verwendeten solPrP27-30-Präparationen bei 0,01 % SDS (Daten nicht gezeigt; Leffers, persönliche Mitteilung).

Die deutlichen Unterschiede im Aggregationsverhalten zu recPrP müssen auf die posttranslationalen Modifikationen der natürlichen Prion-Proteine zurückgeführt werden. Während der hydrophobe GPI-Anker das Protein eher unlöslich macht, steigern die beiden N-Glykosylierungen die Löslichkeit. Da natürliches PrP im Gegensatz zu recPrP bei deutlich stärkerer Verdünnung des SDS aggregiert, überwiegt der Effekt der N-Glykosylierungen.

5.1.3 Was kann das SDS-abhängige *in vitro*-Konversionssystem leisten ?

In unserem *in vitro*-Konversionssystem können für verschiedene Prion-Proteine *de novo* Eigenschaften von PrP^{Sc} nachgestellt werden (Post *et al.*, 1998; Birkmann, 2000; Jansen *et al.*, 2001). Das konvertierte PrP zeigt eine zu PrP^{Sc} vergleichbare Sekundärstrukturverteilung und bildet große Aggregate aus. Neben einer erhöhten PK-Stabilität zeigten diese Aggregate in Zellkultur einen neurotoxischen Effekt. Dennoch konnte bis heute keine neugenerierte Infektiosität und damit die wichtigste Eigenschaft einer Konversion zu PrP^{Sc} gezeigt werden. Diese fehlende Infektiosität kann durch die in Kapitel 5.3 allgemein für alle beschriebenen *in vitro*-Konversionssysteme diskutierten Faktoren begründet sein. Es ist aber nicht auszuschließen, dass es sich bei unserem System um eine durch SDS-beschleunigte Aggregation des PrP handelt. Wie auch in dieser Arbeit gezeigt, ist PrP ein tendenziell unlösliches Protein und leichte Veränderungen der Lösungsbedingungen beeinflussen die Aggregation deutlich. So beschleunigten Kationen in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration und -wertigkeit die Aggregation. Die fehlende PrP^{Sc}-spezifische PK-Resistenz (Kapitel 5.1.1), die PMSF-abhängige Aggregation (Kapitel 5.1.2) und die amorphe Struktur der Aggregate könnten auch auf eine unspezifische, d.h. nicht krankheits-assoziierte, Aggregation hindeuten. Proteine neigen unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. nach Denaturierung, zur Aggregation. Hierbei können sogar bei der Wahl geeigneter Bedingungen nicht krankheits-assoziierte Proteine *in vitro* in amyloide, fibrilläre Strukturen überführt werden (Guijarro *et al.*, 1998; Damaschun *et al.*, 1998; Chiti *et al.*, 1999).

Die weitere Charakterisierung des SDS-abhängigen *in vitro*-Konversionssystems, insbesondere mit natürlichem, d.h. posttranslational modifizierten PrP, wird seine Relevanz für die Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} bei Prion-Erkrankungen zeigen. Wenn auch derzeit keine vollständige Konversion des PrP möglich ist, so sind zumindest strukturelle Ähnlichkeiten in der Sekundärstruktur des aggregierten Proteins vorhanden. Inwieweit die von uns eingestellte β -Faltblatt-reiche Struktur mit der Struktur des PrP^{Sc} übereinstimmt ist nicht bekannt. Neben ein anderen Sekundär- oder Tertiärstruktur bei gleichen Sekundärstrukturanteilen für PrP^{Sc}, könnten die anschließenden weiteren Schritte (u.a. Aggregation, Anlagerung; Kapitel 5.3) in unserem *in vitro*-Konversionssystem noch zu unspezifisch sein. Dennoch stellt unser System zur Zeit das am besten charakterisierte *in vitro*-Konversionssystem, das *de novo* (d.h. ohne Zugabe von exogenen PrP^{Sc}) Eigenschaften des PrP^{Sc} generieren kann, dar.

5.2 Einfluss von Faltungshilfen auf die *in vitro*-Konversion

Wie in Kapitel 1.3 ausführlich dargelegt, können einige Eigenschaften des Erregers der Prion-Erkrankungen nicht über die einfache Strukturumlagerung des Prion-Proteins erklärt werden. So konnten Wildtyp-Mäuse und transgene Mäuse, die das humane PrP exprimierten, nicht mit dem CJD-Erreger infiziert werden (Telling *et al.*, 1994 und 1995). Durch Expression eines chimären (murinen-humanen-murinen) Prion-Proteins war eine Infektion dagegen sehr wohl möglich (Kaneko *et al.*, 1997). Ebenso ist es bisher keiner Arbeitsgruppe gelungen neue Infektiosität *in vitro* zu generieren, obwohl andere Eigenschaften des PrP^{Sc} wiederum hergestellt werden konnten (Kocisko *et al.*, 1994; Post *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 1999; Swietnicki *et al.*, 2000). Nach dem *Template assistierten Annealing-Modell* von Cohen & Prusiner (1998) existiert ein wirtseigener Faktor, Protein X genannt, der eine entscheidende Aufgabe bei der Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} übernimmt. Dieser stabilisiert eine Übergangsstruktur von PrP^C. Von Chaperonen ist bekannt, dass sie Proteine bei der Faltung unterstützen. Deshalb werden Chaperone als Faktor X bei der Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} diskutiert.

5.2.1 Chemische Chaperone

Der Einfluss der chemischen Chaperone DMSO und Glycerol auf unser SDS-abhängiges *in vitro*-Konversionssystem wurde untersucht. Beide chemischen Chaperone konnten die Aggregation von recPrP *in vitro* nicht verhindern, was durch die Unlöslichkeit bei differentieller Ultrazentrifugation und einer Zunahme der Diffusionszeiten und damit der Molekulargewichte in den FCS-Untersuchungen gezeigt wurde (Kapitel 4.3).

Im Gegensatz dazu zeigten Tatzelt *et al.* (1996), dass genau diese chemischen Chaperone die Bildung von unlöslichem und PK-resistenten PrP in einem Zellkultursystem verhindern. Dabei reduzierten bereits 100 mM (etwa 0,7 %) DMSO die Bildung von PrP^{Sc} um mehr als 50 %, wobei höhere Konzentrationen nicht eingesetzt werden konnten, da DMSO die Morphologie und Viabilität der Neuroblastomazellen beeinflusste. Glycerol verhinderte ebenfalls diese Umwandlung, allerdings erst bei deutlich höheren Konzentrationen (bis 1 M, etwa 7,3 %). Da es im Unterschied zu DMSO die Morphologie und Viabilität der Zellen nicht beeinflusste, konnte sowohl eine Zeit- als auch Dosisabhängigkeit gezeigt werden. Die Autoren diskutierten eine die Struktur des zellulären PrP^C stabilisierende Wirkung der chemischen Chaperone, die die Umwandlung des PrP^C in PrP^{Sc} unterbindet.

Chemische Chaperone wurden ebenfalls in dem Keim-induzierten *in vitro*-Konversionssystem auf ihre Wirksamkeit getestet (DeBurman *et al.*, 1997). Während Glycerol und Cyclodextrine keinen Effekt auf die Bildung von PrP^{res} zeigten, wirkten Saccharose und Trehalose in hohen Konzentrationen (> 1 M) inhibierend. Dagegen hatte DMSO bei dieser Untersuchung eine komplexe Wirkung, bei mittleren Konzentrationen (0,3 bis 3 % DMSO) verstärkte es die Bildung von PrP^{res}, wohingegen es die Umwandlung bei höheren Konzentrationen inhibierte.

Selbst unter der Annahme, dass jedes der aufgeführten Konversionssysteme ein geeignetes Modell für die Konversion zu PrP^{Sc} darstellt, lassen sich die scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse aufklären. Alle Ergebnisse der verschiedenen Konversionssysteme müssen immer unter den ihnen zugrunde liegenden Einschränkungen betrachtet werden. So betrachtet z.B. das Zellkultursystem das in PrP^{Sc} umgewandelte PrP^C und damit das Endprodukt eines zellulären Prozesses. Substanzen, die diese PrP^{Sc}-Bildung verhindern, müssen nicht unbedingt die Strukturumwandlung oder den Aggregationsprozess direkt beeinflussen, sondern können auch auf sekundäre Prozesse wirken. Glycerol zeigte z.B. in keinem der beiden *in vitro*-Konversionssysteme einen inhibierenden Effekt, obwohl es die Bildung des PrP^{Sc} im Zellkultursystem verhinderte. DMSO und TMAO beeinflussten sogar direkt die Viabilität und Morphologie der Zellen, so dass auch hier sekundäre Effekte denkbar sind.

Auch wenn Glycerol und DMSO die Aggregation in unserem *in vitro*-Konversionssystem nicht verhindern konnten, so waren deutliche Unterschiede in der Aggregationskinetik zu beobachten (Abbildung 4.11 und 4.12). Weitere Untersuchungen gaben zusätzliche Hinweise darauf, dass die in Anwesenheit der chemischen Chaperone gebildeten Aggregate unterschiedliche Strukturen aufweisen könnten. Neben den veränderten Aggregationskinetiken wurde eine leichte Verschiebung zu einer β -Faltblatt reicheren Struktur in 10 % Glycerol beobachtet. Diese Unterschiede können auf unterschiedliche Sekundär- oder Tertiärstrukturen der aggregierenden Prion-Proteine zurückzuführen sein. Eine unterschiedliche Hydratisierung der einzelnen Moleküle, bedingt durch die chemischen Chaperone, kann für die unterschiedlichen Strukturen verantwortlich sein (Kapitel 1.2.1). Substanzen wie Glycerol oder DMSO werden von der Oberfläche der Proteine ferngehalten und es bildet sich eine Zone reinen Wassers an der Proteinoberfläche. Diese Zone reinen Wassers ist aufgrund der höheren Ordnung thermodynamisch ungünstig und kleine Proteinoberflächen werden bevorzugt. Die Beschleunigung der Aggregation durch die verschiedenen Kationen (Kapitel 4.4) bestätigt einen starken Einfluss der Hydrathülle auf die

Aggregation. Kationen in Lösung liegen anders als die chemischen Chaperone hydratisiert vor und konkurrieren so mit der Protein-Hydrathülle um freies Wasser. Dadurch werden hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Für Glycerol ist neben diesem direkten Einfluss auf die Struktur der einzelnen Polypeptidketten auch ein indirekter Einfluss über die Aggregationsgeschwindigkeit denkbar. Die durch Glycerol erhöhte Viskosität kann die Bildung von geordneteren Aggregaten fördern. Inwieweit die chemischen Chaperone die Struktur der PrP-Aggregate verändern und somit vielleicht die *in vitro*-Konversion fördern, kann durch zukünftige elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden. Für Alzheimer-Peptide wurde eine solche Beschleunigung der Strukturumwandlung zu einer β -Faltblattstruktur und der Fibrillogenese durch Glycerol bereits beschrieben (Yang *et al.*, 1999).

5.2.2 Das molekulare Chaperon GroEL

Neben den chemischen Faltungshilfen wurde auch das molekulare Chaperon GroEL auf seinen Einfluss in unserem *in vitro*-Konversionssystem untersucht. Bei GroEL handelt es sich um ein Chaperon aus *E. coli*, das zu der Hsp 60-Familie gehört und zum humanen Hsp 60 hohe strukturelle Ähnlichkeiten aufweist. Es konnte hier gezeigt werden, dass aggregierendes Prion-Protein von GroEL als Substrat erkannt und gebunden wird. Die erhöhten Diffusionszeiten von 0,50 bis 0,55 ms des an GroEL gebundenen fluoreszenzmarkierten recPrP (Abbildung 4.17) stimmten gut mit anderen GroEL/Substrat-Untersuchungen mittels FCS überein (Pack *et al.*, 1999; Pack *et al.*, 2000). Durch die Bindung an das GroEL wird das Prion-Protein an der Aggregation gehindert. Die anschließende Freisetzung aus dem Komplex mit GroEL resultierte in einer erneuten Aggregation des recPrP unabhängig von der Anwesenheit des Co-Chaperones GroES. Entweder konnte recPrP nicht in eine native, lösliche Form gefaltet werden oder die richtiggefaltete Struktur war unter den Bedingungen der Freisetzung nicht stabil und lagerte sich sofort wieder um. In ähnlichen Untersuchungen in einem anderen wässrigen System wurde gezeigt, dass murines recPrP ebenfalls von GroEL gebunden und freigesetzt wird (Stöckel & Hartl, 1999 Keystone-Symposium). Nach der Freisetzung war auch hier eine Aggregation des recPrP zu beobachten, wobei in diesem System die Aggregation unter bestimmten Bedingungen erst durch die Bindung und Freisetzung induziert wurde.

Abbildung 5.1 zeigt ein zusammenfassendes Modell für die Aggregation des recPrP in Abhängigkeit von GroEL. Wie in Kapitel 4.2 gezeigt, ist recPrP in rein-wässrigen Lösungen nicht dauerhaft, wohl aber für begrenzte biophysikalische Studien löslich, durch Zugabe von

SDS kann recPrP dauerhaft in Lösung gehalten werden. Hierbei bleibt eine überwiegend α -helikale Struktur erhalten, die aber im Vergleich zu recPrP ohne Detergenz einen höheren Anteil an Zufallsknäuel besitzt (Post *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 2001). Durch das SDS bilden sich Protein-SDS-Komplexe, wie sie bereits für andere Proteine mittels Neutronen-Streuung

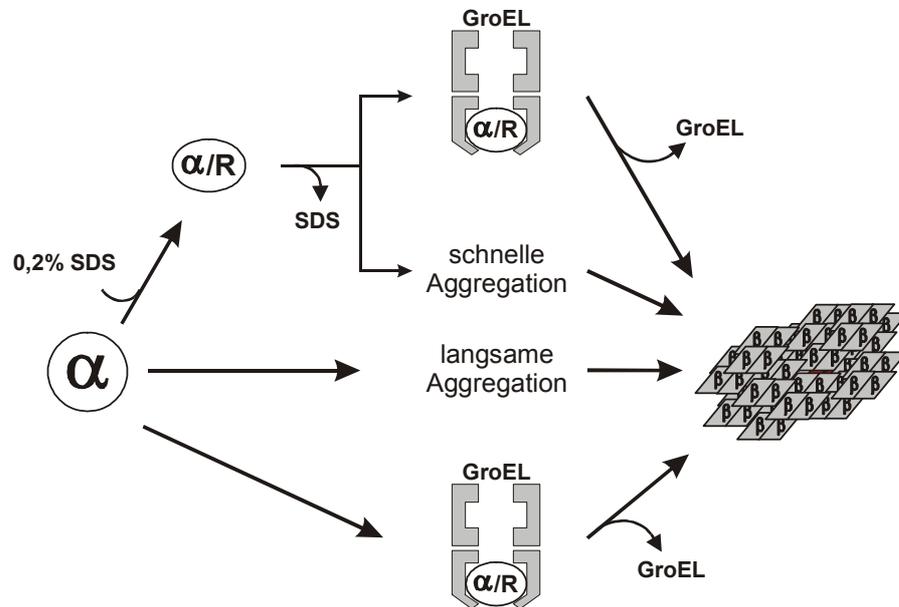


Abbildung 5.1 Modell für die Wechselwirkung von PrP mit GroEL im Aggregationsprozess:
Erläuterungen siehe Text; α : α -helikal; R: Zufallsknäuel; β : β -Faltblatt-reich

beschrieben wurden (Ibel *et al.*, 1990). In diesen sogenannten „Protein-dekorierten Micellen“ liegen hydrophobe Aminosäurereste mit den hydrophoben Kohlenwasserstoffketten des SDS im Inneren, während hydrophile Proteinabschnitte zusammen mit den negativ-geladenen Sulfatgruppen an der Oberfläche der Micellen liegen. Eine Entfernung des SDS durch Verdünnung führt zu einer schnellen Aggregation des recPrP, wobei große Aggregate mit hohem β -Faltblattanteil gebildet werden (Post *et al.*, 1998). Diese schnelle Aggregation kann durch den erhöhten Anteil an Zufallsknäuelstruktur in den recPrP-SDS-Komplexen erklärt werden. Untersuchungen mit GdnHCl zeigten ein Faltungsintermediat mit hohem Sekundärstrukturanteil, aber geringer Tertiärstruktur (Safar *et al.*, 1994). Ein solches, als „Molten Globule“ bezeichnetes (Ku wajima, 1989, Ptitsyn & Uversky, 1994), Faltungsintermediat wird für den recPrP-SDS-Komplex diskutiert (Jansen, 1998).

Unabhängig von den Bedingungen unter denen recPrP an GroEL bindet, führt die Freisetzung zur Aggregation (Kapitel 4.5.3 und 4.5.4; Stöckel & Hartl, Keystone-Symposium). Dieser durch die Freisetzung von GroEL induzierte Effekt könnte auf eine Destabilisierung der recPrP-Struktur aufgrund der Bindung an GroEL zurück geführt werden. Für GroEL konnte in Untersuchungen mit anderen Substraten gezeigt werden, dass es sein

Substrat bei der Bindung entfalten kann (Zahn *et al.*, 1996 a und b).

Die in Abbildung 5.1 aufgezeigten Aggregationswege weisen keine deutlichen Unterschiede für die gebildeten Aggregate auf. Alle Aggregate waren unlöslich und zeigten eine erhöhte PK-Stabilität. Eine Prionen-spezifische PK-Resistenz des C-Terminus wurde nicht bzw. nur marginal beobachtet (Abbildung 4.6 und 4.24; Hartl, persönliche Mitteilung). DebBurman *et al.* (1997) zeigten dagegen einen spezifischen Effekt von GroEL in einem Keim-induzierten *in vitro*-Konversionssystem. In diesem System steigerte GroEL nicht nur die Effizienz der *in vitro*-Konversion, sondern konnte diese auch ohne Teildenaturierung des PrP^{Sc} durch GdnHCl induzieren. Wie in Kapitel 4.3 dargelegt benötigt GroEL für die Freisetzung erhöhte Salzbedingungen. DebBurman verwendete deshalb für die *in vitro*-Konversion 10 mM MgCl₂, 1,5 mM NaCl und 140 mM KCl. Spätere Arbeiten in dem gleichen *in vitro*-Konversionssystem zeigten einen deutlichen Einfluss von NaCl und KCl auf die *in vitro*-Konversion (Horiuchi & Caughey, 1999). Die Konvertierung des [S³⁵]-PrP erfolgte hier bei 100 bis 200 mM NaCl oder 100 bis 500 mM KCl ebenfalls ohne Teildenaturierung des PrP^{Sc}. Diese Bedingungen waren mit denen von DebBurman *et al.* (1997) gewählt vergleichbar. Daher könnte die von ihnen beobachtete durch GroEL induzierte *in vitro*-Konversion überwiegend durch die erhöhten Salzbedingungen ausgelöst sein. Dies würde mit den hier vorgestellten Daten zum Einfluss von GroEL auf die *in vitro*-Konversion (Kapitel 4.5) und der starken Beschleunigung der Aggregation durch Kationen (Kapitel 4.4) gut übereinstimmen.

5.2.3 Prion-Erkrankungen und Chaperone

Für den Faktor X, der bisher nur genetisch definiert ist, wird eine Chaperon-ähnliche Funktion diskutiert (zum Überblick: Zahn *et al.*, 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten deutlich eine Interaktion des Chaperons GroEL mit rekombinantem und natürlichem Prion-Protein. Auch wenn in unserem *in vitro*-Konversionssystem die Bildung von PrP^{Sc} durch das Chaperon GroEL bisher nicht gezeigt werden konnte, kann *in vivo* eine essentielle Funktion für das homologe, humane Hsp 60 der Mitochondrien derzeit nicht ausgeschlossen werden. Für humanes Hsp 60 wurde eine Interaktion mit PrP *in vitro* bereits beschrieben (Edenhofer *et al.*, 1996). Eine Interaktion von PrP und Hsp 60 im normalen Zellzyklus ist aber aufgrund der Lokalisation in Mitochondrien eher als unwahrscheinlich anzusehen, da PrP^C über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur äußeren Plasmamembran transportiert wird. Von dort wird es

wahrscheinlich über Caveolae wieder internalisiert und in Lysosomen abgebaut (Borchelt *et al.*, 1992; Vey *et al.*, 1996; Jiménez-Huete *et al.*, 1998). Jedoch wurde maturiertes Hsp 60 vereinzelt in anderen Zellkompartimenten als den Mitochondrien beschrieben (Velez-Granzel *et al.*, 1994; Soltys & Gupta, 1996 und 1997). Desweiteren konnten Interaktionen von Hsp 60 zu Membran-assoziierten Proteinen gezeigt werden (Ikawa & Weinberg, 1992; Jones *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 1998), so dass auch eine Interaktion mit dem membrangebundenen PrP^C denkbar ist. Für maturiertes PrP, d.h. mit Glykosylierungen und GPI-Anker, wurde ebenfalls eine Wechselwirkung mit GroEL und damit die Grundlage für eine *in vivo* Funktion im Rahmen dieser Arbeit gezeigt (Kapitel 4.6). Eine Bindung des Hsp 10, des zu GroES homologen Co-Chaperons, ist bei Membran-gebundenen Substraten nicht möglich. Daher ist eine Freisetzung des Prion-Proteins in eine für die Umwandlung zu PrP^{Sc} notwendigen intermediären Struktur denkbar. Dies wäre wiederum in Übereinstimmung mit den *in vitro* Ergebnissen von DebBurman *et al.* (1997). Sie konnten PK-resistentes PrP ohne Teildenaturierung des PrP^{Sc} durch GdnHCl nur nach Freisetzung von GroEL ohne Co-Chaperon zeigen, während die Freisetzung aus den GroEL/ES-Komplexen keine Umfaltung zu PrP^{res} ergab.

So lange die *in vitro*-Konversion von PrP^C in die infektiöse Form, PrP^{Sc}, nicht gelungen ist, können auch andere zelluläre Chaperone nicht als essentielle Komponente ausgeschlossen werden. Untersuchungen mit Zelllysaten in einem zu Kocisko *et al.* (1994) ähnlichen Keim-induzierten *in vitro*-Konversionssystem zeigten eine Beteiligung eines zellulären Proteins (Saborio *et al.*, 1999).

Die Untersuchungen mit Chaperonen waren bisher auf die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} fokussiert, wobei Chaperone auch in einem anderen Prozess der Replikation als essentielle Komponente beteiligt sein können. Nach dem von Eigen beschriebenen Replikationsmodell (Abbildung 5.2) kann die Umwandlung von PrP^C oder eines Intermediates (PrP*) nur an den Enden der PrP^{Sc}-Aggregate erfolgen. Dieses Modell stellt eine Kombination des Template-assistierten Anlagerungsmodells und des Keim-induzierten Polymerisationsmodells dar. Hierbei ist die Fragmentierung, bei der die Zahl der umfaltungsaktiven Enden vergrößert wird, für die Replikation ebenfalls essentiell. Chaperone könnten an der Fragmentierung der PrP^{Sc}-Aggregate beteiligt sein. Eine solche Funktion wird z.B. dem Hsp 104 bei dem Prion-ähnlichem Phänotyp [PSI+] in Hefen zugeschrieben, der extrachromosomal vererbt wird. Überexpression sowie Deletion des Chaperons kurieren diesen Phänotyp (Tuite & Lindquist, 1996). Andere Arbeiten zeigten, das Hsp 104 Proteinaggregate wieder

aufbrechen kann (Parsell *et al.*, 1994), so dass bei fehlendem Hsp 104 keine neuen Keime für die Proteinanlagerung entstehen. Wird Hsp 104 dagegen überexprimiert, werden die Aggregate schneller aufgebrochen als sie wachsen und können somit nicht mehr als Keime wirken. In beiden Fällen wäre die Folge, dass keine effektive Anlagerung und Umfaltung von zellulärem Protein stattfinden kann. Eine Interaktion mit PrP wurde ebenfalls schon gezeigt (DeBurman *et al.*, 1997, Schirmer & Lindquist, 1997), wobei ein homologes Chaperon in Säugern bisher nicht beschrieben wurde.

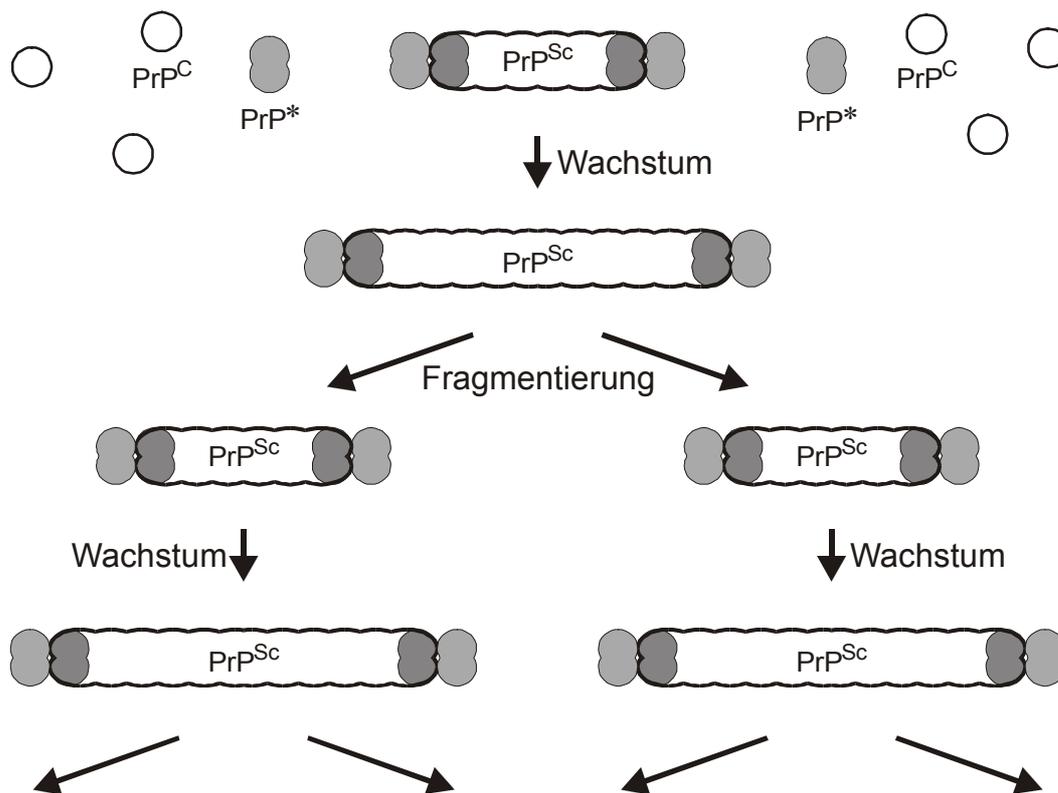


Abbildung 5.2 Modell für die Replikation von Prionen:

Erläuterungen siehe Text (Verändert nach Eigen, 2001)

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Chaperone auf verschiedenste Weisen die PrP^C-Konversion beeinflussen können. Neben einer essentiellen Funktion bei der Strukturumlagerung bzw. der Vervielfältigung der Umfaltungs-aktiven Keime, ist die Inhibierung der Konversion ein wichtiger Aspekt für die weitere Erforschung und der eventuellen Behandlung von Prion-Erkrankungen. Analog zu dem Hsp 104 der Hefen ist auch die Auflösung der gebildeten PrP^{Sc}-Aggregate durch Chaperone und damit die Entfernung von Umfaltungs-aktiven Keimen denkbar. Letztere Fragestellungen können erst nach Etablierung eines *in vitro*-Konversionssystem, dass die Bildung des PrP^{Sc} ermöglicht, sinnvoll untersucht werden.

5.3 Warum wurde bisher *in vitro* keine neue Infektiosität generiert?

Nach dem Prion-Modell kann durch Umwandlung von nicht-infektiösem Prion-Protein Infektiosität generiert werden. Da dieses *in vitro* noch nicht gelungen ist und somit das Prion-Modell noch nicht bewiesen werden konnte, wird im Folgenden allgemein für *in vitro*-Konversionssysteme diskutiert werden:

i) Das Prion-Modell ist prinzipiell falsch:

Es wird aber nur noch von wenigen Wissenschaftlern ernsthaft angezweifelt. Auch wenn noch nicht alle Eigenschaften von Prion-Erkrankungen richtig verstanden sind, so spricht doch eine Flut von Indizien für das Prion-Modell.

ii) Die Bedingungen für die Umwandlung stimmen nicht:

Der genaue Ort für die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} ist bis heute nicht bekannt, wenn auch späte Endosomen diskutiert werden (McKinley *et al.*, 1991; Arnold *et al.*, 1995;). Daher sind die zellulären Bedingungen für die Replikation ebenfalls nicht bekannt, so dass der pH-Wert, die richtige Temperatur oder das Ionenmilieu essentielle Faktoren für die Konversion sein können.

iii) Sekundäre Komponenten für die Umwandlung fehlen:

Neben den Lösungsbedingungen können weitere sekundäre Faktoren essentiell für die Konversion zu PrP^{Sc} sein. Chaperone als zusätzliche, proteinöse Komponenten wurden bereits in Kapitel 5.2.3 ausführlich diskutiert. Desweiteren könnten auch Lipide oder das Zuckergerüst, beides Bestandteile von infektiösen Prion-Stäbchen (Klein *et al.*, 1998; Dumpitak, 1998; Appel *et al.*, 1999), neben anderen noch unbekanntem Komponenten von Bedeutung sein.

iv) Die Konversion kann ein Membran-abhängiger Prozess sein:

Bei PrP^C handelt es sich um ein GPI-geankertes Membranprotein, dessen Struktur aufgrund von NMR-Untersuchungen an recPrP in Lösung bestimmt wurde. Inwieweit sich die Struktur durch die Membrenumgebung ändert ist derzeit nicht bekannt. Für recPrP wurden bereits Strukturunterschiede in Membrenumgebung beschrieben (Morillas *et al.*, 1999). Ohne GPI-Anker war eine Bindung an Liposomen möglich, die mit einer Zunahme an geordneter Struktur im N-Terminus einherging. Zellkultur-Untersuchungen der Arbeitsgruppe Tatzelt (MPI Martinsried) zeigten zudem, dass PrP ohne GPI-Anker unlöslich und nicht richtig glykosyliert wurde (Schell *et al.*, in Vorbereitung). Nach einer anderen, C-terminalen Verankerung wurde das PrP^C wieder

normal modifiziert. Diese Ergebnisse deuten auf unterschiedliche zelluläre Strukturen in Abhängigkeit von der Membranumgebung hin. Ob die Interaktion von PrP^C mit PrP^{Sc} und die Umfaltung an der Membranoberfläche stattfinden ist bisher ebenfalls nicht geklärt (Vey *et al.*, 1996). Alle bisherigen *in vitro*-Konversionssysteme berücksichtigen die Membranbindung des PrP^C nicht, wenn auch das SDS die Membranumgebung zumindest teilweise simulieren kann (Coles *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 1998).

Zusammenfassend können mit Ausnahme des Punktes i) alle Punkte einzeln oder in Kombination zutreffen. Die Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} kann aber auch ein so komplexer Prozess sein, dass er *in vitro* gar nicht nachgestellt werden kann. Insbesondere zeitliche Faktoren müssen bei der *in vitro*-Konversion berücksichtigt werden. Die sporadische Umfaltung *in vivo* ist ein sehr seltener und langsamer Prozess, was durch die seltenen Fallzahlen (etwa ein Fall pro 1 Mio. Einwohner und Jahr) und das hohe Alter der Erkrankten (in der Regel > 60 Jahre) belegt wird. Insbesondere bei der *de novo* Umfaltung, aber auch bei der Umfaltung durch PrP^{Sc}-Keime *in vitro* wird versucht diese deutlich zu beschleunigen. Es ist deshalb fraglich, ob solche schnellen Aggregationsprozesse die Bildung von infektiösem PrP^{Sc} wirklich ermöglichen können.

5.4 Ausblick

Das bis heute präferierte *in vitro*-Konversionssystem wurde durch die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse erweitert. Als zusätzliche Ausgangskomponente wurde posttranslational modifiziertes, d.h. N-glykosyliertes und GPI-geankertes, PrP^C eingeführt (Abbildung 5.3).

Inwiefern es ein Modell für die Umfaltung von PrP^C in PrP^{Sc} darstellt, wurde in den vorigen Kapiteln ausführlich diskutiert. Mit dem aufgereinigten PrP^C (Kapitel 4.1 und Elfrink, 2001) steht nun maturiertes, d.h. glykosyliertes und GPI-geankertes, PrP zur Verfügung, um den Einfluss der Membranumgebung auf die Struktur und insbesondere die Strukturumlagerung zu untersuchen. Sekundärstrukturen von Proteinen können durch UV-Resonanz-Raman-Spektroskopie, bei der die Amid-Bindung bei 206,5 nm angeregt wird, bestimmt werden (Asher *et al.*, 1997). Im Gegensatz zur Infrarot-Spektroskopie stören hierbei Hintergrundsignale, die vor allem von Wasser hervorgerufen werden, nicht. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass die Proteine in einer auf eine Oberfläche aufgebrachte Membran verankert werden können. Neben der aufgrund der Oberflächen-verstärkten Ramanstreuung unter optischer Anregung in abgeschwächter Totalreflexion erhöhten Sensitivität (Otto, 1974;

Wittke *et al.*, 1989; Otto *et al.*, 1992), kann so die Sekundärstruktur des PrP^C in der Membran bestimmt werden.

Geht die Umfaltung von PrP^C mit der Änderung der Membrenumgebung einher (2-Phasen-Modell; Pitschke, 1999), dann wäre der Austritt von PrP^C aus der Zellmembran das Schlüsselereignis für die Entstehung von Replikationskeimen. Die Geschwindigkeitskonstante für diesen Prozess, der als „Membranunfall“ bezeichnet werden kann, kann bei kinetischen Messungen mit der oben beschriebenen Methode bestimmt werden. Neben dem spontanen Austritt aus der Membran müssen auch die nachfolgenden Aggregationsprozesse und der Wiedereintritt in die Membran, die der Aggregation entgegenwirkt, berücksichtigt werden. Diese Untersuchungen werden gerade in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Otto (Institut für Festkörper-Physik, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) vorbereitet.

Prion-Stäbchen

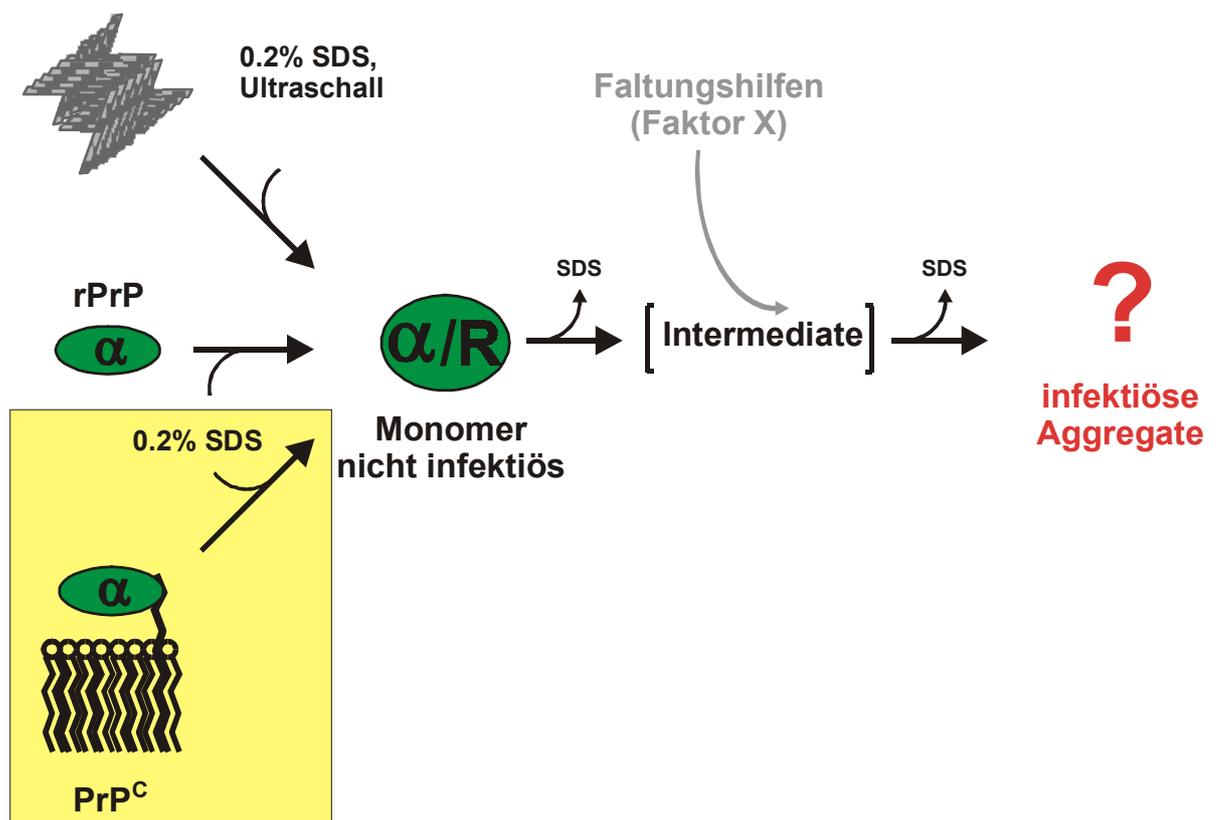


Abbildung 5.3 Modell des erweiterten *in vitro*-Konversionssystem: Erläuterungen siehe Text

Aufgrund der in Kapitel 5.1.3 diskutierten Einschränkungen für das SDS-abhängige *in vitro*-Konversionssystem müssten weitere Detergentien für die *in vitro*-Konversion getestet werden. Durch die Verwendung milderer Detergentien oder natürlicher Lipide könnte unser *in vitro*-Konversionssystem dem natürlichen Prozess der Umfaltung besser angenähert werden.

Dies ist für den Beweis der Prion-Hypothese zwar nur sekundär von Bedeutung, da die Generierung von neuer Infektiosität auch unter unphysiologischen Bedingungen hierfür hinreichend ist. Zum besseren Verständnis der zellulären Abläufe und Möglichkeiten der Intervention ist ein dem natürlichen Prozess angenähertes System aber unbedingt erforderlich.

Um sekundäre Komponenten (z.B. Chaperone) und andere Milieu-bedingte Faktoren, wie in Kapitel 5.3 diskutiert, in *in vitro*-Systemen einsetzen zu können, muss die zelluläre Lokalisation des Replikationsprozesses gefunden werden. Hierbei wären auch der Mechanismus der Pathogenese und die Funktion des PrP^C von großer Bedeutung. Solange diese Fragen nicht von Zellbiologen und Physiologen beantwortet werden können, müssen diese Komponenten und Faktoren aufgrund von Indizien und Intuition variiert werden. Mögliche Kandidaten können wiederum aufgrund von negativen Befunden in den verschiedenen *in vitro*-Konversionssystemen nicht endgültig als essentielle Komponenten ausgeschlossen werden. Unser *in vitro*-Konversionssystem liefert grundlegende Erkenntnisse zum Ablauf des Aggregationprozesses von PrP. Durch Vergleich dieser Ergebnisse mit der Aggregation anderer Proteine (z.B. Transthyretin, A β), können gemeinsame Mechanismen der Aggregation aufgezeigt werden. Diese könnten Hinweise auf pathologische Gemeinsamkeiten zwischen den verschiedenen Erkrankungen geben. Ein verbessertes Verständnis dieser Aggregationsmechanismen kann Hinweise für neue Therapie-Ansätze aufzeigen.

5 Zusammenfassung

Transmissible spongiforme Enzephalopathien sind eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, die sowohl sporadisch als auch infektiös oder genetisch bedingt auftreten können. Der Erreger dieser Erkrankungen besteht nach dem Prion-Modell fast ausschließlich aus einer abnormal gefalteten Isoform des Prion-Proteins (PrP^{Sc}). Durch Interaktion mit der zellulären Form (PrP^{C}) katalysiert es dessen Umwandlung in PrP^{Sc} . Die meisten experimentellen Daten stützen das Prion-Modell, auch wenn es bis heute nicht endgültig bewiesen werden konnte. Verschiedene *in vitro*-Konversionssysteme versuchen die Umwandlung und Eigenschaften von PrP^{Sc} nachzustellen.

Das in unserer Arbeitsgruppe etablierte *in vitro*-Konversionssystem induziert durch Ausdünnen von SDS eine Umwandlung von rekombinantem oder aus Prion-Stäbchen solubilisiertem Prion-Protein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich natürliches, posttranslational modifiziertes PrP^{C} als Ausgangsmaterial für die *in vitro*-Konversion eingesetzt. Hierfür wurden ein CHO-Zellkultursystem, das PrP^{C} überexprimiert, und die anschließende chromatographische Aufreinigung etabliert. Nach Ausdünnen des SDS aggregierten sowohl rekombinante als auch natürliche Prion-Proteine, wobei recPrP eine deutlich höhere Tendenz zur Aggregation hat. Die Aggregate weisen einige Eigenschaften von PrP^{Sc} auf, wie z.B. Unlöslichkeit und β -Faltblattstruktur. Eine PrP^{Sc} -spezifische Protease K-Schnittstelle und Infektiosität konnte aber bisher nicht gefunden werden, so dass nicht von einer vollständigen Konversion zu PrP^{Sc} ausgegangen werden kann.

Grundsätzlich wird die fehlende Infektiosität in Zusammenhang mit falschen *in vitro* Faltungsbedingungen und/oder fehlenden sekundären Komponenten gebracht. Bei diesem sogenannten Faktor X, der aufgrund von Ergebnissen bei Infektionsstudien mit transgenen Tieren postuliert wurde, kann es sich um ein molekulares Chaperon handeln. Der Einfluss von verschiedenen Faltungshilfen wurde in unserem *in vitro*-Konversionssystem untersucht. Neben chemischen Chaperonen wurde das sehr gut charakterisierte GroEL/ES-System aus *E. coli*, eingesetzt. Die chemischen Chaperone DMSO und Glycerol konnten die Aggregation *in vitro* nicht verhindern. Im Gegensatz dazu inhibierte das molekulare Chaperon GroEL die *in vitro*-Aggregation durch Bindung des rekombinanten oder posttranslational modifizierten PrP. Nach Freisetzung aus dem Komplex aggregierte das PrP erneut, unabhängig davon ob das Co-Chaperon GroES zugesetzt wurde. Somit konnte das molekulare Chaperon GroEL das Prion-Protein unter diesen Bedingungen nicht in eine stabile, lösliche Form falten. Die gebildeten Aggregate ohne GroEL und nach Freisetzung von GroEL zeigten keine Unterschiede, so dass

ein spezifischer Einfluss von GroEL auf die *in vitro*-Konversion unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden muss.

Das um posttranslational modifiziertes PrP^C erweiterte *in vitro*-Konversionssystem bietet nun die Möglichkeit ausgehend von rekombinanten und natürlichen Prion-Proteinen den Einfluss weiterer sekundärer Komponenten und Faltungsbedingungen einzeln und in Kombination zu analysieren. Insbesondere kann nun der Einfluss der Membrenumgebung des natürlichen PrP^C auf die *in vitro*-Konversion untersucht werden. Neben einem besseren Verständnis des Umwandlungsprozess kann so gezielt nach Therapieansätzen gesucht werden.

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**, 764-766.
- Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-230.
- Appel, T. R.; Dumpitak, C.; Matthiesen, U. and Riesner, D. (1999). Prion rods contain an inert polysaccharide scaffold. *Biol.Chem.* **380**, 1295-1306.
- Arnold, J. E.; Tipler, C.; Laszlo, L.; Hope, J.; Landon, M. and Mayer, R. J. (1995). The abnormal isoform of the prion protein accumulates in late-endosome-like organelles in scrapie-infected mouse brain. *J.Pathol.* **176**, 403-411.
- Asher, S. A.; Chen, X. G.; hi, Z. and oltz, J. S. W. (1997). UV Resonance Raman-selective amide vibrational enhancement: Quantitative Methology for determining protein secondary structure. *Biochemistry* **37**, 2854-2864.
- Basler, K.; Oesch, B.; Scott, M.; Westaway, D.; Walchli, M.; Groth, D. F.; McKinley, M. P.; Prusiner, S. B. and Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* **46**, 417-428.
- Bebbington, C. R. and Hentschell, C. C. G. (1987). In Glover, D.M.: DNA Cloning: A Practical Approach; IRL Press, Oxford, 163-188
- Belay, E. D. (1999). Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu.Rev.Microbiol.* **53** 283-314
- Bessen, R. A.; Kocisko, D. A.; Raymond, G. J.; Nandan, S.; Lansbury, P. T. and Caughey, B. (1995). Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* **375**, 698-700.
- Birkmann, E. (2000). Einfluß von Sequenzvariationen auf die Struktur und das Aggregationsverhalten rekombinanter Prion Proteine. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- 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**, 1465-1473.
- Bolton, D. C.; Meyer, R. K. and Prusiner, S. B. (1985). Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J.Virol.* **53**, 596-606.
- Bons, N.; Mestre-Frances, N.; Charnay, Y. and Tagliavini, F. (1996). Spontaneous spongiform encephalopathy in a young adult rhesus monkey. *Lancet* **348**, 55
- Borchelt, D. R.; Taraboulos, A. and Prusiner, S. B. (1992). Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J.Biol.Chem.* **267**, 16188-16199.
- Braig, K.; Simon, M.; Furuya, F.; Hainfeld, J. F. and Horwich, A. L. (1993). A polypeptide bound by the chaperonin groEL is localized within a central cavity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 3978-3982.
- Brown, D. R.; Schulz-Schaeffer, W. J.; Schmidt, B. and Kretzschmar, H. A. (1997a). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp.Neurol.* **146**, 104-112.

- 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. (1997b). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**, 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 11-15.
- Brown, P.; Cervenakova, L.; Goldfarb, L. G.; McCombie, W. R.; Rubenstein, R.; Will, R. G.; Pocchiari, M.; Martinez-Lage, J. F.; Scalici, C.; Masullo, C. and et, a. (1994). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: an example of the interplay between ancient genes and modern medicine. *Neurology* **44**, 291-293.
- Bruce, M. E.; McConnell, I.; Fraser, H. and Dickinson, A. G. (1991). The disease characteristics of different strains of scrapie in Sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J.Gen.Virol.* **72**-603.
- Bruce, M. E.; Fraser, H.; McBride, P. A.; Scott, F. R. and Dickinson, A. G. (1992). In Prusiner, S.B.; Collinge, J.; Powell, J.; and Anderton, B.: Prion diseases of humans and animals, Horwood, London, 497-508
- Bueler, H.; Aguzzi, A.; Sailer, A.; Greiner, R.; Autenried, P.; Aguet, M. and Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**, 1339-1347.
- Bukau, B. and Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92**, 351-366.
- Caughey, B.; Kocisko, D. A.; Raymond, G. J. and Lansbury, P. T. (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**, 807-817.
- Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* **1**, 1378-1379.
- Chiti, F.; Webster, P.; Taddei, N.; Clark, A.; Stefani, M.; Ramponi, G. and Dobson, C. M. (1999). Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**, 3590-3594.
- Cockett, M. I.; Bebbington, C. R. and Yarranton, G. T. (1990). High level expression of tissue inhibitor of metalloproteinases in Chinese hamster ovary cells using glutamine synthetase gene amplification. *Biotechnology (N.Y.)* **8**, 662-667.
- 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**, 530-531.
- Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annu.Rev.Biochem.* **67** **793-819**-819.
- Coles, M.; Bicknell, W.; Watson, A. A.; Fairlie, D. P. and Craik, D. J. (1998). Solution structure of amyloid beta-peptide(1-40) in a water-micelle environment. Is the membrane-spanning domain where we think it is? *Biochemistry* **37**, 11064-11077.
- Collinge, J.; Sidle, K. C.; Meads, J.; Ironside, J. and Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* **383**, 685-690.
- Collinge, J. (1999). Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **354**, 317-323.

- Creutzfeldt, H. G. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z.Gesamte Neurol Psychiatrie* **57**, 1-18.
- Damaschun, G.; Damaschun, H.; Gast, K. and Zirwer, D. (1998). Denatured states of yeast phosphoglycerate kinase. *Biochemistry (Mosc.)* **63**, 259-275.
- DeArmond, S. J. and Ironside, J. W. (1999). Neuropathology of Prion Diseases. In Prusiner, S.B.: Prion Biology and Diseases; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 585-652
- DeBurman, S. K.; Raymond, G. J.; Caughey, B. and Lindquist, S. (1997). Chaperone-supervised conversion of prion protein to its protease-resistant form. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 13938-13943.
- Deslys, J. P.; Marce, D. and Dormont, D. (1994). Similar genetic susceptibility in iatrogenic and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *J.Gen.Virol.* **75**-7.
- Deslys, J. P.; Lasmezas, C. I.; Billette-de-Villemeur, T.; Jaegly, A. and Dormont, D. (1996). Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* **347**, 1332
- Dickinson, A. G.; Meikle, V. M. and Fraser, H. (1968). Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice. *J.Comp Pathol.* **78**, 293-299.
- Diringer, H.; Beekes, M. and Oberdieck, U. (1994). The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **724**, 246-258.
- Doh-ura, K.; Kitamoto, T.; Sakaki, Y. and Tateishi, J. (1991). CJD discrepancy. *Nature* **353**, 801-802.
- Donne, D. G.; Viles, J. H.; Groth, D.; Mehlhorn, I.; James, T. L.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; Wright, P. E. and Dyson, H. J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 13452-13457.
- Dumpitak, C. (1998). Analyse von nicht-proteinartigen Komponenten in Prionen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Edenhofer, F.; Rieger, R.; Famulok, M.; Wendler, W.; Weiss, S. and Winnacker, E. L. (1996). Prion protein PrPc interacts with molecular chaperones of the Hsp60 family. *J.Virol.* **70**, 4724-4728.
- Edington, B. V.; Whelan, S. A. and Hightower, L. E. (1989). Inhibition of heat shock (stress) protein induction by deuterium oxide and glycerol: additional support for the abnormal protein hypothesis of induction. *J.Cell Physiol* **139**, 219-228.
- Ehrenberg, M. and Rigler, R. (1974). Rotational brownian motion and fluorescence intensity fluctuations. *Chem.Phys.* **4**, 390-401.
- Eigen, M. (1996). Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys.Chem.* **63**, A1-18.
- Eigen, M. (2001). BSE und das Prionen Problem. *Spektrum der Wissenschaften* **04/2001**
- Elfrink, K. (2001). Aufreinigung und Charakterisierung von Prion-Protein aus Zellkultur und Gewebe tierischen Ursprungs
- Elson, E. L. and Magde, D. (1974). Fluorescence Correlation Spectroscopy. I. Conceptual Basis and Theory. *Biopolymers* **3**, 1-27.

- Endo, T.; Groth, D.; Prusiner, S. B. and Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry* **28**, 8380-8388.
- Farquhar, C. F.; Somerville, R. A. and Bruce, M. E. (1998). Straining the prion hypothesis. *Nature* **391**, 345-346.
- Fenton, W. A.; Kashi, Y.; Furtak, K. and Horwich, A. L. (1994). Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* **371**, 614-619.
- Frydman, J.; Nimmegern, E.; Erdjument-Bromage, H.; Wall, J.S.; Tempst, P. and Hartl, F.U. (1992). Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *EMBO J.* **11**, 4767-4778.
- Gajdusek, D. C. and Zigas, V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea – The endemic occurrence of "kuru" in native population. *N.Engl.J.Med.* **257**, 974-978.
- Gao, X. and Wong, T. C. (1998). Studies of the binding and structure of adrenocorticotropin peptides in membrane mimics by NMR spectroscopy and pulsed-field gradient diffusion. *Biophys.J.* **74**, 1871-1888.
- Garcia-Perez, A. and Burg, M. B. (1990). Importance of organic osmolytes for osmoregulation by renal medullary cells. *Hypertension* **16**, 595-602.
- Gekko, K. and Koga, S. (1983). Increased thermal stability of collagen in the presence of sugars and polyols. *J.Biochem.(Tokyo)* **94**, 199-205.
- Gerstmann, J.; Sträussler, E. and Scheinker, I. (1936). Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z.Neurol.* **154**, 736-762.
- Green, A. A. (1932). Studies in the Physical Chemistry of the Proteins. *JBC* **95**, 47-66.
- Greenfield, N. and Fasman, G. D. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **8**, 4108-4116.
- Guijarro, J. I.; Sunde, M.; Jones, J. A.; Campbell, I. D. and Dobson, C. M. (1998). Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 4224-4228.
- Hartl, F. U.; Hlodan, R. and Langer, T. (1994). Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations. *Trends Biochem.Sci.* **19**, 20-25.
- Hendrick, J. P. and Hartl, F. U. (1995). The role of molecular chaperones in protein folding. *FASEB J.* **9**, 1559-1569.
- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1985). Simplified Method for Silverstaining of Proteins in Polyacrylamide Gels and the Mechanism of Silverstaining. *Elektrophoresis* **6**, 103-112.
- Hill, A. F.; Antoniou, M. and Collinge, J. (1999). Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J.Gen.Virol.* **80**-4.
- Hill, A. F.; Joiner, S.; Linehan, J.; Desbruslais, M.; Lantos, P. L. and Collinge, J. (2000). Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 10248-10253.
- Hjelmeland, L. M. and Chrambach, A. (1984). Solubilization of functional membrane proteins. *Methods Enzymol.* **104**, 305-318.

- Horiuchi, M. and Caughey, B. (1999). Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *EMBO J.* **18**, 3193-3203.
- Huang, Z.; Prusiner, S. B. and Cohen, F. E. (1996). Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Fold.Des* **1**, 13-19.
- Ibel, K.; May, R. P.; Kirschner, K.; Szadkowski, H.; Mascher, E. and Lundahl, P. (1990). Protein-decorated micelle structure of sodium-dodecyl-sulfate--protein complexes as determined by neutron scattering. *Eur.J.Biochem.* **190**, 311-318.
- Ikawa, S. and Weinberg, R. A. (1992). An interaction between p21ras and heat shock protein hsp60, a chaperonin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**, 2012-2016.
- Ironside, J. W. (1998). Neuropathological findings in new variant CJD and experimental transmission of BSE. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.* **21**, 91-95.
- Itoh, H.; Kobayashi, R.; Wakui, H.; Komatsuda, A.; Ohtani, H.; Miura, A. B.; Otaka, M.; Masamune, O.; Andoh, H.; Koyama, K. and et, a. (1995). Mammalian 60-kDa stress protein (chaperonin homolog). Identification, biochemical properties, and localization. *J.Biol.Chem.* **270**, 13429-13435.
- 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**, 1935-1937.
- Jakob, A. (1921). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswerten anatomischen Befunden (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Z.Gesamte Neurol.Psychiatrie* **64**, 147-228.
- 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**, 10086-10091.
- Jansen, K. (1998). Biophysikalische Analyse von Aggregationsintermediaten des Prion-Proteins. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Jansen, K.; Schafer, O.; Birkmann, E.; Post, K.; Serban, A.; 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**, 683-691.
- Jarrett, J. T. and Lansbury, P. T. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* **73**, 1055-1058.
- Jimenez-Huete, A.; Lievens, P. M.; Vidal, R.; Piccardo, P.; Ghetti, B.; Tagliavini, F.; Frangione, B. and Prelli, F. (1998). Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues. *Am.J.Pathol.* **153**, 1561-1572.
- Jones, M.; Gupta, R. S. and Englesberg, E. (1994). Enhancement in amount of P1 (hsp60) in mutants of Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells exhibiting increases in the A system of amino acid transport. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 858-862.

- Kaneko, K.; Zulianello, L.; Scott, M.; Cooper, C. M.; Wallace, A. C.; James, T. L.; Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1997). Evidence for protein X binding to a discontinuous epitope on the cellular prion protein during scrapie prion propagation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 10069-10074.
- Kascsak, R. J.; Rubenstein, R.; Merz, P. A.; Tonna-DeMasi, M.; Fersko, R.; Carp, R. I.; Wisniewski, H. M. and Diringer, H. (1987). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J.Virol.* **61**, 3688-3693.
- 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**-9.
- 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**, 425-430.
- Khan, I. U.; Wallin, R.; Gupta, R. S. and Kammer, G. M. (1998). Protein kinase A-catalyzed phosphorylation of heat shock protein 60 chaperone regulates its attachment to histone 2B in the T lymphocyte plasma membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 10425-10430.
- Klein, T. R.; Kirsch, D.; Kaufmann, R. and Riesner, D. (1998). Prion rods contain small amounts of two host sphingolipids as revealed by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biol.Chem.* **379**, 655-666.
- Kocisko, D. A.; Come, J. H.; Priola, S. A.; Chesebro, B.; Raymond, G. J.; Lansbury, P. T. and Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* **370**, 471-474.
- Kocisko, D. A.; Priola, S. A.; Raymond, G. J.; Chesebro, B.; Lansbury, P. T. and Caughey, B. (1995). Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 3923-3927.
- 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**, 1-5.
- Kubota, H.; Hynes, G.; Carne, A.; Ashworth, A. and Willison, K. (1994). Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1-containing chaperonin. *Curr.Biol.* **4**, 89-99.
- Kuwajima, K. (1989). The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins* **6**, 87-103.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- 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**, 743-744.
- Lasmezas, C. I.; Deslys, J. P.; Robain, O.; Jaegly, A.; Beringue, V.; Peyrin, J. M.; Fournier, J. G.; Hauw, J. J.; Rossier, J. and Dormont, D. (1997). Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science* **275**, 402-405.
- Leffers, K. W. (1999). Denaturierung, Renaturierung und Infektiosität von solubilisierten Prion-Proteinen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

- Leopoldt, J. G. (1759). Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zur Landwirtschaft. **5**, 344-360.
- Liu, H.; Farr-Jones, S.; Ulyanov, N. B.; Llinas, M.; Marqusee, S.; Groth, D.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B. and James, T. L. (1999). Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90-231). *Biochemistry* **38**, 5362-5377.
- Lu, K.; Wang, W.; Xie, Z.; Wong, B. S.; Li, R.; Petersen, R. B.; Sy, M. S. and Chen, S. G. (2000). Expression and structural characterization of the recombinant human doppel protein. *Biochemistry* **39**, 13575-13583.
- Lugaresi, E.; Medori, R.; Montagna, P.; Baruzzi, A.; Cortelli, P.; Lugaresi, A.; Tinuper, P.; Zucconi, M. and Gambetti, P. (1986). Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N.Engl.J.Med.* **315**, 997-1003.
- Manson, J.; West, J. D.; Thomson, V.; McBride, P.; Kaufman, M. H. and Hope, J. (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* **115**, 117-122.
- Marco, S.; Carrascosa, J. L. and Valpuesta, J. M. (1994). Reversible interaction of beta-actin along the channel of the TCP-1 cytoplasmic chaperonin. *Biophys.J.* **67**, 364-368.
- Marsh, R. F. and Kimberlin, R. H. (1975). Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology, and pathogenesis. *J.Infect.Dis.* **131**, 104-110.
- McKinley, M. P.; Masiarz, F. R.; Isaacs, S. T.; Hearst, J. E. and Prusiner, S. B. (1983a). Resistance of the scrapie agent to inactivation by psoralens. *Photochem.Photobiol.* **37**, 539-545.
- McKinley, M. P.; Bolton, D. C. and Prusiner, S. B. (1983b). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**, 57-62.
- McKinley, M. P.; Taraboulos, A.; Kenaga, L.; Serban, D.; Stieber, A.; DeArmond, S. J.; Prusiner, S. B. and Gonatas, N. (1991). Ultrastructural localization of scrapie prion proteins in cytoplasmic vesicles of infected cultured cells. *Lab Invest* **65**, 622-630.
- Mead, S.; Beck, J.; Dickinson, A.; Fisher, E. M. and Collinge, J. (2000). Examination of the human prion protein-like gene doppel for genetic susceptibility to sporadic and variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci.Lett.* **290**, 117-120.
- 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. (1996). High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry* **35**, 5528-5537.
- Merril, C. R.; Goldman, D.; Sedman, S. A. and Ebert, M. H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* **211**, 1437-1438.
- Miura, T.; Hori-i, A.; Mototani, H. and Takeuchi, H. (1999). Raman spectroscopic study on the copper(II) binding mode of prion octapeptide and its pH dependence. *Biochemistry* **38**, 11560-11569.
- Mobley, W. C.; Neve, R. L.; Prusiner, S. B. and McKinley, M. P. (1988). Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**, 9811-9815.

- Moore, R. C.; Lee, I. Y.; Silverman, G. L.; Harrison, P. M.; Strome, R.; Heinrich, C.; Karunaratne, A.; Pasternak, S. H.; Chishti, M. A.; Liang, Y.; Mastrangelo, P.; Wang, K.; Smit, A. F.; Katamine, S.; Carlson, G. A.; Cohen, F. E.; Prusiner, S. B.; Melton, D. W.; Tremblay, P.; Hood, L. E. and Westaway, D. (1999). Ataxia in prion protein (PrP)-deficient mice is associated with upregulation of the novel PrP-like protein doppel. *J.Mol.Biol.* **292**, 797-817.
- Morillas, M.; Swietnicki, W.; Gambetti, P. and Surewicz, W. K. (1999). Membrane environment alters the conformational structure of the recombinant human prion protein. *J.Biol.Chem.* **274**, 36859-36865.
- Morimoto, R. I.; Kline, M. P.; Bimston, D. N. and Cotto, J. J. (1997). The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones. *Essays Biochem.* **32**, 17-29.
- Mouillet-Richard, S.; Laurendeau, I.; Vidaud, M.; Kellermann, O. and Laplanche, J. L. (1999). Prion protein and neuronal differentiation: quantitative analysis of prnp gene expression in a murine inducible neuroectodermal progenitor. *Microbes.Infect.* **1**, 969-976.
- Netzer, W. J. and Hartl, F. U. (1998). Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem.Sci.* **23**, 68-73.
- Neuhoff, N.; Stamm, R. and Eibl, H. (1985). Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamid gels: Asystemis analysis. *Electrophoresis* **6**, 427-448.
- Neurath, H.; Greenstein, J. P.; Putnam, F. W. and Erickson, J. O. (1944) *Chem.Rev.* **34**, 157-256.
- 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**, 735-746.
- Otto, A. (1974). Experimental investigation of surface polaritons on plane interfaces. In Madelung, O. & Queisser, H. J.: Festkörperprobleme XIV, Advances in Solid State Physics; Pergamon, 1
- Otto, A.; Mrozek, I.; Grabhorn, H. and Akemann, W. (1992). Surface Enhanced Raman Scattering. *J.Phys.: Condens.Matter* **4**, 1143-1212.
- Owen, F.; Poulter, M.; Collinge, J. and Crow, T. J. (1990). Codon 129 changes in the prion protein gene in Caucasians. *Am.J.Hum.Genet.* **46**, 1215-1216.
- Pack, C. G.; Nishimura, G.; Tamura, M.; Aoki, K.; Taguchi, H.; Yoshida, M. and Kinjo, M. (1999). Analysis of interaction between chaperonin GroEL and its substrate using fluorescence correlation spectroscopy. *Cytometry* **36**, 247-253.
- Pack, C. G.; Aoki, K.; Taguchi, H.; Yoshida, M.; Kinjo, M. and Tamura, M. (2000). Effect of electrostatic interactions on the binding of charged substrate to GroEL studied by highly sensitive fluorescence correlation spectroscopy. *Biochem. Biophys. Res.Commun.* **267**, 300-304.
- Palmer, M. S.; Dryden, A. J.; Hughes, J. T. and Collinge, J. (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature* **352**, 340-342.

- 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**, 1343-1352.
- Pan, K. M.; Baldwin, M.; Nguyen, J.; Gasset, M.; Serban, A.; Groth, D.; Mehlhorn, I.; Huang, Z.; Fletterick, R. J.; Cohen, F. E. and et, a. (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**, 10962-10966.
- Parchi, P.; Castellani, R.; Capellari, S.; Ghetti, B.; Young, K.; Chen, S. G.; Farlow, M.; Dickson, D. W.; Sima, A. A.; Trojanowski, J. Q.; Petersen, R. B. and Gambetti, P. (1996). Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann.Neurol.* **39**, 767-778.
- Parsell, D. A.; Kowal, A. S. and Lindquist, S. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104 protein. Purification and characterization of ATP-induced structural changes. *J.Biol.Chem.* **269**, 4480-4487.
- Pattison, I. H. and Millson, G. C. (1961). Experimental transmission of scrapie to goats and sheep by the oral route. *J.Comp.Pathol.* **71**, 171-176.
- Pelham, H. R. (1986). Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* **46**, 959-961.
- Pitschke, M. (1999). Mechanismus der Multimerisierung von Prion-Proteinen als Basis eines biophysikalischen Diagnostiksystems von spongiformen Enzephalopathien und der Alzheimerschen Erkrankung. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Post, K. (1998). Induktion und Charakterisierung verschiedener Aggregationszustände von natürlichem und rekombinantem Prion-Protein. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- 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**, 1307-1317.
- Post, K.; Brown, D. R.; Groschup, M.; Kretschmar, H. A. and Riesner, D. (2000). Neurotoxicity but not infectivity of prion proteins can be induced reversibly in vitro. *Arch.Virol.Suppl*, 265-273.
- Priola, S. A. and Chesebro, B. (1995). A single hamster PrP amino acid blocks conversion to protease-resistant PrP in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *J.Virol.* **69**, 7754-7758.
- Priola, S. A. (1999). Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomed.Pharmacother.* **53**, 27-33.
- Prusiner, S. B.; Groth, D. F.; Cochran, S. P.; Masiarz, F. R.; McKinley, M. P. and Martinez, H. M. (1980). Molecular properties, partial purification, and assay by incubation period measurements of the hamster scrapie agent. *Biochemistry* **19**, 4883-4891.
- Prusiner, S. B.; Groth, D. F.; McKinley, M. P.; Cochran, S. P.; Bowman, K. A. and Kasper, K. C. (1981). Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **78**, 4606-4610.
- Prusiner, S.B.; Cochran, S.P.; Groth, D.F.; Downey, D.E.; Bowman, K.A. and Martinez, H.M. (1982a). Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann.Neurol.* **11**, 353-358.

- Prusiner, S. B.; Bolton, D.C.; Groth, D.F.; Bowman, K.A.; Cochran, S.P. and McKinley, M.P. (1982b). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* **21**, 6942-6950.
- Prusiner, S. B. (1982c). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**, 136-144.
- Prusiner, S. B.; McKinley, M. P.; Bowman, K. A.; Bolton, D. C.; Bendheim, P.E.; Groth, D.F. and Glenner, G. G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* **35**, 349-358.
- Prusiner, S. B.; Scott, M.; Foster, D.; Pan, K.M.; Groth, D.; Mirenda, C.; Torchia, M.; Yang, S.L.; Serban, D.; Carlson, G. A. (1990). Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell* **63**, 673-686.
- Prusiner, S. B.; Groth, D.; Serban, A.; Koehler, R.; Foster, D.; Torchia, M.; Burton, D.; Yang, S. L. and DeArmond, S. J. (1993). Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 10608-10612.
- Prusiner, S. B. (1999a). An Introduction to Prion Biology and Diseases. In Prusiner,S.B.: Prion Biology and Diseases; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1-66
- Prusiner, S. B. (1999b). Development of the Prion Concept. In Prusiner,S.B.: Prion Biology and Diseases; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1-66
- Ptitsyn, O. B. and Uversky, V. N. (1994). The molten globule is a third thermodynamical state of protein molecules. *FEBS Lett.* **341**, 15-18.
- Raymond, G. J.; Hope, J.; Kocisko, D. A.; Priola, S. A.; Raymond, L. D.; Bossers, A.; Ironside, J.; Will, R. G.; Chen, S. G.; Petersen, R. B.; Gambetti, P.; Rubenstein, R.; Smits, M. A.; Lansbury, P. T., Jr. and Caughey, B. (1997). Molecular assessment of the potential transmissibilities of BSE and scrapie to humans. *Nature* **388**, 285-288.
- Riek, R.; Hornemann, S.; Wider, G.; Glockshuber, R. and Wuthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* **413**, 282-288.
- 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**, 1714-1722.
- Ross, W. R.; Bertrand, W. S. and Morrison, A. R. (1992). Identification of a processed protein related to the human chaperonins (hsp 60) protein in mammalian kidney. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **185**, 683-687.
- Saborio, G. P.; Soto, C.; Kacsak, R. J.; Levy, E.; Kacsak, R.; Harris, D. A. and Frangione, B. (1999). Cell-lysate conversion of prion protein into its protease-resistant isoform suggests the participation of a cellular chaperone. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **258**, 470-475.
- Safar, J.; Ceroni, M.; Piccardo, P.; Liberski, P. P.; Miyazaki, M.; Gajdusek, D. C. and Gibbs, C. J. (1990). Subcellular distribution and physicochemical properties of scrapie-associated precursor protein and relationship with scrapie agent. *Neurology* **40**, 503-508.

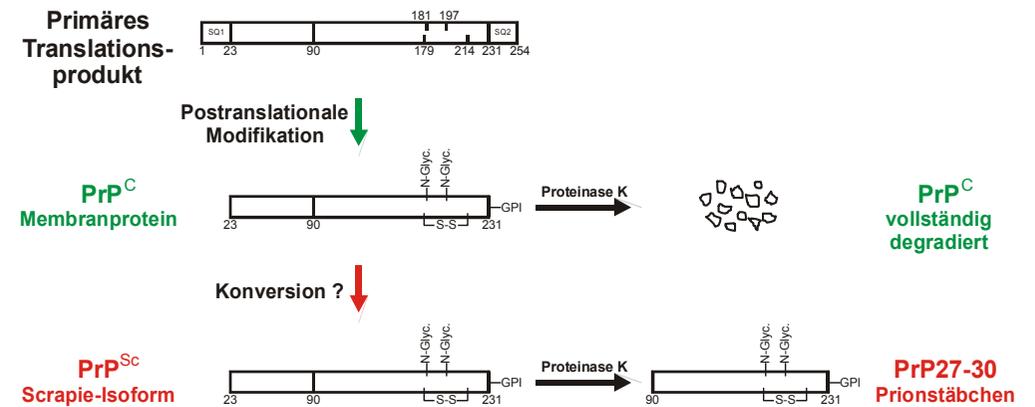
- Safar, J.; Roller, P. P.; Gajdusek, D. C. and Gibbs, C. J., Jr. (1994). Scrapie amyloid (prion) protein has the conformational characteristics of an aggregated molten globule folding intermediate. *Biochemistry* **33**, 8375-8383.
- Safar, J.; Wille, H.; Itri, V.; Groth, D.; Serban, H.; Torchia, M.; Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat.Med.* **4**, 1157-1165.
- Safar, J.; Cohen, F. E. and Prusiner, S. B. (2000). Quantitative traits of prion strains are enciphered in the conformation of the prion protein. *Arch.Virol.Suppl.*, 227-235.
- Sakaguchi, S.; Katamine, S.; Nishida, N.; Moriuchi, R.; Shigematsu, K.; Sugimoto, T.; Nakatani, A.; Kataoka, Y.; Houtani, T.; Shirabe, S.; Okada, H.; Hasegawa, S.; Miyamoto, T. and Noda, T. (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* **380**, 528-531.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, second edition.
- Sanders, P. G. and Wilson, R. H. (1984). Amplification and cloning of the Chinese hamster glutamine synthetase gene. *EMBO J.* **3**, 65-71.
- Schäfer, O. (1997). Biophysikalische Analyse verschiedener Aggregationszustände von rekombinantem Prion-Protein. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Schätzl, H. M.; Wopfner, F.; Gilch, S.; von Brunn, A. and Jager, G. (1997). Is codon 129 of prion protein polymorphic in human beings but not in animals? *Lancet* **349**, 1603-1604.
- Schell, J.; Riesner, D.; Elfrink, K.; Winkelhofer, K. and Tatzelt, J. (in Vorbereitung).
- Schirmer, E. C. and Lindquist, S. (1997). Interactions of the chaperone Hsp104 with yeast Sup35 and mammalian PrP. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 13932-13937.
- Scopes, R. K. (1974). Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal.Biochem.* **59**, 277-282.
- Scott, M.; Foster, D.; Mirenda, C.; Serban, D.; Coufal, F.; Walchli, M.; Torchia, M.; Groth, D.; Carlson, G.; DeArmond, S. J.(1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell* **59**, 847-857.
- Scott, M. R.; Kohler, R.; Foster, D. and Prusiner, S. B. (1992). Chimeric prion protein expression in cultured cells and transgenic mice. *Protein Sci.* **1**, 986-997.
- Silverman, G. L.; Qin, K.; Moore, R. C.; Yang, Y.; Mastrangelo, P.; Tremblay, P.; Prusiner, S. B.; Cohen, F. E. and Westaway, D. (2000). Doppel is an N-glycosylated, glycosylphosphatidylinositol-anchored protein. Expression in testis and ectopic production in the brains of Prnp(0/0) mice predisposed to Purkinje cell loss. *J.Biol.Chem.* **275**, 26834-26841.
- Simpson, R. B. and Kauzmann, W. (1953). The Kinetics of Protein Denaturation I. *J.Am.Chem.Soc.* **75**, 5139-5152.
- Smoluchowski, M. V. (1916). Zusammenfassende Bearbeitung. *Physi.Z.* **17**, 557-585.
- Soltys, B. J. and Gupta, R. S. (1996). Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells. *Exp.Cell Res.* **222**, 16-27.

- Soltys, B. J. and Gupta, R. S. (1997). Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (hsp60) in mammalian cells. *Cell Biol.Int.* **21**, 315-320.
- Stöckel, J. and Hartl, F. U. (1999). Interaction of the Prion Protein with the Chaperonin GroEL. Keystone-Symposium X3, No.423, 512
- 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**, 424-431.
- Taraboulos, A.; Scott, M.; Semenov, A.; Avrahami, D.; Laszlo, L.; Prusiner, S. B. and Avraham, D. (1995). Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J.Cell Biol.* **129**, 121-132.
- Tatzelt, J.; Zuo, J.; Voellmy, R.; Scott, M.; Hartl, U.; Prusiner, S. B. and Welch, W. J. (1995). Scrapie prions selectively modify the stress response in neuroblastoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 2944-2948.
- Tatzelt, J.; Prusiner, S. B. and Welch, W. J. (1996). Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J.* **15**, 6363-6373.
- Telling, G. C.; Scott, M.; Hsiao, K. K.; Foster, D.; Yang, S. L.; Torchia, M.; Sidle, K. C.; Collinge, J.; DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B. (1994). Transmission of Creutzfeldt-Jakob disease from humans to transgenic mice expressing chimeric human-mouse prion protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 9936-9940.
- Telling, G. C.; Scott, M.; Mastrianni, J.; Gabizon, R.; Torchia, M.; Cohen, F. E.; DeArmond, S. J. and Prusiner, S. B. (1995). Prion propagation in mice expressing human and chimeric PrP transgenes implicates the interaction of cellular PrP with another protein. *Cell* **83**, 79-90.
- Timasheff, S. N. (1993). The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* **22**, 67-97.
- 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**, 639-642.
- Tuite, M. F. and Lindquist, S. L. (1996). Maintenance and inheritance of yeast prions. *Trends Genet.* **12**, 467-471.
- Turk, E.; Teplow, D. B.; Hood, L. E. and Prusiner, S. B. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur.J.Biochem.* **176**, 21-30.
- Velez-Granell, C. S.; Arias, A. E.; Torres-Ruiz, J. A. and Bendayan, M. (1994). Molecular chaperones in pancreatic tissue: the presence of cpn10, cpn60 and hsp70 in distinct compartments along the secretory pathway of the acinar cells. *J.Cell Sci.* **107**, 49.
- 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**, 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**, 7455-7458.

- Weissmann, C. (1994). The prion connection: now in yeast? *Science* **264**, 528-530.
- Wells, G. A.; Scott, A. C.; Johnson, C. T.; Gunning, R. F.; Hancock, R. D.; Jeffrey, M.; Dawson, M. and Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet.Rec.* **121**, 419-420.
- Wells, G. A. and McGill, I. S. (1992). Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res.Vet.Sci.* **53**, 1-10.
- Wilesmith, J. W. and Wells, G. A. (1991). Bovine spongiform encephalopathy. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* **17221-38-38**.
- 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**, 921-925.
- Wittke, W.; Hatta, A. and Otto, A. (1989). Efficient use of the surface plasmon polariton resonance in light scattering from adsorbates. *Applied Physics A* **48**, 289-294.
- Wong, B. S.; Pan, T.; Liu, T.; Li, R.; Gambetti, P. and Sy, M. S. (2000). Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **273**, 136-139.
- Yancey, P. H.; Clark, M. E.; Hand, S. C.; Bowlus, R. D. and Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214-1222.
- Yang, D. S.; Yip, C. M.; Huang, T. H.; Chakrabarty, A. and Fraser, P. E. (1999). Manipulating the amyloid-beta aggregation pathway with chemical chaperones. *J.Biol.Chem.* **274**, 32970-32974.
- Zahn, R.; Buckle, A. M.; Perrett, S.; Johnson, C. M.; Corrales, F. J.; Golbik, R. and Fersht, A. R. (1996a). Chaperone activity and structure of monomeric polypeptide binding domains of GroEL. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**, 15024-15029.
- Zahn, R.; Perrett, S. and Fersht, A. R. (1996b). Conformational states bound by the molecular chaperones GroEL and secB: a hidden unfolding (annealing) activity. *J.Mol.Biol.* **261**, 43-61.
- Zahn, R.; von Schroetter, C. and Wuthrich, K. (1997). Human prion proteins expressed in *Escherichia coli* and purified by high-affinity column refolding. *FEBS Lett.* **417**, 400-404.
- Zahn, R. (1999). Prion propagation and molecular chaperones. *Q.Rev.Biophys.* **32**, 309-370.
- Zahn, R.; Liu, A.; Luhrs, T.; Riek, R.; von Schroetter, C.; Lopez, G. F.; Billeter, M.; Calzolari, L.; Wider, G. and Wuthrich, K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 145-150.

Nomenklatur der Prion-Proteine:

A) Synthese des zellulären Prion-Proteins und Konversion zur infektiösen Form:



B) Nicht-infektiöse Ausgangsmaterialien für die *in vitro*-Konversion:

