

**Dimere und Oligomere des Prion-Proteins als
Modell für den Umwandlungsmechanismus von
der zellulären Isoform des Prion-Proteins in die
pathogene Form**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

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

vorgelegt von

Katja Jansen

aus Düsseldorf

Düsseldorf 2002

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

Referent: Prof. Dr. D. Riesner

Koreferent: Prof. Dr. J. Hegemann

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2002

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Detlev Riesner für seine Betreuung. Seine stete Diskussionsbereitschaft, aber andererseits auch die Freiheit zum selbständigen Arbeiten und zur Verwirklichung eigener Ideen haben mir sehr geholfen.

Auch für die Möglichkeit zur Teilnahme am EU-Projekt über PrP-Dimerisierung mit den damit verbundenen halbjährlichen Treffen und Vorträgen bin ich sehr dankbar. In diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch Prof. Jim Warwicker, der großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt hat und immer wieder neue Anregungen für mich hatte.

Bei Luitgard Nagel-Steger möchte ich mich für eine hervorragende Einführung und Hilfe bei der Analytischen Ultrazentrifugation und für zahlreiche Diskussionen nicht nur über AUZ-Problematik bedanken.

Sabine Metzger hat mich in die Geheimnisse und Tricks der Massenspektrometrie eingeweiht. Danke für viel Geduld, viele sehr wichtige Diskussionen und die Bereitschaft, sich immer wieder neu mit in mein Thema einzudenken. Ausserdem danke für Tee und Schokolade!

Der gesamten Prion-Gruppe gilt mein Dank für eine nette Arbeitsatmosphäre. Danke an Karin Post und Jens Schell für die Aufnahme in die Prion-Gruppe und zahlreiche Badminton-Abende. Vielen Dank an Tina Kaimann für eine tolle Zusammenarbeit und gemeinsames Paperschreiben. Ein ganz besonderes Dankeschön an Oliver Schäfer für das Teilen aller Höhen und Tiefen im Stress der letzten Phase der Doktorarbeit und beim Schreiben der ersten Bewerbungen.

Auch allen anderen Institutsmitgliedern vielen Dank für ein gutes und produktives Arbeitsklima, konstruktive Kritik und viele Anregungen. Die sehr unterschiedlichen Arbeitsgebiete von Bioinformatik über RNA-Struktur bis zu Prionen ermöglichen eine immer neue Sichtweise des eigenen Themas und verhindern, dass man zu einseitig denkt.

Meiner Familie danke ich dafür, dass sie meine Pläne immer unterstützt hat.

Ein ganz besonderes Dankeschön an Britta Leiers, Corinna Maisch, Sandra Honigs und Karin Deckers für eine langjährige Freundschaft und offene Ohren für alle großen und kleinen Probleme.

Mein herzlichster Dank geht an Stephan Kuhlmann, der mich auch in schwierigen Zeiten immer ertragen und unterstützt hat und der mich immer zum Lachen bringen kann.

Zuletzt möchte ich mich noch bei allen bedanken, die nicht namentlich erwähnt sind und die doch in der einen oder anderen Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Krankheiten durch falsch gefaltete Proteine?	1
1.2	Prionkrankheiten	4
1.3	Das Prion-Modell	6
1.3.1	Ungewöhnliche Eigenschaften des Erregers	6
1.3.2	PrP ^C und PrP ^{Sc} : Die beiden Formen des Prion-Proteins	7
1.3.3	Prion-Stämme	8
1.4	Die Struktur von PrP ^C und PrP ^{Sc}	9
1.5	Funktion des PrP ^C	12
1.6	Replikationsmechanismus	13
1.7	Dimere des Prion-Proteins	15
1.8	<i>In vitro</i> Konversion	15
1.9	Fragestellung	17
2	Material und Methoden	20
2.1	Chemikalien	20
2.2	Rekombinantes Prion-Protein	20
2.3	Häufig verwendete Lösungen und Puffer	20
2.4	Protein-Konzentrationsbestimmung	21
2.4.1	Absorptionsmessung	21
2.4.2	Mikro BCA-Test	21
2.5	Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)	22
2.5.1	10 x Gelelektrophoresepuffer nach Lämmli	23
2.5.2	Trenngel (12 %)	23
2.5.3	Sammelgel	23
2.5.4	Auftragspuffer nach Lämmli	23
2.6	Silberfärbung von Proteingelen	23
2.7	Dot-Blot	24
2.8	Semi-Dry-Blot	24
2.9	Immunologischer Proteinnachweis	25
2.10	Löslichkeitsbestimmung durch differentielle Ultrazentrifugation	26
2.11	Gelelution	26
2.12	Circulardichroismus- (CD-) Spektroskopie	26
2.13	Chemischer Crosslink von Proteinen	27

2.14	Chromatographische Methoden	29
2.14.1	Größenausschluss-Chromatographie	29
2.14.2	Reversed phase Chromatographie	30
2.15	Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)	30
2.15.1	Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtslauf (M-Lauf)	30
2.15.2	Sedimentations-Geschwindigkeits-Lauf (S-Lauf)	31
2.16	Charakterisierung von Proteinen und Peptiden mittels Massenspektrometrie	33
3	Ergebnisse	38
3.1	Struktur von recPrP in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration	38
3.1.1	Standardisierung anhand der CD-Übergangskurve	41
3.2	Kinetik der Struktureinstellung	42
3.3	Vernetzung von PrP Dimeren und Oligomeren mittels chemischer Crosslinker	43
3.3.1	Verknüpfung zwischen Lysin-Seitenketten mit NHS-Estern	44
3.3.2	Verknüpfung von sauren Aminosäureresten mit Lysin mittels des Carbodiimids EDC	47
3.4	Chromatographischer Nachweis von PrP Dimeren und Oligomeren	48
3.5	Größenbestimmung mit analytischer Ultrazentrifugation (AUZ)	53
3.5.1	M-Lauf zur Bestätigung des α -Dimers	53
3.5.2	Analyse des β -Oligomers mittels S-Lauf	54
3.5.3	Bestimmung der SDS-Bindung an monomeres PrP durch analytische Ultrazentrifugation	57
3.6	Bestimmung der Crosslink-Stellen im PrP-Dimer	60
3.6.1	Aufreinigung der EDC-Crosslink-Produkte	61
3.6.2	Tryptische Verdauung von PrP	63
3.6.3	Nachweis und Identifizierung tryptischer Peptide des PrP mittels Elektrospray-Massenspektrometrie	66
4	Diskussion	73
4.1	Intermediate des Umwandlungs-Prozesses im SDS-System	73
4.2	PrP-Dimere und Oligomere in anderen Systemen	76
4.3	SDS als Membranumgebung?	78
4.4	Interaktionsstellen im PrP-Dimer	79
4.4.1	Zwei Peptide als Kandidaten für die Crosslink-Stelle	79

4.4.2	Warum wurden keine Crosslink-Produkte identifiziert?	82
4.4.3	Warum gibt es keine Unterschiede zwischen EDC-Monomer und EDC-Dimer?	84
4.4.4	Dimer-Bildung durch „3D domain swapping“	85
4.5	Ausblick	87
5	Zusammenfassung	89
6	Literatur	91

Abbildungsverzeichnis

1.1	Das Problem der Proteinaggregation	1
1.2	Schematische Darstellung des Hamster-PrP ^C	9
1.3	NMR-Struktur des PrP ^C und Strukturmodell für PrP ^{Sc}	11
1.4	Modell eines PrP ^{Sc} -Oligomers	12
1.5	Heterodimermodell der Prionreplikation	14
1.6	Keimabhängige Polymerisation nach Lansbury	14
1.7	<i>In vitro</i> -Konversionsmodell für PrP.	17
2.8	Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenzreaktion	25
2.9	CD-Spektren für typische Sekundärstrukturelemente in Proteinen.	27
2.10	Strukturformeln der verwendeten Crosslinker	28
2.11	Reaktion der Succinimidylester-Gruppe des BS ³ mit Aminogruppen	28
2.12	Durch EDC katalysierte Crosslink-Reaktion	28
2.13	Änderung des Konzentrationsprofils während eines S-Laufs	32
2.14	Schematische Darstellung des Elektrospray-Prozesses	34
2.15	Beispiele für die Isotopenverteilung von zweifach und dreifach geladenen Ionen.	34
2.16	Schematischer Aufbau des Q-Star Massenspektrometers	35
2.17	Nomenklatur von Peptidfragmenten	36
3.18	Struktur von recPrP in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration.	39
3.19	Strukturübergang von α -Helix zu β -Faltblatt und Löslichkeit von recPrP im SDS-System.	41
3.20	Lansame Struktureinstellung des recPrP bei mittleren SDS-Konzentrationen.	43
3.21	Kinetik der Struktureinstellung	44
3.22	Crosslinking mit BS ³	45
3.23	Crosslinking mit NHS-Estern verschiedener Länge.	46
3.24	Crosslinking mit EDC.	47
3.25	Nachweis von PrP Dimeren und Oligomeren mit Größenausschluß-Chromatographie.	50
3.26	Schema zur Präparation kovalent verknüpfter PrP-Dimere mit BS ³	51
3.27	Chromatogramm und Western-Blot zur Fraktionierung von BS ³ -verknüpften PrP Monomeren und Dimeren.	52
3.28	Nachweis der PrP-Dimere und Oligomere mittels eines PrP-Standards.	53

3.29	Absorptionsprofile im Molekulargewichts-Lauf für das PrP-Monomer und das PrP-Dimer.	54
3.30	Sedimentations-Geschwindigkeits-Lauf des PrP β -Oligomers.	55
3.31	Vergleich von Struktur und s-Wert für das PrP β -Oligomer.	56
3.32	Molekulargewichts-Lauf für PrP in 0,2 % SDS.	58
3.33	Isolierung der EDC-Crosslink-Produkte des PrP mittels Gelelektion.	62
3.34	Kontrolle des tryptischen Verdau von PrP.	64
3.35	Reversed-phase Chromatographie von tryptischen Peptiden des PrP.	65
3.36	Übersichts-Massenspektrum von PrP-Peptiden nach tryptischem Verdau.	67
3.37	MS/MS-Spektrum des Peptids PrP 209-220.	68
3.38	Vergleich der relativen Intensitäten für PrP 90-106 und PrP 195-204.	72
4.39	Schema des SDS-abhängigen <i>in vitro</i> -Konversionssystems.	76
4.40	Aminosäuresequenz der als „Crosslinking-Kandidaten“ diskutierten PrP-Peptide mit möglichen Angriffsstellen für EDC.	81
4.41	Mögliche Salzbrücken zwischen Lysin und Asp/Glu laut der NMR-Struktur des PrP90-231 aus Hamster.	82
4.42	Schema zur Dimerisierung durch 3D domain swapping.	85
4.43	Modell eines PrP-Dimers.	87

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	Alzheimersche Krankheit (eng. Alzheimer's disease)
AS	Aminosäure
AUZ	Analytische Ultrazentrifugation
BS ³	Bis(sulfosuccinimidyl)suberate
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	bovines Rinderalbumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
C	Celsius
CD	Circular-Dichroismus
CJD	Creutzfeldt-Jacob Erkrankung
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
fCJD	familiäre Creutzfeldt-Jacob Erkrankung
FCS	Fluoreszenz-Korreloations-Spektroskopie
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde
iCJD	iatrogene Creutzfeldt-Jacob Erkrankung
M	Molar
mA	Milliampere
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	zweidimensionale Massenspektrometrie
NaP _i	Natrium-Phosphat-Puffer

NMR	Kernspinresonanz
vCJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jacob Erkrankung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PK	Proteinase K
PrP	Prionprotein
PrP ^C	zelluläres Prionprotein
PrP ^{Sc}	pathologische Scrapie-Isoform des Prionproteins
Q-TOF	Quadrupol/time-of-flight
rpm	Umdrehungen / Minute
recPrP	rekombinantes Prionprotein
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Svedberg-Einheit
sCJD	spontane Creutzfeldt-Jacob Erkrankung
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SHa	syrischer Goldhamster
TBST	Tris Buffer Sodium Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Flugzeit (engl. time of flight)
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
Tris	Tris-methylaminomethan

1 Einleitung

1.1 Krankheiten durch falsch gefaltete Proteine?

Die richtige Faltung von Proteinen, d. h. die korrekte dreidimensionale Struktur, ist für die Zelle lebenswichtig. Nur Proteine, die ihre native Struktur einnehmen, können ihre Funktion erfüllen. Allerdings können bei diesem Prozess Fehler auftreten. Im Normalfall werden betroffene falsch gefaltete Proteine von der Zellmaschinerie erkannt und entweder mit Hilfe von Chaperonen in ihre native Struktur überführt, oder sie werden markiert und abgebaut. Falsche Faltung kann zu einem Funktionsverlust und/oder zur falschen Lokalisation innerhalb der Zelle und damit zum Auftreten von Krankheiten führen (zur Übersicht s. Thomas *et al.*, 1995).

Es kann allerdings auch vorkommen, dass sich teildenaturierte Proteine, also Intermediate im Faltungsprozeß, zusammenlagern und Oligomere bzw. größere, fibrilläre Proteinaggregate bilden (s. Abb. 1.1). Oft entstehen bei einem solchen Prozess hochgeordnete Strukturen aus sehr vielen Proteinbausteinen, die als amyloide Fibrillen bezeichnet werden. Der Begriff Amyloid kommt ursprünglich daher, dass einige Eigenschaften an Stärke (Amylose) erinnern (Virchow, 1851). Typische Charakteristika amyloider Fibrillen sind die Anlagerung des Farbstoffes Kongorot, einhergehend mit einer Rotverschiebung der Kongorot-Absorption und einer goldgrünen Doppelbrechung im polarisierten Licht. Außerdem erkennt man im Elektronenmikroskop faserartige Strukturen. Alle bekannten Amyloide und selbst viele nicht-amyloide amorphe Aggregate zeichnen sich durch einen hohen Anteil an β -

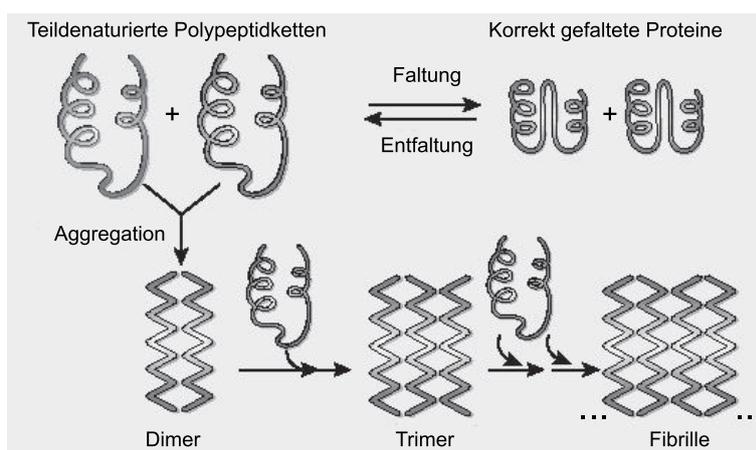


Abbildung 1.1: Das Problem der Proteinaggregation (nach Ellis & Pinheiro, 2002).

Tabelle 2: Krankheiten mit Proteinablagerungen (Auswahl)
Verändert nach Dobson (2001); Sipe (1992)

Krankheit	Vorläuferprotein	betroffenes Organ
Alzheimersche Erkrankung	Amyloid β Peptid	Hirn
Parkinson Syndrom	α -Synuclein	Hirn
Chorea Huntington	Huntingtin	Hirn
Transmissible Spongiforme Enzephalopathien	Prion-Protein	Hirn
Primäre Systemische Amyloidose	Immunoglobulin (leichte Kette)	systemisch
Sekundäre Systemische Amyloidose	Amyloid A-Protein	systemisch
Senile Systemische Amyloidose	Transthyretin	systemisch
Diabetes mellitus Typ II	Amylin (islet-associated protein)	Pankreas
Sichelzellen-Anämie	Hämoglobin	Erythrozyten
Grauer Star	Kristallin	Augenlinse

Faltblatt-Struktur aus, unabhängig von der nativen Struktur des Proteins (Sunde & Blake, 1997; Fink, 1998).

Das Auftreten von Proteinaggregaten bzw. Fibrillen wird mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindung gebracht. Dazu gehören neurodegenerative Krankheiten, bei denen das zentrale Nervensystem betroffen ist, aber auch andere Krankheiten wie die systemischen Amyloidosen (zur Übersicht: Sipe, 1992; Dobson, 2001). Tabelle 2 zeigt eine Auswahl dieser Krankheiten mit den entsprechenden aggregierenden Proteinen. Insgesamt sind etwa 20 solcher Proteine bekannt, die untereinander weder in ihrer Sequenz noch in ihrer nativen Struktur oder Funktion eine Ähnlichkeit aufweisen (Sunde & Blake, 1997).

In jüngster Zeit stellt sich mehr und mehr heraus, dass die Fähigkeit zur Aggregation und zur Bildung amyloider Fibrillen nicht nur eine Eigenschaft einiger weniger Proteine ist, sondern dass wahrscheinlich jedes Protein bei geeigneten (Lösungs-) Bedingungen Aggregate oder auch amyloide Fibrillen bilden kann. Dies konnte mittlerweile für eine Reihe unterschiedlicher Proteine wie z. B. die Acyl-Phosphatase (Chiti *et al.*, 1999), das Myoglobin (Fandrich *et al.*, 2001) und die Phosphoglycerat-

Kinase (Damaschun *et al.*, 1999) gezeigt werden. Keines der untersuchten Proteine steht mit einer amyloiden Krankheit in Zusammenhang. Durch Wahl geeigneter, teildenaturierender Lösungsmittel konnten sie jedoch in Fibrillen mit den typischen Amyloideigenschaften (β -Faltblatt-Struktur, Kongorot-Bindung, im Elektronenmikroskop sichtbare fibrilläre Strukturen) überführt werden.

Die Anzahl der bekannten *in vivo* amyloidbildenden Proteine ist vergleichsweise gering. Von diesen wiederum stehen viele in Verbindung mit Mutationen der Aminosäuresequenz, die zu einer Destabilisierung der nativen Struktur und damit wahrscheinlich zu einer höheren Konzentration der teildenaturierten Formen führen (Dobson, 1999). In der Natur scheint demzufolge die Vermeidung aggregierender Proteinstrukturen von großer Bedeutung zu sein (Dobson, 1999; Lansbury, 1999).

Es ist nicht ganz klar, ob Proteinablagerungen bzw. amyloide Fibrillen selbst krankheitsauslösend sind oder ob sie nur eine Folge von anderen, noch nicht im Detail verstandenen Prozessen sind. Auch Intermediate, also Vorstufen der Fibrillenbildung, werden als die eigentlich toxischen bzw. pathogenen Formen diskutiert (Lansbury, 1999; Rochet & Lansbury, 2000). In neuen Studien konnte die Bedeutung solcher Intermediate in zwei verschiedenen Systemen direkt gezeigt werden. So wurden Fibrillen bzw. deren Vorstufen aus zwei normalerweise harmlosen Proteinen auf Neurotoxizität untersucht (Bucciantini *et al.*, 2002). Dabei stellte sich heraus, dass die im EM-Bild granulär erscheinenden Vorstufen in beiden Fällen deutlich neurotoxischer waren als die Fibrillen selber (Bucciantini *et al.*, 2002). In einer ähnlichen Studie wurden Dimere und Trimere eines mutierten A β -Peptids untersucht, das im Zusammenhang mit der Alzheimerschen Erkrankung steht. Die Oligomere, nicht aber die Monomere oder die Fibrillen, zeigten bei Ratten einen störenden Einfluss auf bestimmte neuronale Funktionen, die als wichtig für Gedächtnisfunktionen und Lernfähigkeit angesehen werden (Walsh *et al.*, 2002).

Vieles deutet also darauf hin, dass nicht die größeren Aggregate oder Fibrillen, sondern kleinere, oligomere Aggregationsintermediate die eigentlich schädlichen Formen bei allen oder zumindest vielen der genannten Krankheiten sind. Die Fibrillen hingegen könnten eine Möglichkeit sein, die potentiell toxischen Vorstufen unschädlich zu machen (Lansbury, 1999; Rochet & Lansbury, 2000).

1.2 Prionkrankheiten

Die Prionkrankheiten stellen eine besondere Untergruppe der neurodegenerativen Krankheiten dar und sind ebenfalls durch das Auftreten von Proteinablagerungen gekennzeichnet. Der synonym verwendete Name **Transmissible Spongiforme Enzephalopathien** (kurz TSE) beschreibt, dass es sich um übertragbare Krankheiten des Gehirns handelt, die mit einer schwammartigen Veränderung des Nervengewebes einhergehen. Es sind sowohl infektiöse als auch spontan auftretende sowie genetisch bedingte Formen bekannt. Das gleichzeitige Auftreten dieser verschiedenen Ätiologien (Krankheitsursachen) ist eine sehr ungewöhnliche Eigenschaft, die Prionkrankheiten bzw. ihren Erreger von anderen Krankheiten und Erregertypen unterscheidet (zum Überblick s. Prusiner, 1998).

Im Gehirn erkrankter Tiere oder Menschen findet man v. a. im Kleinhirn sogenannte amyloide Plaques (Roberts & Clinton, 1992). Es sind aber auch Fälle bekannt, in denen keine amyloiden Ablagerungen gefunden wurden (Hsiao *et al.*, 1994; Tateishi *et al.*, 1995; Collinge *et al.*, 1995).

Prion-Krankheiten sind beim Menschen sowie bei einer Reihe von weiteren Säugetieren bekannt. Sie zeichnen sich durch einen rasch fortschreitenden Krankheitsverlauf aus, der innerhalb weniger Monate zum Tode führt. Dem geht eine oft jahrelange symptomlose Inkubationszeit voraus. Im Verlaufe der Krankheit kommt es zu einer degenerativen Hirnzerstörung, die mit Bewegungsstörungen und Verhaltensänderungen einhergeht. Beim Menschen tritt außerdem ein Verfall der geistigen Fähigkeiten ein (Demenz). Histopathologisch beobachtet man eine schwammartige („spongiforme“) Veränderung des Gehirns, verursacht durch eine Vakuolisierung des Neuropils. Dies wird oft von einer abnormen Vermehrung und Vergrößerung von Gliazellen begleitet (astrozytäre Gliose). Eine Übersicht über den Krankheitsverlauf und die Histopathologie ist in einer neueren Monographie gegeben (Hörnlimann *et al.*, 2001).

Die Creutzfeld-Jakob-Krankheit (kurz CJD für Creutzfeld-Jakob-Disease) ist die häufigste Prionkrankheit des Menschen. In etwa 85 % der Fälle handelt es sich um die spontan auftretende Form, die mit einer Inzidenz von etwa einem Fall pro Million Einwohner und Jahr fast ausschließlich ältere Menschen betrifft. Auch genetisch bedingte Formen sind bekannt. Darüberhinaus gibt es eine Reihe von Fällen, bei denen eine Übertragung durch medizinische Unfälle (iatrogen) erfolgte, wie z. B. durch die Verabreichung kontaminierter Wachstumshormone, Hirnhaut-Transplantationen

oder Eingriffe im zentralen Nervensystem mit unzureichend sterilisierten chirurgischen Instrumenten (zum Überblick zu CJD s. Belay, 1999).

Besondere Aufmerksamkeit hat in den letzten Jahren die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE), also eine bei Rindern auftretende Prionkrankheit, erlangt. Man nimmt an, dass sie in den 80er Jahren neu entstanden ist. Dabei ist nicht ganz klar, ob der Erreger ursprünglich von der bei Schafen schon lange bekannten Traber-Krankheit (engl. Scrapie von to scrape=kratzen) stammt (Wilesmith & Wells, 1991; Prusiner, 2001), oder ob eine spontane Mutation bei wenigen Rindern die Ursache ist (Phillips *et al.*, 2000).

Bedingt durch die hohe Widerstandsfähigkeit des Erregers reichten die damals üblichen Sterilisationsverfahren zur Herstellung von Fleisch- und Knochenmehl aus Tierkadavern nicht aus, um eine vollständige Inaktivierung zu gewährleisten (Wilesmith & Wells, 1991). Die Krankheit konnte somit durch die Verfütterung des mit BSE-erkrankten Tieren kontaminierten Fleisch- und Knochenmehls verbreitet werden. BSE nahm in den 80er und Anfang der 90er Jahre mit bis zu 36.682 Fällen pro Jahr (1992) (Hörnlimann, 2001) die Form einer Epidemie an. Auch bei einigen Zootieren wurden in diesem Zusammenhang BSE-ähnliche Krankheiten beobachtet, die ebenfalls auf kontaminiertes Tiermehl zurückgeführt werden (Wells & McGill, 1992; Bons *et al.*, 1996).

Das Auftreten einiger Fälle einer neuen Variante der CJD (vCJD) in Großbritannien ab 1996 (Will *et al.*, 1996; Collinge, 1999) führte zu dem Verdacht, dass hier eine Übertragung von BSE auf den Menschen durch Verzehr kontaminierter Rinderprodukte vorliegt. Im Gegensatz zur vorher beschriebenen „klassischen“ CJD war das Durchschnittsalter der Patienten hier wesentlich niedriger (28 Jahre im Vergleich zu über 60 Jahren, Belay, 1999). Transgene Mäuse, die bovines Prion-Protein (s. Abschnitt 1.3.2) exprimieren, zeigten identische Inkubationszeiten, neuropathologische Merkmale und Art der PrP-Ablagerung, egal ob sie mit BSE oder vCJD infiziert wurden (Scott *et al.*, 1999). Die biochemischen Eigenschaften (Glykosylierungsmuster, s. Abschnitt 1.4) des Erregers stimmten eher mit denen des BSE-Erregers als mit denen der klassischen CJD überein (Collinge & Rossor, 1996). Auch Studien mit BSE- bzw. CJD-infizierten Makaken (Lasmezas *et al.*, 1996) stützen die Annahme, dass es sich bei vCJD um auf den Menschen übertragene BSE-Erreger handelt.

Da Scrapie schon sehr lange bekannt ist und nie eine Übertragung auf den Menschen beobachtet wurde, war BSE als Auslöser der vCJD lange umstritten. Bis jetzt sind allein in Großbritannien 115 Menschen an vCJD gestorben (Quelle: CJD

surveillance unit, www.cjd.ed.ac.uk, Stand: September 2002), zudem gab es sechs Fälle in Frankreich und je einen in Irland, Italien, den USA und Kanada. Noch ist unklar, ob der Höhepunkt der vCJD-Welle bereits erreicht ist oder ob es sich um den Beginn einer Epidemie handelt. Zur Abschätzung des Risikos ist es wichtig zu wissen, ob BSE auch von den Rindern wieder zurück auf Schafe übertragen wurde, so dass eine Übertragung auf den Menschen auch über Schaffleisch denkbar wäre. Studien zu diesem Thema sind umstritten (Frankish, 2001). Eine Prognose der möglichen Fallzahlen für vCJD ist aufgrund der schlechten Datenlage ausgesprochen schwierig. Aktuelle Schätzungen gehen je nach zugrundegelegtem Szenario von 50 bis 150000 weiteren Fällen zusätzlich zu den bis jetzt aufgetretenen aus (Ferguson *et al.*, 2002). Eine effektive Therapie ist derzeit nicht in Sicht, obwohl es erste vielversprechende Ansätze zur Entwicklung von Medikamenten gibt (zur Übersicht s. Griffiths, 2002).

1.3 Das Prion-Modell

Der Begriff Prion wurde von Stanley Prusiner geprägt und ist eine sprachlich freie Abkürzung für engl. *proteinaceous, infectious particle*, also proteinartiges, infektiöses Partikel. Er besagt, dass der Erreger zum größten Teil aus Protein (dem Prion-Protein) besteht. Nach der Protein-only-Hypothese ist es sogar alleiniger Bestandteil des infektiösen Agens. Das Konzept eines Proteins als Krankheitserreger erzeugte zunächst viel Widerstand, weil man sich einen selbstreplizierenden Erreger ohne eine codierende Nukleinsäure nicht vorstellen konnte. Mittlerweile ist diese These jedoch weitgehend anerkannt, da sie von einer Vielzahl von Indizien gestützt wird.

1.3.1 Ungewöhnliche Eigenschaften des Erregers

Erste Hinweise darauf, dass der Scrapie-Erreger sich von bekannten Krankheitserregern unterscheidet, gab es bereits 1967, als versucht wurde, ihn durch ionisierende Strahlung zu inaktivieren (Alper *et al.*, 1967). Eine solche Behandlung hätte jede bekannte Nukleinsäure zerstören müssen, hatte jedoch auf die Infektiosität des Scrapie-Erregers einen vergleichsweise viel zu geringen Einfluss. Spekulationen, dass es sich um ein Protein handeln könnte, gab es bald darauf (Alper *et al.*, 1967; Griffith, 1967). Versuche zur Aufreinigung des Erregers bei den infektiösen Formen führten zur Anreicherung eines amyloiden Proteins, auch Prion-Protein oder kurz PrP genannt (Prusiner *et al.*, 1982a). Der aufgereinigte Scrapie-Erreger zeigte sich weiterhin resistent gegen jede Art von Nukleinsäure zerstörender Behandlung (Prusiner *et al.*,

1980; McKinley *et al.*, 1983b), während Methoden zur Proteindenaturierung ihn sehr wohl inaktivieren konnten (Prusiner *et al.*, 1981, 1982a).

Die Übertragung von Scrapie auf Mäuse (Chandler, 1961) und später auf den Syrischen Goldhamster (Marsh & Kimberlin, 1975) stellte ein geeignetes Tiermodell für weiterführende Untersuchungen zur Verfügung. Die Entdeckung, dass das krankheitsassoziierte Prion-Protein ungewöhnlich resistent gegen Verdauung mit Proteasen ist, ermöglichte die Anreicherung von Infektiosität in sogenannten Prion-Stäbchen (engl. Prion-Rods) (Prusiner *et al.*, 1982a). Bis heute ist die einzige Methode zur Quantifizierung der Infektiosität einer Probe der Bioassay, d. h. der Tierversuch mit Hamstern oder Mäusen. Eine erhebliche Verbesserung wurde durch die Erkenntnis erzielt, dass die Inkubationszeit reziprok proportional zum Titer ist, so dass wesentlich weniger Tiere benötigt werden als vorher (Prusiner *et al.*, 1982b).

1.3.2 PrP^C und PrP^{Sc}: Die beiden Formen des Prion-Proteins

Nach Identifizierung eines Proteins als Hauptkomponente aufgereinigter Infektiosität stellte man fest, dass das Prion-Protein durch ein wirtseigenes Gen (*Prnp*) codiert wird (Basler *et al.*, 1986), das bei allen Säugetieren vorkommt und hochkonserviert ist (Schätzl, 2001). Es handelt sich um ein peripheres Membranprotein, das v. a. im Zentralnervensystem (Kretzschmar *et al.*, 1986), aber auch in den meisten anderen Organen außer Leber und Pankreas (Weissmann, 1994) exprimiert wird. Das warf die Frage auf, wie ein von außen eingebrachtes, im Körper aber auch exprimiertes Protein eine Krankheit verursachen soll. Dieses scheinbare Paradox wird durch das Prion-Modell folgendermaßen erklärt: Das Protein kann zwei verschiedene Strukturen annehmen, genannt PrP^C für zelluläres (engl. cellular) Prion-Protein und PrP^{Sc} für Scrapie Prion-Protein. Die zelluläre Form ist vollkommen unschädlich. Gelangt jedoch durch eine Infektion PrP^{Sc} in den Körper, so ist dieses in der Lage, dem PrP^C seine Struktur „aufzuzwingen“ und sich so zu replizieren.

Beide Formen zeigen keinen Unterschied in ihrem chemischen Aufbau. Mittels Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuresequenzen identisch sind und keine unterschiedlichen kovalenten Modifikationen gefunden werden (Stahl *et al.*, 1993). Allerdings besteht eine infektiöse Einheit aus ca. 10^5 PrP-Molekülen (Prusiner, 1991), so dass eine Modifikation eines kleinen Anteils infektiöser Moleküle, die sich in einem großen Überschuss eigentlich ungefährlicher, nicht veränderter Moleküle verbergen, nicht ausgeschlossen werden kann.

Nach dem Prion-Modell ist das Vorhandensein von PrP^C für die Replikation des Erregers zwingend notwendig. Dies konnte mit Hilfe von sogenannten PrP^{0/0}-Mäusen bestätigt werden, denen das PrP-Gen fehlt. Sie sind nicht mehr mit Prionen infizierbar und können die Krankheit auch nicht weitergeben (Bueler *et al.*, 1993; Prusiner *et al.*, 1993).

Alle bekannten genetisch bedingten menschlichen Prion-Erkrankungen stehen im Zusammenhang mit Mutationen des PrP-Gens. Über 20 dieser Mutationen sind bis heute bekannt (Prusiner, 1998). Nach der Prion-Hypothese können diese Krankheitsformen durch eine verringerte konformationelle Stabilität des PrP^C erklärt werden, die die Bildung des pathogenen PrP^{Sc} fördert.

1.3.3 Prion-Stämme

Ein wichtiges Argument der Gegner der Prion-Hypothese ist die Tatsache, dass es verschiedene Scrapie-Stämme gibt, die ihren Ursprung in verschiedenen Feld-Isolaten haben und sich z. B. in der Inkubationszeit und den verursachten histopathologischen Läsionsmustern unterscheiden. Diese charakteristischen Eigenschaften bleiben bei seriellen Passagen in der Maus erhalten (Dickinson *et al.*, 1968; Bruce *et al.*, 1991) und sind auch bei Mäusen mit identischem genetischen Hintergrund zu beobachten (Bruce *et al.*, 1992). Das könnte als Indiz dafür gewertet werden, dass doch eine codierende Nukleinsäure vorhanden sein muss, die diese Informationen weitergeben kann. Trotz intensiver Suche wurde eine solche Nukleinsäure jedoch nicht gefunden. Mittels einer neu entwickelten Methode, der Umkehr-Refokussierungs-Gelelektrophorese, konnte das Vorhandensein einer Nukleinsäure von mehr als 50 Nukleotiden Länge pro infektiöser Einheit ausgeschlossen werden (Meyer *et al.*, 1991; Kellings *et al.*, 1992). Für eine noch kleinere Nukleinsäure kann man nicht mehr von einer codierenden, sondern höchstens von einer regulatorischen Funktion ausgehen.

Unterschiede im PrP^{Sc} konnten dagegen mit Stammeigenschaften korreliert werden, so dass diese auch durch verschiedene Varianten bzw. Konformationen des PrP^{Sc} erklärt werden können. So wurden Unterschiede im Glykosylierungsmuster und der PK-Schnittstelle (s. Abschnitt 1.4) gefunden (Collinge & Rossor, 1996). Ebenso deutet eine unterschiedlich starke PK-Resistenz bei PrP^{Sc} verschiedener Stämme auf das Vorhandensein verschiedener Konformationen im aggregierten Zustand hin (Safar *et al.*, 1998).

1.4 Die Struktur von PrP^C und PrP^{Sc}

Das primäre Translationsprodukt des Prion-Protein-Gens aus Hamster besteht aus 254 Aminosäuren. Bei den ersten 22 handelt es sich um eine Signalsequenz für den Transport ins Endoplasmatische Retikulum (ER), die dabei abgeschnitten wird. Aminosäure 232-254 sind ein Signal für das Anhängen eines Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Ankers, der das Protein an der Außenseite der Zellmembran festhält (Bolton *et al.*, 1985; Safar *et al.*, 1990). Wie für GPI-geankerte Proteine zu erwarten, ist PrP hauptsächlich in sogenannten Caveolae-ähnlichen Domänen der Plasmamembran zu finden (Taraboulos *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996).

Die Sequenz beinhaltet nur zwei Cysteine (179 und 214), zwischen denen eine Disulfidbrücke ausgebildet wird (Turk *et al.*, 1988). Es gibt zwei N-Glykosylierungsstellen, an die verzweigte Zuckerseitenketten angehängt werden: Asn181 und Asn197 (Endo *et al.*, 1989). Dabei findet man sowohl unglykosylierte als auch einfach und zweifach glykosylierte Formen. Das vollständig posttranslational modifizierte zelluläre Prion-Protein ist schematisch in Abb. 1.2 dargestellt. Zusätzlich sind die mittels NMR-Spektroskopie ermittelten Sekundärstrukturelemente (s. u.) angegeben.

Unterschiede zwischen beiden Formen des Prion-Proteins sind zwar nicht in seinen chemischen, wohl aber in seinen physikalischen Eigenschaften zu finden. PrP^C ist in milden Detergenzien löslich, sensitiv gegen Verdauung mit Protease K (kurz PK) und zeigt eine hauptsächlich α -helikale Sekundärstruktur. Dagegen ist PrP^{Sc} in milden Detergenzien unlöslich, d. h. es liegt aggregiert vor, ist ungewöhnlich PK-resistent und hat eine β -Faltblatt-reiche Sekundärstruktur (Pan *et al.*, 1993; Safar *et al.*, 1993). Bei Verdauung durch Protease K entsteht aus PrP^{Sc} ein N-terminal

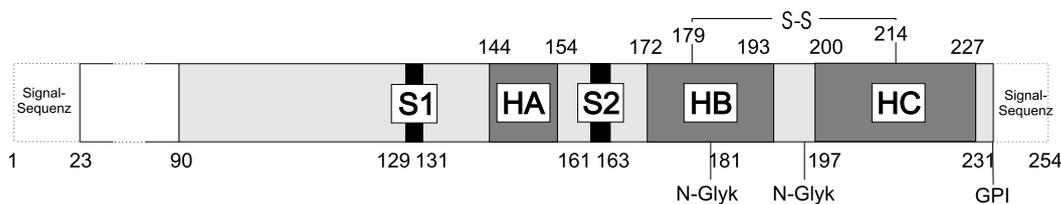


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Hamster-PrP^C Eingezeichnet sind die Sekundärstrukturelemente nach Liu *et al.* (1999) und posttranslationale Modifikationen. Die beiden Signalsequenzen, die bei der Prozessierung abgeschnitten werden, sind gestrichelt angedeutet. Hellgrau unterlegt ist der Bereich Aminosäure 90-231, der der zitierten NMR-Struktur zugrunde liegt und dem PrP 27-30 entspricht. HA, HB, HC: α -Helices; S1, S2: β -Faltblätter (engl. β -sheet).

verkürztes Produkt, das nach seinem apparenten Molekulargewicht bei elektrophoretischer Auftrennung PrP 27-30 genannt wird (McKinley *et al.*, 1983a). PrP^C dagegen hat genau wie nicht PK-verdautes PrP^{Sc} ein apparentes Molekulargewicht von 33-35 kDa (Oesch *et al.*, 1985). Das verkürzte Fragment PrP 27-30 (ca. Aminosäure 90-231) ist Hauptbestandteil aufgereinigter Prion-Rods und für die Weitergabe von Infektiosität ausreichend (Prusiner *et al.*, 1982a). Die Nomenklatur für die verschiedenen Isoformen bzw. Fragmente des Prion-Proteins sind nochmals in Tab. 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Nomenklatur der verschiedenen Isoformen und Fragmente des Prion-Proteins

Bezeichnung	Aminosäuren	Bedeutung
PrP ^C	23-231	zelluläres Prion-Protein
PrP ^{Sc}	23-231	infektiöse „Scrapie-Isoform“ des Prion-Proteins
PrP 27-30	≈ 90-231	PK-resistentes, infektiöses C-terminales Fragment des PrP ^{Sc}
recPrP 90-231	90-231	rekombinant hergestelltes PrP mit der Aminosäuresequenz des PrP 27-30

Prion-Protein kann in großen Mengen in Bakterienzellen produziert werden (z. B. Mehlhorn *et al.*, 1996). Dieses rekombinante PrP ist nicht glykosyliert und besitzt keinen GPI-Anker. Detaillierte Strukturuntersuchungen mittels NMR sind bis jetzt nur mit diesem Material möglich, das aufgrund seiner Löslichkeit und α -helikalen Struktur als PrP^C-ähnlich angesehen wird. Mittlerweile sind die NMR-Strukturen einer Reihe rekombinanter Prion-Proteine aus verschiedenen Säugetieren (Hamster: James *et al.* (1997); Liu *et al.* (1999); Donne *et al.* (1997), Maus: Riek *et al.* (1996, 1997), Rind: Lopez *et al.* (2000)) und aus Mensch (Zahn *et al.*, 2000) bekannt. Die Strukturen für PrP aus verschiedenen Spezies unterscheiden sich nur geringfügig, z. B. in der Länge der α -Helices, voneinander. Allen ist gemeinsam, dass der N-Terminus (bei Hamster Aminosäure 23-128) sehr flexibel ist und ihm keine geordnete Struktur zugeordnet werden kann. Der C-terminale Bereich dagegen zeigt eine globuläre, wohldefinierte Struktur mit drei α -Helices und einem kleinen, antiparallelen β -Faltblatt (s. Abb. 1.2). Abb. 1.3 zeigt exemplarisch die Struktur der C-terminalen Domäne des rekombinanten PrP 90-231 aus Hamster (die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäuresequenz), das der Sequenz des PrP 27-30 entspricht.

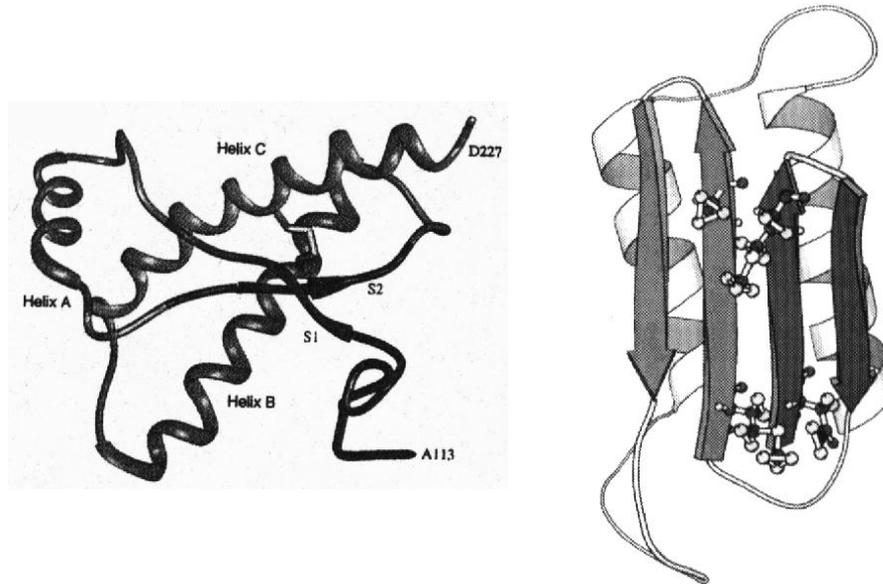


Abbildung 1.3: NMR-Struktur des PrP^C und Strukturmodell für PrP^{Sc} Links ist die NMR-Struktur des rekombinanten Hamster PrP 90-231 gezeigt (James *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999). Rechts ein berechnetes Modell für die PrP^{Sc}-Struktur (Huang *et al.*, 1996).

Für PrP^{Sc} gibt es bis jetzt noch keine hochaufgelöste räumliche Struktur. Das hängt vor allem damit zusammen, dass PrP^{Sc} nicht in löslicher Form für NMR-Studien zur Verfügung steht. Auch die Bildung von Kristallen für Röntgenstrukturanalysen ist noch nicht gelungen. Bis vor kurzem war ein theoretisches Modell der einzige Anhaltspunkt für die PrP^{Sc}-Struktur (s. Abb. 1.3, Huang *et al.*, 1996). Es zeigt, wie erwartet, einen hohen Anteil an β -Faltblatt-Struktur. Die Helices B und C bleiben bei der postulierten Umfaltung weitestgehend intakt, während Helix A verschwindet und neue β -Faltblätter hinzukommen.

Einen neuen Hinweis darauf, wie die Struktur aussehen könnte, lieferte dieses Jahr die Untersuchung kleiner PrP 27-30 Partikel, die in Prion-Aufreinigungen gefunden werden (Wille *et al.*, 2002). Es handelt sich um kleine zweidimensionale PrP-Kristalle, die mittels Elektronenmikroskopie und moderner Bildverarbeitung untersucht wurden. Dadurch ließ sich ein Strukturmodell berechnen, das genau zu den beobachteten Daten passt (s. Abb. 1.4). Das von den Autoren bevorzugte Modell beschreibt den Partikel als ein Trimer aus Dimeren, d. h. insgesamt sechs PrP 27-30 Moleküle bilden einen der Kristalle. Mit großer Sicherheit konnte festgestellt werden, dass die Zuckerseitenketten dabei nach außen zeigen, während die Polypeptidkette

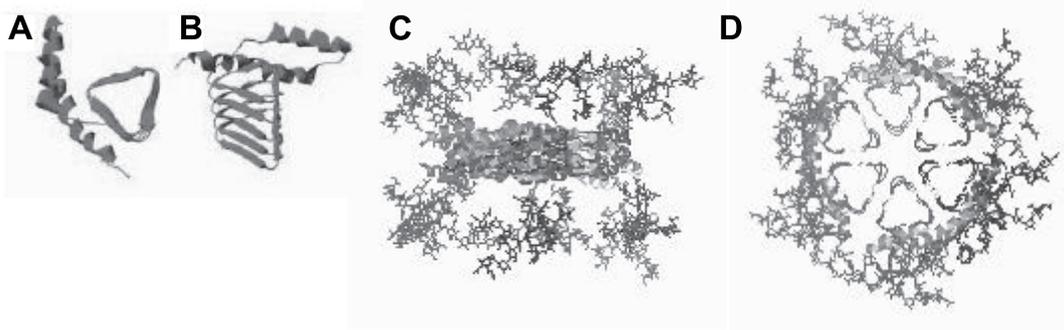


Abbildung 1.4: Modell eines PrP^{Sc}-Oligomers Gezeigt ist die von den Autoren als am wahrscheinlichsten angesehene Struktur (Wille *et al.*, 2002). Es handelt sich um ein Trimer aus Dimeren. A und B zeigen jeweils den reinen Proteinanteil eines Monomers, als Aufsicht und als Seitenansicht. C und D sind verschiedene Ansichten des gesamten Hexamers. Die Zuckerseitenketten zeigen nach außen, und im Inneren ist eine β -Helix zu erkennen. Weitere Einzelheiten s. Text.

im Inneren angeordnet ist. Auch nach diesem Modell bleiben Helix B und C erhalten. Das Innere des Oligomers bildet eine sogenannte parallele β -Helix. Dabei handelt es sich um β -Faltblätter, die helixartig gewunden sind. Diese erst vor relativ kurzer Zeit entdeckte Sekundärstruktur (Yoder *et al.*, 1993) ist auch von einigen anderen Proteinen bekannt (Raetz & Roderick, 1995; Jenkins *et al.*, 1998; Seckler, 1998). Die β -Helix wird neben einer Cross-beta-Struktur als gemeinsames Strukturmotiv amyloider Fibrillen diskutiert (Rochet & Lansbury, 2000).

1.5 Funktion des PrP^C

Die Tatsache, dass das PrP-Gen in Säugetieren so stark konserviert ist (s. Abschnitt 1.3.2), spricht für eine wichtige Funktion des PrP^C in der Zelle. Dennoch stellte sich heraus, dass Prnp^{0/0}-Mäuse, die also kein PrP^C exprimieren können, nicht nur lebensfähig, sondern sogar gesund sind (Bueler *et al.*, 1992; Manson *et al.*, 1994). Lediglich ein veränderter Schlaf-Wach-Rhythmus wurde beobachtet. Für widersprüchliche Ergebnisse, die von einem Verlust von Purkinje-Zellen und neurologischen Störungen bei Knockout-Mäusen berichteteten (Sakaguchi *et al.*, 1996), wurde mittlerweile eine mögliche Erklärung gefunden. Etwa 16 Kilobasen „downstream“ von Prnp wurde ein weiteres Gen (Prnd) entdeckt, das für ein Protein mit verblüffender struktureller Ähnlichkeit zu PrP codiert. Dieses PrP-ähnliche Protein wurde Doppel (Akronym für **D**ownstream **P**rion-**P**rotein like **E**lement) genannt (Moore *et al.*, 1999; Silverman *et al.*, 2000; Mo *et al.*, 2001). Die phänotypischen

Auffälligkeiten einiger Knockout-Mäuse waren darauf zurückzuführen, dass bei den verwendeten Genkonstrukten durch alternatives Splicing das Doppel-Gen hinter den PrP-Promotor gelangte, was zu einer Überexpression von Doppel im Hirn führte. Eine direkte Korrelation zwischen Doppel-Expression im Hirn und neurologischen Veränderungen konnte gezeigt werden (Rossi *et al.*, 2001).

Erste Hinweise auf eine Funktion lieferte die Tatsache, dass PrP^C Kupfer binden kann (Brown *et al.*, 1997a). Eine Funktion bei der Wiederaufnahme von Kupfer aus dem synaptischen Spalt wird diskutiert und würde auch veränderte elektrophysiologische Messungen bei PrP Knockout-Mäusen erklären (Herms & Kretzschmar, 2001). PrP-defiziente Mäuse sind anfälliger gegen oxidativen Stress (Brown *et al.*, 1997b). Dies könnte indirekt ebenfalls mit einem gestörten Kupferstoffwechsel zusammenhängen, da Enzyme wie die Cu/Zn Superoxid-Dismutase, die am Abbau reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sind, Kupfer als Cofaktor benötigen. Eine geringe Superoxid-Dismutase-Aktivität des PrP selbst wurde gezeigt (Brown *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2000), konnte jedoch von anderen Gruppen nicht bestätigt werden (Waggoner *et al.*, 2000).

Durch *in situ* Crosslinking konnte in Zellkulturen eine Bindung des PrP an neuronale Zell-Adhäsions-Moleküle (N-CAMs) gezeigt werden, was auf eine Funktion des PrP bei der Zell-Zell-Adhäsion hindeuten könnte. (Schmitt-Ulms *et al.*, 2001). Ein anderer experimenteller Ansatz bestand darin, die PrP^C-Moleküle auf der Zelloberfläche neuronaler Zellkulturen durch Antikörper zu vernetzen. Als Folge dieser Vernetzung konnte eine Aktivierung der Tyrosin-Kinase Fyn, die zur Familie der Src-Kinasen gehört, gezeigt werden (Mouillet-Richard *et al.*, 2000). Eine mögliche Funktion des PrP^C könnte somit auch in der Signaltransduktion bestehen.

1.6 Replikationsmechanismus

Nach dem Prion-Modell ist PrP^{Sc} in der Lage, die Umwandlung von PrP^C in weiteres PrP^{Sc} zu katalysieren. Für den genauen Mechanismus dieser Umwandlung gibt es mehrere Modelle: Das von Cohen und Prusiner postulierte Heterodimermodell (Cohen *et al.*, 1994) geht von einem Gleichgewicht zwischen PrP^C und einer angeregten (z. B. teildenaturierten) Form PrP* aus, das auf Seiten des PrP^C liegt. Nur PrP* kann mit PrP^{Sc} interagieren. Wenn beispielsweise aufgrund einer Infektion exogenes PrP^{Sc} eindringt, bildet es mit PrP* ein Heterodimer, wobei PrP* in

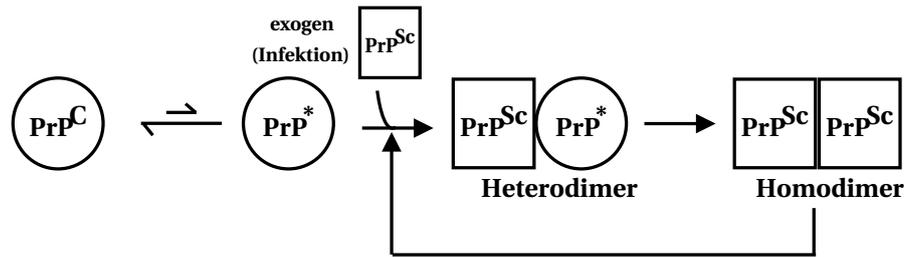


Abbildung 1.5: Heterodimermodell der Prionreplikation Die Umwandlung von PrP^{C} in PrP^{Sc} erfolgt über einen heterodimeren Zwischenzustand. Eine angeregte Form des PrP^{C} , PrP^* , bindet dabei direkt an PrP^{Sc} verändert nach (verändert nach Cohen *et al.*, 1994, .)

neues PrP^{Sc} umgewandelt wird. Das entstandene Homodimer kann dissoziieren, und beide Monomere können neue Umwandlungen katalysieren (s. Abb. 1.5).

Lansbury postuliert einen etwas anderen Mechanismus, die sogenannte Keim-abhängige Polymerisation (Jarrett & Lansbury, 1993, s. Abb. 1.6). Der kritische Schritt ist hier die Bildung eines Nukleationskeims. Hat ein Oligomer aus PrP^{Sc} -Molekülen eine bestimmte kritische Größe überschritten, so ist die Anlagerung weiterer PrP^{C} -Moleküle und die damit verbundene Umwandlung energetisch begünstigt. Die Bildung des Keims ist jedoch sehr ungünstig, geschieht also nicht bzw. nur sehr selten spontan.

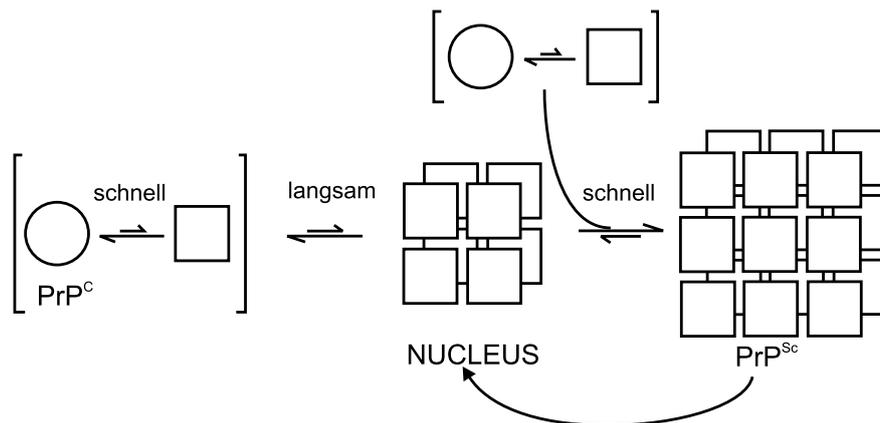


Abbildung 1.6: Keimabhängige Polymerisation nach Lansbury Entscheidend für die Bildung von PrP^{Sc} ist das Überschreiten einer kritischen Keimgröße (aus Jarrett & Lansbury, 1993).

Der größte Unterschied zwischen beiden Modellen liegt darin, dass nach Prusiner PrP^{Sc} die thermodynamisch bevorzugte Form ist, die nur aufgrund der hohen Aktivierungsenergie nicht gebildet wird. Nach Lansbury dagegen ist PrP^C stabiler als (monomeres) PrP^{Sc}. Eine genaue kinetische Berechnung für beide Modelle zeigte, dass Geschwindigkeitskonstanten für das Heterodimermodell nicht innerhalb eines realistischen Bereichs liegen. Beim Lansbury-Modell dagegen ist nicht klar, wie der Zerfall der gebildeten Proteinaggregate zu neuen Kristallisationskeimen funktionieren soll (Eigen, 1996). Das führte Eigen zur Postulierung des sogenannten kooperativen Prusiner-Modells. Hier müssen mehrere PrP^{Sc}-Moleküle zusammenwirken, um ein PrP^C-Molekül umzuwandeln. Dies bietet eine Erklärung dafür, dass nicht bereits winzige Mengen an spontan im Gleichgewicht gebildetem PrP^{Sc} den Umwandlungsprozess irreversibel in Gang setzen.

1.7 Dimere des Prion-Proteins

Nach dem Heterodimer-Modell interagieren monomeres PrP^C und PrP^{Sc}, wobei die Umwandlung im Heterodimer stattfindet. Ein Dimer ist die kleinste denkbare Einheit für einen solchen PrP-PrP-Komplex. Wie ein solches Dimer aussehen könnte, ist noch nicht klar. Allerdings gibt es Hinweise, dass ein PrP-Dimer auch *in vivo* eine Rolle spielen könnte. Inaktivierungsexperimente an Scrapie-Erregern durch sehr hohe Dosen ionisierender Strahlung erlaubten anhand der bestimmten Inaktivierungskurven die Berechnung einer „Treffergröße“ von etwa 55 kDa, was einem PrP-Dimer entsprechen würde (Bellinger-Kawahara *et al.*, 1988). Bei Versuchen mit Scrapie-infizierten Zellkulturen wurde eine 60 kDa-Bande beschrieben, bei der es sich um ein kovalent verknüpftes Dimer des Prion-Proteins handelte. Dieses wurde sowohl in infizierten Zellkulturen als auch im Hirnhomogenat infizierter Hamster nachgewiesen, nicht aber in gesunden Hamstern (Priola *et al.*, 1995).

Ob solche Dimere *in vivo* eine spezielle Funktion haben, ist noch unklar. Ihre Struktur könnte aber in jedem Fall Hinweise auf die Art der intermolekularen Wechselwirkung der PrP-Monomere liefern und somit zum Verständnis der Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} beitragen.

1.8 *In vitro* Konversion

Der endgültige Beweis für die Prion-Hypothese wäre die sogenannte *in vitro* Konversion. Man müsste also nicht infektiöses, reines PrP^C im Reagenzglas durch eine

bestimmte Behandlung in infektiöses PrP^{Sc} umwandeln können. Das ist bis heute nicht gelungen. Es ist nicht klar, ob nur die richtige PrP^{Sc}-Struktur noch nicht gefunden wurde oder ob weitere essentielle Komponenten für die Umwandlung fehlen. In diesem Zusammenhang wird ein zellulärer Faktor X diskutiert, dass zur Erklärung der Speziesbarriere in einem experimentellen System postuliert wird (Telling *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997b). In aufgereinigten Prion-Rods konnten zudem Lipide und ein hochpolymerer Zucker nachgewiesen werden (Klein *et al.*, 1998; Dumpitak, 1998). Auch ein Einfluss dieser Stoffe auf die Erzeugung von Infektiosität ist denkbar und wird zur Zeit untersucht (Doktorarbeit Christian Dumpitak).

Ein in der Literatur beschriebenes System zur *in vitro* Konversion arbeitet mit radioaktiv markiertem PrP^C. Hier wird selektiv nur neu entstandenes, PK-resistentes PrP detektiert. Ursprünglich wurde ein großer Überschuss an teildenaturiertem PrP^{Sc} eingesetzt, durch den das markierte PrP^C in eine PK-resistente Form, also PrP 27-30, überführt werden konnte (Kocisko *et al.*, 1994). Mittlerweile ist das System verfeinert worden und funktioniert ohne vorherigen Denaturierungsschritt. Stattdessen wird bei erhöhten Salz-Konzentrationen (200 mM KCl, 5 mM MgCl₂) gearbeitet (Horiuchi & Caughey, 1999). Neu erzeugte Infektiosität konnte nicht nachgewiesen werden (Hill *et al.*, 1999). Auch andere Ergebnisse sprechen dafür, dass PK-Resistenz nicht notwendigerweise mit Infektiosität korreliert (Shaked *et al.*, 1999).

Eine weitere Möglichkeit zum direkten Beweis der Prion-Hypothese wäre die Erzeugung löslicher Infektiosität. Hätte man nämlich eine infektiöse Lösung, in der als nachweisbar einzige Komponente lösliches PrP^{Sc} enthalten ist, so könnte nur PrP^{Sc} die Ursache sein. Deshalb wurden Versuche unternommen, PrP 27-30 aus Prion-Rods zu solubilisieren (Riesner *et al.*, 1996). Dabei zeigte sich, dass eine Kombination aus niedrigen Konzentrationen des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) und Ultraschallbehandlung die besten Ergebnisse brachte. Es entstanden lösliche Tetramere bis Hexamere, die eine PrP^C-ähnliche, α -helikale Struktur zeigten. Allerdings zeigte das Material nach der Solubilisierung nur noch eine leichte Restinfektiosität, wie auch bei Solubilisierungsversuchen anderer Gruppen (Gasset *et al.*, 1993). Ausgehend von dem beschriebenen solubilierten PrP wurde im Rahmen zweier Doktorarbeiten (Post, 1998; Pitschke, 1999) ein Konversionssystem entwickelt, das zwar nicht die Infektiosität, wohl aber andere Eigenschaften wie β -Faltblatt-Struktur, Unlöslichkeit, Aggregation und partielle PK-Resistenz aus dem solubilierten Material wiederherstellen kann (s. Abb. 1.7). Dabei wird zunächst

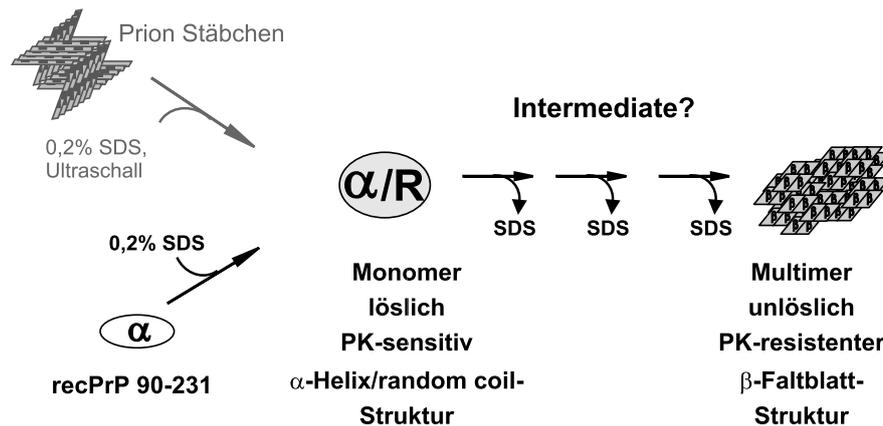


Abbildung 1.7: *In vitro*-Konversionsmodell für PrP. Reduktion der SDS-Konzentration durch Verdünnen führt zur Wiederherstellung einiger typischer PrP^{Sc}-Merkmale. Verändert nach (Post *et al.*, 1998).

solubilisiertes PrP hergestellt, das in 0,2% SDS vorliegt. Durch Verdünnen des SDS auf 0,01% konnte ein Strukturübergang zu deutlich höherem β -Faltblatt-Anteil und eine Aggregation induziert werden. Das erzeugte Material hatte eine leicht erhöhte PK-Resistenz, aber neue Infektiosität war nicht feststellbar (Post *et al.*, 2000). Das System konnte auch auf rekombinantes Hamster PrP 90-231 angewendet werden, das der Aminosäuresequenz des vorher verwendeten PrP 27-30 entspricht, aber nicht glykosyliert ist und keinen GPI-Anker besitzt. Hier erhält man stabil lösliches, monomeres Material durch Inkubation in 0,2% SDS. Ausdünnen auf 0,01% führt auch hier zur Aggregation und Ausbildung von β -Faltblatt-Struktur. Das rekombinante PrP ist jedoch in keiner der genannten Strukturen infektiös (Post *et al.*, 2000). Da es in wesentlich größeren Mengen zur Verfügung steht, bietet es sich für detaillierte Studien mit hohem Materialverbrauch an.

Im Rahmen einer Diplomarbeit (Jansen, 1998) wurden erste Versuche unternommen, Intermediate der beschriebenen Umwandlung zu erzeugen und stabil zu halten. Dabei zeigte sich, dass durch Variation der SDS-Konzentration ein lösliches, oligomeres Intermediat stabilisiert werden kann, das bereits β -Faltblatt-Struktur zeigt und somit eine PrP^{Sc}-ähnliche Struktureigenschaften aufweist.

1.9 Fragestellung

Bis heute konnte die Prion-Hypothese nicht endgültig bewiesen werden. Unumstritten ist jedoch, dass der Umwandlung der zellulären Isoform des Prion-Proteins PrP^C in

die krankheits-assoziierte Form PrP^{Sc} eine zentrale Bedeutung zukommt. Ob die beobachteten amyloiden Plaques bzw. Ablagerungen des Prion-Proteins selber die Zellen schädigen oder ob sie nur ein Nebenprodukt anderer pathogener Prozesse sind, ist allerdings nicht klar. In diesem Zusammenhang werden immer häufiger Intermediate auf dem Weg zur Bildung großer Aggregate bzw. Fibrillen als toxische Spezies diskutiert (vgl. Abschnitt 1.1).

Eine Isolierung und Charakterisierung von Intermediaten des Umwandlungsprozesses würde also zum einen die potentiell pathogene Form des Prion-Proteins zugänglich machen. Zum anderen ermöglicht sie neue Erkenntnisse zur Bildung und Struktur der pathogenen Isoform PrP^{Sc}, die aufgrund der Unlöslichkeit des PrP^{Sc} nicht direkt zugänglich sind.

Als System zur Induktion solcher Intermediate bietet sich das im vorigen Abschnitt beschriebene und bereits gut charakterisierte SDS-System an. Inkubation von PrP in 0.2 % SDS vermittelt PrP^C-ähnliche Eigenschaften, während eine Reduktion der SDS-Konzentration durch Verdünnen zur Wiederherstellung einiger typischer PrP^{Sc}-Eigenschaften wie Unlöslichkeit und β -Faltblatt-Struktur führt. In einer vorangegangenen Diplomarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass durch Variation der SDS-Konzentration Zwischenzustände dieses Übergangs stabilisiert werden können (Jansen, 1998).

In dieser Arbeit sollten diese Zwischenzustände genau charakterisiert werden. So stellt sich beispielsweise die Frage, wie der Zusammenhang zwischen der PrP Selbstassoziation und der Strukturumwandlung ist: Kann ein β -Faltblatt-Monomer nachgewiesen werden, d. h. funktioniert die Strukturumwandlung unabhängig von intermolekularen Wechselwirkungen? Existiert ein α -helikales Dimer, d. h. ist eine PrP-PrP Interaktion ohne Strukturänderung möglich? Gibt es eine kritische Oligomer-Größe, die zur Bildung der β -Faltblatt-Struktur mindestens erreicht werden muss (vgl. Abschnitt 1.6 zur keiminduzierten Polymerisation)?

Als Methoden zur Beantwortung dieser Fragen standen verschiedene biophysikalische Methoden wie Circular dichroismus zur Messung der Sekundärstrukturanteile und Analytische Ultrazentrifugation bzw. Größenausschlußchromatographie zur Bestimmung des Molekulargewichtes zur Verfügung. Für alle Versuche wurde rekombinantes PrP 90-231 eingesetzt, das der Sequenz des infektiösen, PK-resistenten PrP 27-30 (vgl. Abschnitt 1.3.2) entspricht, da nur so ausreichende Mengen zur Verfügung standen.

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von Strukturinformationen ergab sich im Zusammenhang mit dem Einsatz chemischer Crosslinker. Diese können nicht-kovalente Dimere bzw. Oligomere kovalent verknüpfen. Die Ermittlung der an der Verknüpfung beteiligten Proteinbereiche kann neue, detaillierte Strukturinformationen liefern, da sich die betroffenen Aminosäuren in räumlicher Nähe befinden müssen. Der genaue Abstand kann dabei je nach eingesetztem Linker variieren.

Zur Analyse der Crosslinkbereiche mussten verknüpfte Dimere in großer Menge und Reinheit präpariert werden. Durch Zerlegen in kleinere Peptide mittels Trypsin und anschließende massenspektrometrische Messungen ist die Sequenzierung des Proteins möglich, wobei Unterschiede im Peptidmuster zwischen Proben mit und ohne Crosslinker-Behandlung Aufschluß über die beteiligten Peptide liefern können. So erhaltene Strukturinformationen eignen sich zur Bestätigung von theoretischen Strukturmodellen oder als Anhaltspunkt für die Berechnung neuer Modelle.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden bei den üblichen Herstellern für Laborchemikalien bezogen und entsprechen, wenn nicht anders erwähnt, dem Reinheitsgrad *pro analysi*.

2.2 Rekombinantes Prion-Protein

Rekombinantes PrP (90-231), das der Sequenz des PrP 27-30 des Syrischen Goldhamsters *Mesocricetus auratus* entspricht (nachfolgend kurz als recPrP bezeichnet), wurde von der Arbeitsgruppe Prof. Prusiner in *E. coli* kloniert und uns als HPLC-aufgereinigtes Lyophilisat oder als renaturiertes Protein in Lösung zur Verfügung gestellt (Mehlhorn *et al.*, 1996). Das Lyophilisat wurde vor der Verwendung denaturiert und renaturiert, um das Protein in die native Struktur zu überführen (Jansen, 1998). Zur Aufbewahrung und als Stammlösung für alle Experimente wurde recPrP in 0,2% SDS und 10 mM NaP_i (s. 2.3) gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.3 Häufig verwendete Lösungen und Puffer

Zum Ansetzen von Lösungen wurde hochreines Milli-Q-Wasser, im Folgenden als H₂O_{deion} bezeichnet, verwendet (Hausanlage für deionisiertes Wasser mit nachgeschaltetem Wasseraufarbeitungssystem EPA Est. 41237-MA-1; Millipore GmbH, Neu Isenburg). Soweit möglich, wurden alle Lösungen 20 Minuten bei 121 °C sterilisiert. Lösungen, die nicht sterilisiert werden konnten, wurden durch einen 0,2 µm Membranfilter (RC58, Schleicher und Schuell, Dassel) sterilfiltriert. Hier nicht erwähnte Lösungen und Puffer werden in den Beschreibungen der entsprechenden Methoden aufgeführt.

TBST (Tris Buffer Sodium Tween)

10 mM	Tris/HCl pH 8,0
150 mM	NaCl
0,01 %	Tween 20

NaP_i

100 mM Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄) und
100 mM Natriumdihydrogenphosphat (NaH₂HPO₄)

wurden durch Mischen auf den gewünschten pH-Wert von 7,2 eingestellt. Verwendet wurde meistens eine 1:10 Verdünnung, also 10 mM Natriumphosphat, im Folgenden kurz als NaP_i bezeichnet.

Acrylamid-Stammlösung (30:0,8)

30 % Acrylamid (600 g)
0,8 % N, N -Methylenbisacrylamid (16 g)
ad 2l H₂O_{deion}

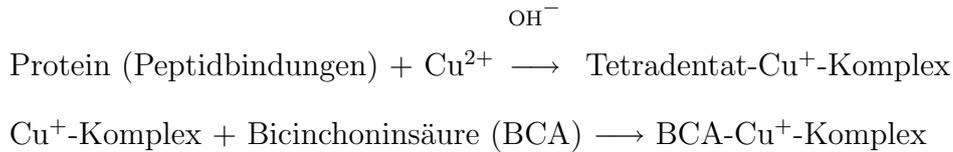
Die Lösung wurde für mindestens 30 Minuten mit Amberlite MB3 (Ionenaustauscher) gerührt, filtriert und bei 4 °C aufbewahrt.

2.4 Protein-Konzentrationsbestimmung**2.4.1 Absorptionsmessung**

Die Konzentration von Proteinen in Lösung kann spektralphotometrisch über die Extinktion bei 280 nm bestimmt werden. Die Messungen wurden mit dem Spektralphotometer DU 640 (Beckman, Palo Alto, USA) durchgeführt. Der Extinktionskoeffizient für recPrP bei 280 nm wurde anhand der Aminosäurezusammensetzung berechnet (Gill & von Hippel, 1989) und beträgt 1.496 OD_{280nm} bei 1 mg/ml recPrP. Diese Berechnung ist am genauesten für denaturiertes Protein, so dass entsprechende Messungen in 6 M Harnstoff durchgeführt wurden.

2.4.2 Mikro BCA-Test

Für diese Art der Konzentrationsbestimmung wurde der Micro BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Das Prinzip des BCA-Tests beruht auf einer Farbreaktion von Bicinchoninsäure (BCA) mit Cu⁺-Ionen. Diese entstehen durch eine vom Protein verursachte Reduktion von Cu²⁺-Ionen in alkalischer Umgebung (Biuret-Reaktion). Der gebildete BCA-Cu⁺-Komplex kann durch seine Absorption bei 562 nm nachgewiesen werden (Smith *et al.*, 1985; Wiechelman *et al.*, 1988).



Die Proteinkonzentration kann im Vergleich zu einer Eichreihe mit bekannter Proteinkonzentration anhand der Absorption bei 562 nm bestimmt werden. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber ähnlichen Verfahren wie z. B. dem Nachweis nach Bradford (1976) ist, dass die Messung auch in Anwesenheit von Detergenzien wie SDS erfolgen kann.

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Für jede Messreihe wurde zunächst eine Eichreihe mit BSA als Standardprotein und Konzentrationen von 0,5 bis 40 $\mu\text{g/ml}$ erstellt. Die zu messenden Proben wurden so verdünnt, dass sie im gleichen Konzentrationsbereich lagen. Zu je 0,5 ml Probe wurde je 0,5 ml „Working Reagent“ pipettiert, das aus 25 Teilen Reagent A (basischer Puffer), 24 Teilen Reagent B (BCA-Lösung) und 1 Teil Reagent C (Kupfersulfatlösung) bestand und jeweils frisch angesetzt wurde. Alle Proben wurden 60 min bei 60 °C inkubiert und anschließend die Absorption bei 562 nm gemessen.

2.5 Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe einer denaturierenden, diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Elektrophorese wurde wie bei Sambrook *et al.* (1989) beschrieben durchgeführt. Es wurde eine Hoefer SE 600 Gelelektrophoresekammer von Pharmacia Biotech (San Francisco, USA) mit vertikalen Plattengelen (14 x 14 x 0,15 cm) oder eine Mini-Protean II Gelkammer (Bio-Rad, München) für kleine Gele (8 x 7,3 x 0,075 cm) verwendet. Die Prozentigkeit des Acrylamids im Trenngel wurde je nach Fragestellung zwischen 12 und 18 % variiert. Die Trenngellösung wurde zwischen die Glasplatten gefüllt und mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isobutanol mit Papiertüchern abgesaugt und das Sammelgel eingefüllt. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 95 °C inkubiert und nach Abkühlen auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1 x Lämmli-Puffer mit 0,1 % SDS für 15-30 min mit 180 V und anschließend bei 300 V durchgeführt, bis die gewünschte Trennstrecke erreicht war (für kleine Gele: 15 min 100 V, dann noch ca. 30 min 200 V). Als Marker diente

für Blots ein Molekulargewichtsstandard mit vorgefärbten Eichproteinen (Rainbow Marker, Amersham Bioscience, Chalmont, GB); für Silberfärbung wurde auch ungefärbter Marker verwendet (Ultra low molecular weight marker, Sigma, San Louis, USA).

2.5.1 10 x Gelelektrophoresepuffer nach Lämmli

1,9 M Glycin (288 g)

0,25 M Tris (60 g)

ad 2l H₂O_{deion}

Der pH-Wert beträgt ca. 8,3 (nicht mit HCl einstellen!).

2.5.2 Trenngel (12 %)

380 mM Tris/HCl, pH 8,8

12 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)

0,1 % SDS

0,1 % TEMED

0,1 % APS

2.5.3 Sammelgel

124 mM Tris/HCl, pH 6,8

3 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)

0,1 % SDS

0,1 % TEMED

0,1 % APS

2.5.4 Auftragspuffer nach Lämmli

140 mM Tris/HCl, pH 6,8

10 % 2-Mercaptoethanol

4 % SDS

10 % Glycerol

1 Spatelspitze Bromphenolblau / 50 ml

2.6 Silberfärbung von Proteingelen

Mit Hilfe der Silberfärbung nach Heukeshoven & Dernick (1989) kann unter optimalen Bedingungen bis zu 1 ng Protein pro Bande nachgewiesen werden.

Fixieren:	50 % Ethanol, 10 % Essigsäure	20 min (optional ü. N.)
SDS entfernen:	10 % Ethanol, 5 % Essigsäure	10 min
Oxidieren:	0,05 % Natriumcarbonat, 0,15 % Kaliumhexacyanoferrat; 0,3 % Natriumthiosulfat	1 min
Waschen:	H ₂ O _{deion}	bis Gel nicht mehr gelb
Färben:	0,2 % Sibernitrat	20 min
Waschen:	H ₂ O _{deion}	2 x 30 s
Entwickeln:	3 % Natriumcarbonat, 0,02 % Formaldehyd (frisch zusetzen)	bis gewünschte Färbung erreicht
Stoppen:	1 % Essigsäure	mind. 15 min

2.7 Dot-Blot

Beim Dot-Blot Verfahren wird das zu untersuchende Protein direkt unter Vakuum auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran (Millipore GmbH, Neu Isenburg) übertragen. Es wurde eine Apparatur mit 96 Probenlöchern (S & S Minifold I, Schleicher & Schuell, Dassel) verwendet. Die PVDF-Membran wurde zunächst in Ethanol getränkt und anschließend zusammen mit einem Chromatographiepapier (Whatman 3MM Chr) in TBST (s. 2.3) geschwenkt. Der Aufbau bestand aus der unteren Kammer, dem Chromatographiepapier, der Membran und der oberen 96-Lochplatte. Die Proben mit einem Volumen von ca. 100 μ l wurden unter geringem Vakuum pipettiert. Es folgte ein Waschschriff mit je 100-200 μ l H₂O_{deion} bei stärkerem Vakuum. Die Detektion des Proteins erfolgte durch immunologischen Nachweis. Da der PrP-spezifische Erstantikörper 3F4 nur denaturiertes Protein erkennt, wurde die Membran vor Durchführung des immunologischen Nachweises für 5 min in 1 % KOH geschwenkt.

2.8 Semi-Dry-Blot

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung können Proteine durch dieses Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Das Gel wurde 15 min in 1 x Lämmli-puffer (s. 2.5.1) gewaschen. Die Chromatographiepapiere und die Ethanol-getränkte Membran wurden kurz in 1 x Lämmli geschwenkt. Der Aufbau in der Semi-Dry Elec-

trophoresis Transfer Cell (Bio-Rad, München) bestand aus drei Chromatographiepapieren, der Membran, dem Gel und weiteren drei Papieren. Der Transfer erfolgte für 1 Stunde bei 150 mA und max. 20 Volt (bei kleinen Gelen: 15 min 100 mA für 2 Gele).

2.9 Immunologischer Proteinnachweis

Der immunologische Nachweis von PrP erfolgte mittels des PrP-spezifischen Erstantikörpers 3F4 (Kascsak *et al.*, 1987). Die angegebenen Zeiten sind Mindestzeiten, die überschritten werden dürfen. Die freien Bindestellen für Protein auf der PVDF-Membran wurden zunächst durch Schwenken in TBST (2.3) mit 5 % Milchpulver (Frema-Reform, DE-VAU-GE, Lüneburg) für 30 min (optional über Nacht bei 4 °C) abgesättigt. Dann wurde die Membran kurz mit TBST abgewaschen und mit dem PrP-spezifischen Erstantikörper 3F4 (1:10000- Verdünnung in TBST) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert (optional ü. N. bei 4 °C). Anschließend wurde die Membran dreimal für je 5 min mit TBST gewaschen. Als Nachweisantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Schaf-anti-Maus Antikörper aus dem ECL-Western-Blot Detection System (Amersham Bioscience, Chalmont, GB) verwendet. Er wurde in einer 1:5000-Verdünnung in TBST eingesetzt, die Inkubation erfolgte für 30 min. Durch dreimaliges Waschen für jeweils 5 min wurde nicht gebundener Antikörper entfernt. Der Nachweis erfolgte durch Chemolumineszenz. Das Detektionsreagenz enthält Luminol, das von der an den zweiten Antikörper gekoppelten Peroxidase oxidiert wird. Bei dieser Reaktion wird Energie als Licht abgegeben (s. Abb. 2.8). Die Lichte-

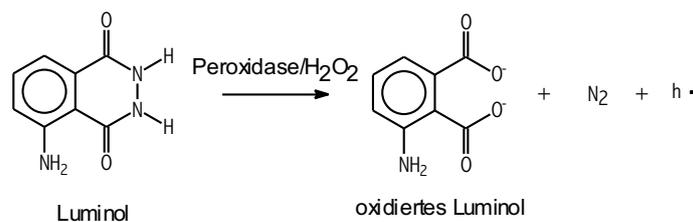


Abbildung 2.8: Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenzreaktion

mission hält etwa eine Stunde lang an. Die Membran wurde für eine Minute mit Detektionsreagenz benetzt, und die Lumineszenz wurde mit 0,5 bis fünfminütiger Expositionszeit mit Röntgenfilmen (Kodak-X-OMATTM, Sigma, St. Louis, USA) detektiert.

2.10 Löslichkeitsbestimmung durch differentielle Ultrazentrifugation

Die Proben wurden in einem Volumen von max. 100 μl für eine Stunde bei 100 000 x g (42 000 rpm im TLA-45 Rotor) und 25 °C in der Beckman Optima TM TL Ultrazentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA) zentrifugiert. Partikel, die unter diesen Bedingungen im Überstand verbleiben, gelten als löslich (Hjelmeland & Chrambach, 1984). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet im gleichen Volumen NaP_i /0,2% SDS resuspendiert. Der relative Proteingehalt in Überstand und Pellet kann z. B. durch Dot-Blot (s. 2.7) bestimmt werden.

2.11 Gelelution

Proteine, die mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, können anschließend mittels Gelelution wieder in Lösung gebracht werden. Verwendet wurde hier eine Biotrap Elektroelutionskammer (Schleicher & Schuell GmbH, Dassel). Die Elution erfolgte in 10 mM NaP_i oder 25 mM Ammoniumcarbonat pH 8,2 mit je 0,025% SDS. Während der Elutionsdauer von 4-6 Stunden (max. 100 mA, ca. 150-200 V) wurde der Puffer einmal pro Stunde ausgetauscht. Dies war erforderlich, da die verwendeten Puffer nur eine geringe Pufferkapazität aufweisen.

2.12 Circular dichroismus- (CD-) Spektroskopie

Das Meßprinzip des Circular dichroismus beruht darauf, dass asymmetrische Moleküle verschiedene Absorptionskoeffizienten für rechts- und linkszirkular polarisiertes Licht haben. Gemessen wird die Differenz dieser Absorptionskoeffizienten. Bei Proteinen wird der CD-Effekt durch asymmetrische Sekundärstruktur verursacht. Typische Sekundärstrukturelemente wie α -Helix oder β -Faltblatt zeigen jeweils unterschiedliche CD-Spektren im fernen UV-Bereich (170-260 nm, s. Abb.2.9). Durch Messung des CD-Spektrums läßt sich deshalb durch Vergleich mit Spektren von Proteinen oder Modellpeptiden bekannter Struktur auf die relativen Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente zurückschließen.

Die Messung der Spektren erfolgte mit dem Spectralpolarimeter J715 (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt). Es wurden Küvetten mit der Schichtdicke 1 mm oder Mikroküvetten mit der Schichtdicke 1 cm (Helma, Müllheim) verwendet. Für Messungen mit der 1 mm Küvette benötigt man ein minimales Probenvolumen von 180 μl bei einer Proteinkonzentration von etwa 0,05-0,2 mg/ml, d. h.

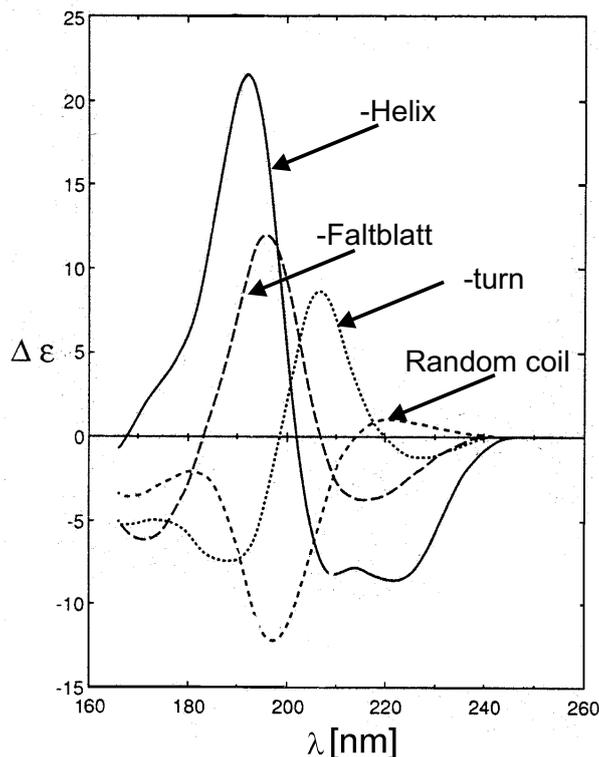


Abbildung 2.9: CD-Spektren für typische Sekundärstrukturelemente in Proteinen. Verändert nach Brahms & Brahms (1980).

3-12 μM recPrP. Die Mikroküvette erlaubt auch Messungen bei niedrigerer Proteinkonzentration und kleinerem Probenvolumen, so dass wesentlich weniger Protein eingesetzt werden muß (75 μl bei einer Konzentration von mindestens 0,015 mg/ml, d. h. 0,92 μM). Die Spektren wurden in der 1 mm Küvette bei 25 °C von 185 bis 260 nm bei einer Auflösung von 1 nm, einer Responsezeit von 1-4 s und einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min aufgezeichnet. In den Mikroküvetten ist eine Messung unter 200 nm nicht möglich.

2.13 Chemischer Crosslink von Proteinen

Proteine können durch chemische Crosslinker kovalent verknüpft werden. Bei geeigneter Wahl der Bedingungen erfolgt diese Verknüpfung nur innerhalb bereits vorhandener Proteinkomplexe, so dass nicht-kovalente Wechselwirkungen durch eine kovalente Bindung ersetzt werden und damit leichter nachgewiesen werden können.

Der Crosslinker BS³ [bis(sulfosuccinimidyl)suberate] (Pierce, Rockford, USA) bindet an freie Aminogruppen im Protein (N-Terminus oder ϵ -Aminogruppe im Ly-

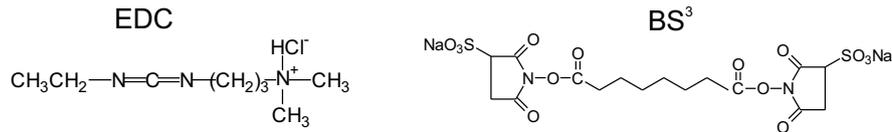


Abbildung 2.10: Strukturformeln der verwendeten Crosslinker

sin). Da er zwei aktive Succinimidylester-Gruppen besitzt, kann er zwei Aminogruppen des Proteins verknüpfen und fügt dabei einen „Spacer“ von 11,4 Å Länge ein.

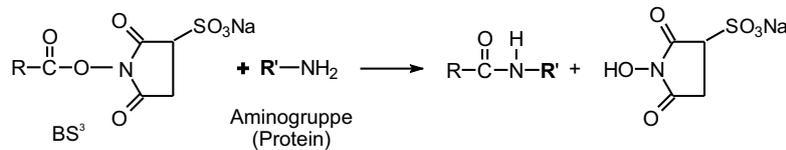


Abbildung 2.11: Reaktion der Succinimidylester-Gruppe des BS³ mit Aminogruppen

Im Gegensatz dazu bewirkt der Crosslinker EDC [1-Ethyl-3-(3-Dimethylamino-propyl) carbodiimide Hydrochloride](Pierce) die Bildung einer Isopeptidbindung zwischen Proteinseitenketten. Die Bindung erfolgt zunächst an eine Carbonsäure-

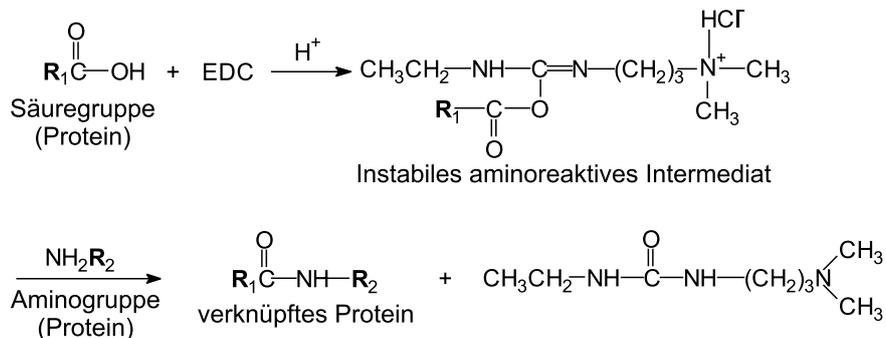


Abbildung 2.12: Durch EDC katalysierte Crosslink-Reaktion

gruppe im Protein, also Aspartat- oder Glutamat-Reste bzw. den C-Terminus. Wenn eine Aminogruppe des Proteins sich in räumlicher Nähe befindet, also als Reaktionspartner zur Verfügung steht, entsteht eine neue Isopeptidbindung zwischen Säuregruppe und Aminogruppe, wobei der Crosslinker wieder vollständig entfernt

wird. Falls keine Aminogruppe zur Verfügung steht, reagiert der Crosslinker mit Wasser ab, so dass die Säuregruppe wiederhergestellt wird. Da die eingefügte Bindung direkt innerhalb des Proteins entsteht, spricht man von 0 Å Spacerlänge.

EDC und BS³ wurden als Feststoff in kleinen Aliquots abgewogen und eingefroren, um eine Anreicherung von Kondenswasser im Gefäß zu verhindern, da dies eine Inaktivierung des Crosslinkers zur Folge haben kann. Direkt vor Beginn der Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser eine 20-100fach konzentrierte Stammlösung angesetzt und davon die gewünschte Menge zum Reaktionsansatz pipettiert. Das Protokoll für BS³ wurde im Wesentlichen vom Hersteller übernommen: RecPrP in einer Konzentration von 0,05-0,1 mg/ml in NaP_i wurde eine halbe Stunde bei 25 °C mit 0,5-2 mM BS³ inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/20 Volumen 0,5 M Tris/HCl pH 7 gestoppt. Die freie Aminogruppe des Tris reagiert dabei mit dem Überschuss an BS³.

Die Bedingungen für den EDC-Crosslink wurden im Rahmen einer Diplomarbeit etabliert (Kaimann, 2002). Es zeigte sich, dass die Reaktion mit einer leicht erhöhten EDC-Konzentration auch bei neutralem pH abläuft. Alle Reaktionen wurden in NaP_i mit SDS-Konzentrationen zwischen 0,2 und 0,01 % durchgeführt. Es wurden je 0,1 mg/ml/μl PrP (ca. 6 μM) und 1 mM EDC eingesetzt und der Ansatz für 2 h bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Kochen in Auftragspuffer oder 0,2 % SDS (je 5 min 95 °C) abgestoppt.

2.14 Chromatographische Methoden

Für alle chromatographischen Trennungen wurden die verwendeten Lösungen durch Filtration partikelfrei gemacht und vor Benutzung entgast. Es wurde eine HPLC-Anlage bestehend aus zwei Pumpen mit nachgeschaltetem Mischer (Beckman, Palo Alto, USA) und ein UV/VIS Detektor (Knauer GmbH, Berlin) verwendet. Die Signale des Detektors wurden über einen A/D Wandler in einen Computer eingelesen und dort ausgewertet.

2.14.1 Größenausschluss-Chromatographie

Proteine können mit dieser Methode nach ihrer Größe getrennt werden. Das verwendete Säulenmaterial besteht aus porösen Kügelchen. Große Moleküle können nicht in die Poren dieser Kügelchen eindiffundieren und werden deshalb weniger stark verzögert als kleinere Moleküle. Im Gegensatz zur Gelelektrophorese ist dabei eine

Denaturierung nicht erforderlich, so dass auch nicht-kovalente Wechselwirkungen erhalten bleiben. Es wurde eine Bio-Select 400-5 Säule mit einem vom Hersteller angegebenen Trennbereich von 20-1000 kDa verwendet (Bio-Rad, München). Zur Ermittlung der Molekulargewichte wurde eine Mischung aus Proteinen bekannter Größe verwendet (Gel Filtration Standard, Bio-Rad, München).

2.14.2 Reversed phase Chromatographie

Hier erfolgt die Trennung aufgrund der unterschiedlichen Hydrophobizität der zu trennenden Moleküle, wobei hydrophile Moleküle als erstes eluiert werden. Zur Trennung von Peptidgemischen wurde eine Nucleosil 300-5 C18 Säule (Macherey & Nagel GmbH, Düren) verwendet. Die Elution erfolgte mittels eines Acetonitril/Wasser-Gradienten (genaue Bedingungen s. Ergebnisteil).

Puffer A: 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)

Puffer B: 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) / 80 % Acetonitril

2.15 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

Durch analytische Ultrazentrifugation können Molekülparameter wie das Molekulargewicht in wässriger Lösung bestimmt werden. Die Versuche wurden mit der analytischen Ultrazentrifuge XL-A (Beckman Inc., Palo Alto, USA), ausgerüstet mit einer UV/VIS Absorptionsoptik, durchgeführt. Die Zentrifugation erfolgte in einem 4-Loch An-60 Ti-Rotor (Beckman) und Standard Doppelsektorzellen mit kohlegefüllten Epon-Mittelstücken und einer optischen Weglänge von 1,2 cm. Alle Messungen wurden mit der Software UltrascanII Version 5.0 für Linux (Borries Demeler) ausgewertet.

2.15.1 Sedimentations-Diffusions-Gleichgewichtslauf (M-Lauf)

Mit dieser Methode kann das Molekulargewicht eines Moleküls bestimmt werden. Die Drehzahl für die Zentrifugation wird so gewählt, dass sie nicht ausreicht, um das zu untersuchende Molekül zu sedimentieren. Unter diesen Bedingungen stellt sich nach einiger Zeit ein Gleichgewicht zwischen Sedimentation und Rückdiffusion ein. Im Gleichgewicht erhält man also ein zeitunabhängiges Konzentrationsprofil über die Zelle mit hoher Konzentration am Boden und niedriger Konzentration am Meniskus: Die Konzentration steigt exponentiell mit dem Quadrat des Radius an. Die Steilheit

des Profils hängt u. a. von der Drehzahl und vom Molekulargewicht des untersuchten Moleküls ab. Das Molekulargewicht kann unabhängig von der Form des Moleküls aus dem Konzentrationsprofil bei einer geeigneten Drehzahl ermittelt werden. Wenn nur eine Molekülspezies vorhanden ist und die Lösung keine Abweichung vom idealen Verhalten zeigt, ergibt sich bei einer Auftragung des Logarithmus der Konzentration bzw. der Absorption, $\ln A$, gegen das Quadrat des Radius, r^2 , eine Gerade, aus deren Steigung das Molekulargewicht nach folgender Formel berechnet werden kann:

$$M = \frac{d \ln A}{dr^2} \cdot \frac{2RT}{(1 - \bar{v}_M \cdot \rho_L) \cdot \omega^2}$$

M	=	Molekulargewicht des Moleküls
$d \ln A / dr^2$	=	Ableitung der Absorption gegen das Quadrat des Radius bzw. Steigung der Ausgleichsgeraden
R	=	Ideale Gaskonstante ($8.3144 J \cdot mol^{-1} K^{-1}$)
T	=	Temperatur in Kelvin
\bar{v}_M	=	partielles spezifisches Volumen des Moleküls
ρ_L	=	Dichte des Lösungsmittels
ω	=	Winkelgeschwindigkeit $2\pi \cdot rpm/60$ [1/s]

Für recPrP90-231 wurde \bar{v} aufgrund der Aminosäuresequenz berechnet (Cohn & Edsall, 1943) und beträgt $0,7082 \text{ cm}^3/\text{g}$. Für die Molekulargewichtsbestimmung von recPrP erfolgte die Zentrifugation bei Drehzahlen zwischen 15 000 und 40 000 rpm und 25°C . Bei jedem Lauf wurden mehrere Drehzahlen eingestellt und ausgewertet. Die Scans für die niedrigste Drehzahl wurden nach 20 Stunden aufgenommen, für alle weiteren Drehzahlen wurde noch je 10 Stunden nach Erhöhung der Drehzahl gewartet, um die Einstellung des Gleichgewichtes zu gewährleisten. Das Erreichen des Gleichgewichtes wurde überprüft, indem jeweils eine Stunde nach der ersten Messung erneut Scans aufgezeichnet wurden. Die Abweichungen zwischen diesen beiden Messungen muss im Bereich des statistischen Rauschens liegen.

2.15.2 Sedimentations-Geschwindigkeits-Lauf (S-Lauf)

Bei dieser Art der Zentrifugation wird die Drehzahl so hoch gewählt, dass die betrachteten Moleküle sedimentiert werden können. Wird eine Lösung zentrifugiert, in der ein Makromolekül zu Beginn gleichmäßig verteilt war, so beobachtet man die Ausbildung einer Grenzschicht. Im Idealfall, ohne Berücksichtigung der Diffusion, ist die Konzentration der Makromoleküle zwischen Meniskus und Grenzschicht gleich Null, zwischen Grenzschicht und Boden dagegen konstant. Die Grenzschicht wandert im Verlauf der Zentrifugation in Richtung Boden, bis schließlich alle Moleküle sedi-

mentiert sind. Durch Diffusion kommt es zu einer Verbreiterung der Grenzschicht. Für die Bestimmung des Grenzschicht-Radius wird der Wendepunkt bzw. die halbe Höhe zugrunde gelegt.

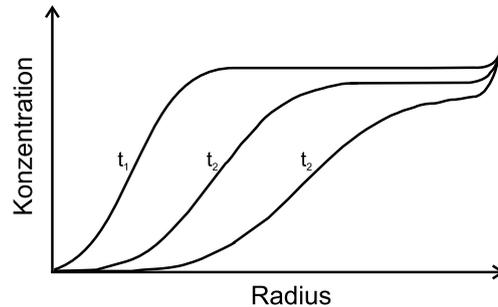


Abbildung 2.13: Änderung des Konzentrationsprofils während eines S-Laufs Es sind exemplarisch typische Profile für drei verschiedene Zeitpunkte gezeigt.

Aus der Wanderung der Grenzschicht läßt sich der Sedimentationskoeffizient oder s-Wert ermitteln. Dieser ist folgendermassen definiert:

$$s = \frac{v}{\omega^2 r} = \frac{M(1 - \bar{v}\rho_L)}{f}$$

M	=	Molekulargewicht des Moleküls
\bar{v}	=	partielles spezifisches Volumen des Moleküls
ρ_L	=	Dichte des Lösungsmittels
f	=	Reibungskoeffizient oder Formparameter
v	=	Geschwindigkeit des Moleküls
ω	=	Winkelgeschwindigkeit
r	=	Radius

Der Sedimentationskoeffizient bzw. s-Wert eines Moleküls gibt seine Geschwindigkeit pro Einheits-Zentrifugalbeschleunigung an. Er ist u. a. abhängig vom Molekulargewicht und der Form des betrachteten Teilchens. Bei bekannter Form (z. B. Kugel) kann aus dem s-Wert das Molekulargewicht berechnet werden. Der Berechnung des s-Wertes anhand der Wanderung der Grenzschicht liegt folgende Formel zugrunde:

$$\ln[r_G(t)/r_G(t_0)] = s\omega^2(t - t_0)$$

$r_G(t_0)$	=	Radius der Grenzschicht zum Zeitpunkt t=0
$r_G(t)$	=	Radius der Grenzschicht zum Zeitpunkt t
s	=	s-Wert (Svedberg-Konstante) [10^{-13} s]
ω^2	=	Winkelgeschwindigkeit [$1/s$]

Eine Auftragung von $\ln(r_G)$ gegen die Zeit ergibt demzufolge eine Gerade mit der Steigung $s\omega^2$. Die Auswertesoftware benutzt stattdessen die dc/dt -Methode nach (Stafford, 1992), bei der alle Messpunkte in die Auswertung eingehen: Zunächst wird die Differenz zwischen je zwei aufeinanderfolgenden Scans gebildet. Dies entspricht mathematisch einer Ableitung nach der Zeit. Eine solche Differenzkurve hat ihr

Maximum im idealen Fall auf halber Höhe der Grenzschicht, da dort die Differenz maximal ist (s. Abb. 2.13). Diese Kurve in Abhängigkeit vom Radius kann direkt in eine s -Wert abhängige Kurve umgerechnet werden, indem für jeden Radiuswert ein apparenter s -Wert nach obiger Formel berechnet wird. Dies entspricht einer durch zwei Punkte gelegten Gerade, wobei $r_{Meniskus}$, also der Fall $t=0$, als erster Punkt zugrundegelegt wird. Die resultierenden Kurven werden gemittelt, und es ergibt sich die Auftragung einer relativen Intensität gegenüber dem s -Wert, deren Maximum dem gesuchten s -Wert entspricht. Die s -Wert-Bestimmung von recPrP Oligomeren erfolgte bei einer Drehzahl von 40 000 rpm und 25 °C.

2.16 Charakterisierung von Proteinen und Peptiden mittels Massenspektrometrie

Das Prinzip der Massenspektrometrie ist die Messung des Verhältnisses Masse zu Ladung (m/z) von Ionen in der Gasphase. Diese Methode hat in den letzten Jahren zunehmende Bedeutung für die Analyse von Proteinen erlangt (zum Überblick s. Jonsson (2001)). Dies ist unter anderem der Entwicklung sogenannter weicher Ionisierungsmethoden wie ESI (Elektro Spray Ionisierung, s. Abb. 2.14) und MALDI (Matrix Assistierte Laser Desoptions Ionisierung) zu verdanken. Sie ermöglichen die Überführung großer, labiler Biomoleküle in die Gasphase, ohne sie zu fragmentieren.

Mittels Nanospray-ESI ist eine Messung von Probenvolumina unter 1 μl möglich. Die Probe befindet sich dabei in einer dünnen Glaskapillare (Nadel), die mit Metall dünn bedampft ist. Zwischen dieser Metallschicht und dem Einlass des Massenspektrometers wird eine Spannung angelegt. Im sogenannten Positiv-Mode werden dabei negative Ionen an der Anode entladen, während positive sich am Meniskus sammeln. Dieser wird destabilisiert, und ein Nebel aus feinen Tröpfchen entsteht. Durch Verdunsten des Lösungsmittels werden diese Tröpfchen immer kleiner, bis schließlich einzelne Gasphase-Ionen entstehen (s. Abb. 2.14). Bei der Ionisation durch ESI entstehen im Gegensatz zu MALDI mehrfach geladene Ionen. Aus einer einzelnen Molekülart können deshalb mehrere Peaks mit unterschiedlicher Ladung entstehen. Bei ausreichender Auflösung können die Ladungen jedoch aufgrund des Isotopenmusters folgendermaßen bestimmt werden (s. Abb. 2.15). Natürlich vorkommende schwerere Isotope der einzelnen Elemente sind in statistischer Verteilung in die Analytmoleküle eingebaut. Als monoisotopische Masse eines Elements oder Moleküls be-

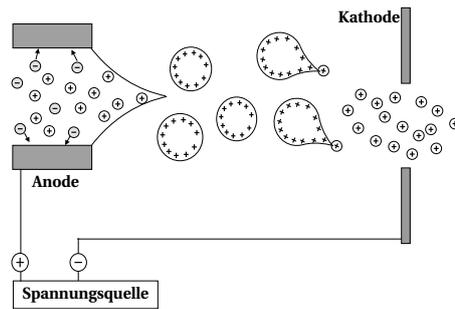


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung des Elektrospray-Prozesses (nach Kebarle & Tang (1993))

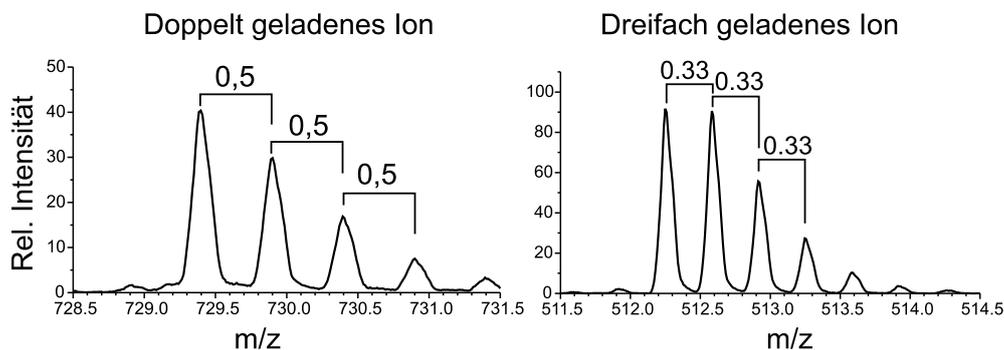


Abbildung 2.15: Beispiele für die Isotopenverteilung von zweifach und dreifach geladenen Ionen. Gezeigt sind hier beispielhaft zwei bei Vedau mit Trypsin entstandene Peptide des rekombinanten Prion-Proteins.

zeichnet man die Masse des leichtesten stabilen Isotops. Als Element mit natürlich vorkommendem schwererem Isotop ist bei Proteinen v. a. ^{13}C von Bedeutung. Bei Messung der Masse eines Peptids bekommt man also ein Signal für die monoisotopische Masse, eins für die monoisotopische Masse + 1 (Einbau eines ^{13}C -Atoms) usw. Im Spektrum ist dieser Massenunterschied von einer Masse sichtbar. Aus der Massendifferenz zwischen den Peaks für die einzelnen Isotope läßt sich die Ladung berechnen: So beträgt sie für ein doppelt geladenes $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ -Ion $1/2=0,5$, für ein dreifach geladenes $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}$ dagegen $1/3=0,33$.

Bei Proteinen gilt dabei, dass bis etwa 1500 Da Molekulargewicht das monoisotopische Signal am stärksten ist, bei größeren Massen dagegen schwerere Isotope überwiegen (Jonsson, 2001).

Ein Massenspektrometer besteht im Wesentlichen aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Dabei können im Prinzip die Ionenquel-

len bzw. Ionisierungsarten und Analysatoren frei kombiniert werden. Der Einsatz mehrerer Massenanalysatoren, wie z. B. Quadrupol und TOF (Flugzeit oder **T**ime-**O**f-**F**light) Analysatoren, ermöglicht dabei die sogenannte MS/MS oder Tandem Massenspektrometrie. Aus einem komplexen Substanzgemisch können mit dieser Methode einzelne Produkt-Ionen (product ions) selektiert werden. In einer Kollisionszelle werden diese durch Kollision mit inerten Gasmolekülen (N_2) fragmentiert. Die entstandenen Fragmente werden mit Hilfe des zweiten Analysators analysiert. Abb. 2.16 zeigt schematisch den Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Q-Star Pulsar I Massenspektrometers (MDS Sciex, Toronto, Kanada).

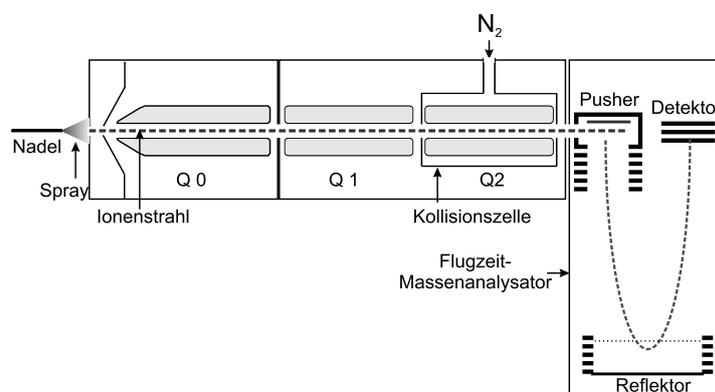
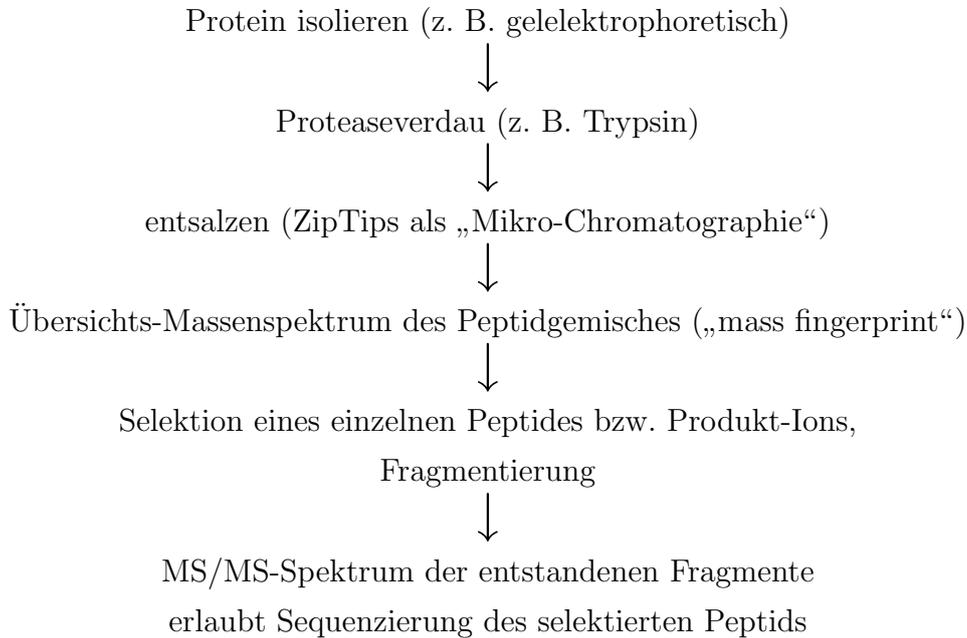


Abbildung 2.16: Schematischer Aufbau des Q-Star Massenspektrometers Einzelheiten s. Text.

Als Ionenquelle dient eine Nanospray-Nadel, so dass Messungen mit Probenvolumina unter $1 \mu\text{l}$ möglich sind. Das Gerät besitzt insgesamt drei Quadrupole. Davon dient nur Q1 als Massenanalysator im eigentlichen Sinne, während Q0 und Q2 hauptsächlich dazu dienen, den Ionenstrom durch das Gerät zu stabilisieren. Hinter Q1 befindet sich die sogenannte Kollisionszelle. Hier können Produkt-Ionen durch Zusammenstöße mit inerten Stickstoff-Molekülen fragmentiert werden. Als zweiter Analysator dient ein orthogonales TOF. Für die Messung von Übersichtsspektren eines Gemisches werden Quadrupole und Kollisionszelle so geschaltet, dass sie die Ionen auf einer stabilen Flugbahn halten, und die eigentliche Massenanalyse erfolgt mit dem TOF Analysator. Soll dagegen nur ein einzelnes Vorläufer-Ion analysiert werden, so kann dieses mit Hilfe des Q1 selektiert und anschließend in der Kollisionszelle fragmentiert werden. Die entstandenen Fragmente werden dann vom TOF Analysator detektiert (MS/MS-Analyse).

Die Sequenzierung von Proteinen mittels ESI-MS/MS oder PSD-MALDI (PSD: engl. post source decay; Zerfall nach der Quelle) ist mittlerweile eine Routinemethode geworden. Der Ablauf kann dabei wie folgt aussehen:



Wenn die Aminosäuresequenz des untersuchten Proteins bekannt ist, kann mit diesem Prinzip nach posttranslationalen oder auch chemisch eingeführten Modifikationen gesucht werden. Die eigentliche Sequenzierung der Peptide erfolgt anhand der MS/MS-Spektren. Abb. 2.17 zeigt die Fragmente, die bei PSD-MALDI oder in der Kollisionzelle eines MS/MS-Gerätes (auch CID, **C**ollision **I**nduced **D**issociation genannt) entstehen können.

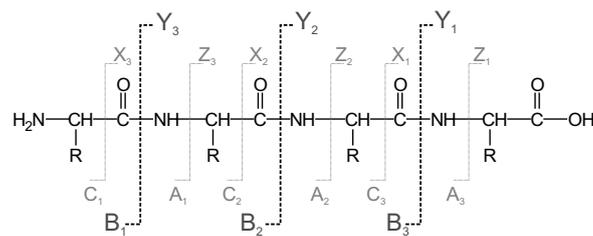


Abbildung 2.17: Nomenklatur von Peptidfragmenten Bei der Fragmentierung in der Kollisionzelle können unterschiedliche Fragmentationen entstehen. Die Benennung orientiert sich an Roepstorff (1984); Johnson *et al.* (1988).

Bei der Spaltung an einer Stelle kann entweder nur eines oder beide der entstandenen Fragmente sichtbar sein, abhängig davon, ob beide eine Ladung tragen oder

nur eines. Nach Trypsin-Verdau und bei sauren Lösungsbedingungen (Messung im Positiv-Mode) ist normalerweise die Y-Serie dominant, da die Spaltprodukte alle basische Lysin- oder Argininreste am C-Terminus besitzen, die bevorzugt Protonen anlagern können. Wenn alle Y-Ionen vorhanden sind, kann aus den Massendifferenzen zwischen den einzelnen Signalen dieser sogenannten Y-Serie die Aminosäuresequenz ermittelt werden. Auch das Auffinden einer Teilsequenz ist hilfreich. Bei unbekanntem Proteinen kann die Identifizierung durch Suchen eines solchen „Sequence-tags“ in einer Protein- oder Nukleinsäure-Datenbank erfolgen. Handelt es sich um eine bekannte Sequenz und soll z. B. nach posttranslationalen Modifikationen gesucht werden, so reichen 3-4 Aminosäuren in der Regel aus, um eine eindeutige Zuordnung zu einem bestimmten tryptischen Fragment zu ermöglichen.

3 Ergebnisse

Die Strukturumwandlung als entscheidender Schritt bei der Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} kann mit dem in Abschnitt 1.8 beschriebenen *in vitro* Konversionssystem induziert werden. Um Intermediate dieses Übergangs zu finden, sollte zunächst diese Strukturumwandlung von PrP mit hauptsächlich α -helikaler Struktur in PrP mit erhöhtem Anteil an β -Faltblatt-Struktur genau verfolgt werden. Zu diesem Zweck wurde die Änderung der Sekundärstruktur des PrP nach Inkubation in SDS-Konzentrationen zwischen 0,2 und 0,01 % mittels Circular-Dichroismus bestimmt.

3.1 Struktur von recPrP in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration

Das in dieser Arbeit verwendete *in vitro*-Konversionssystem nutzt die Änderung der Struktur und des Aggregationszustandes des Prion-Proteins in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration. Das Protein wird dabei zunächst in 0,2 % SDS inkubiert, wobei die Struktur α -Helix- und random coil-Anteile zeigt. Verdünnen des SDS auf 0,01 % induziert einen höheren Anteil an β -Faltblatt-Struktur und Aggregation. Die Sekundärstrukturänderung kann mittels Circular-Dichroismus bestimmt werden.

Abb. 3.18 zeigt typische Spektren für ausgewählte SDS-Konzentrationen. Das Ausgangsmaterial in 0,2 % SDS zeigt einen etwas höheren Anteil an random coil im Vergleich zum Spektrum bei 0,06 %, wie an dem etwas stärkeren Minimum bei 222 nm für 0,06 zu erkennen ist. Bei 0,02 % wird ein Spektrum mit erhöhtem β -Faltblatt-Anteil beobachtet, das nur ein Minimum bei 218 nm aufweist. Die Intensität eines typischen β -Faltblatt-Spektrums sollte dabei eigentlich geringer sein als die eines α -helikalen Spektrums. Das ist hier nicht der Fall, jedoch läßt das Spektrum in 0,02 % von seiner Form her deutlich auf einen hohen β -Faltblatt-Anteil schließen. Offensichtlich handelt es sich bei dem beobachteten Strukturübergang also weniger um eine Umfaltung als vielmehr um die Bildung neuer Strukturelemente.

Um aus den Spektren die prozentualen Anteile einzelner Strukturelemente zu berechnen und damit eine Quantifizierung zu ermöglichen, ist eine exakte Konzentrationsbestimmung notwendig. Deshalb wurden in mehreren unabhängigen Messungen zunächst die CD-Spektren gemessen und anschließend für jede Probe die Proteinkonzentration mittels Mikro-BCA-Assay bestimmt. Die in Abb. 3.18 gezeigten Spektren entsprechen bis auf die Probe bei <0,01 % dem Mittel von 2-4 Experimenten. Die Reproduzierbarkeit der Konzentrationsbestimmung war für die Proben bei 0,2 %

SDS sehr gut. Da das CD-Signal nach dem Lambert-Beerschen Gesetz konzentrationsabhängig ist, kann das gezeigte Spektrum bzw. das charakteristische Minimum bei 206-207 nm bei weiteren CD-Messungen als Standard zur Konzentrationsbestimmung genutzt werden:

$$\begin{aligned}\Theta_{MRW}(206nm) &\equiv 9175 [deg \cdot cm^2/dmol] \\ 0,1 mg/ml &\equiv -7,7 mdeg \text{ bei } 206 \text{ nm (Schichtdicke } 1 \text{ mm)} \\ &\text{für recPrP 90-231 in } 0,2\% \text{ SDS}\end{aligned}$$

In niedrigeren SDS-Konzentrationen nimmt die Löslichkeit des Proteins ab, was zu Schwierigkeiten bei der Konzentrationsbestimmung führt. Die Intensität des Spektrums in 0,02 % SDS kann deshalb nicht ganz so genau bestimmt werden, womit ein größerer Fehler bei der Berechnung der Strukturanteile in Kauf genommen werden muss. In Abb. 3.18 ist zusätzlich beispielhaft ein Spektrum für stark aggregiertes PrP gezeigt ($\leq 0,01\%$ SDS). Die Signalintensität kann hier sehr unterschiedlich sein, je nachdem, wie weit die Aggregation vorangeschritten ist. Eine Berechnung von Strukturanteilen ist nicht mehr möglich. Charakteristisch für solche aggregierten Proben ist das einzelne Minimum bei ca. 222 nm. Auch für nicht in SDS inkubiertes

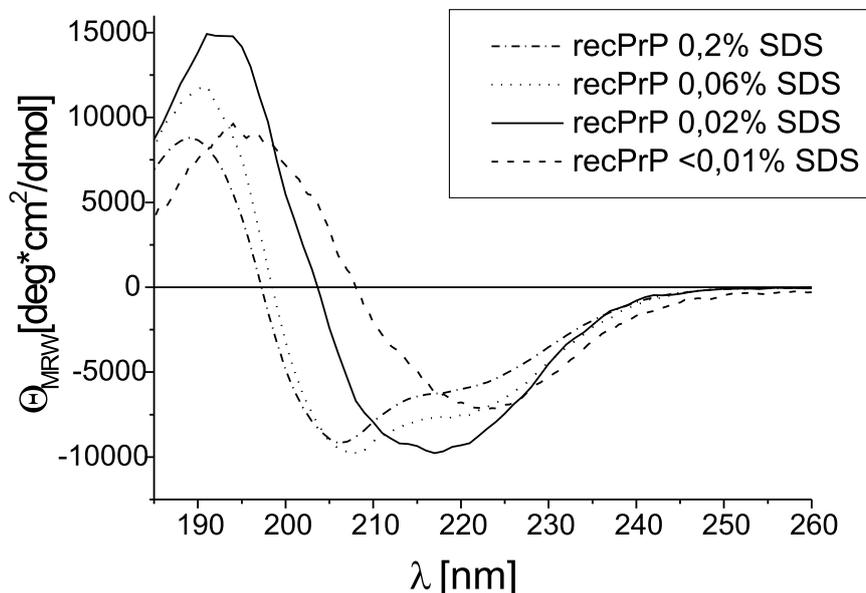


Abbildung 3.18: Struktur von recPrP in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration. Es sind CD-Spektren des Proteins in den angegebenen SDS-Konz. gezeigt. Das Spektrum für $< 0,01\%$ SDS ist ein Beispiel für stark aggregiertes recPrP.

Tabelle 4: Berechnung der Sekundärstrukturanteile für recPrP in verschiedenen SDS-Konzentrationen. Die Rechnung erfolgte mit dem Programmpaket CDPro (Sreerama *et al.*, 1999) und dem Programm CDSSTR (Johnson, 1999).

% SDS	α -Helix	β -Faltblatt	β -Kehre	Ungeordnet	Σ
0,2	17,6	21,5	17,9	41,7	98,7
0,06	22	20,5	17,8	38,9	99,2
0,02	19,9	31,5	20,7	27,9	100

PrP gestaltete sich eine genaue Konzentrationsbestimmung als unreproduzierbar, da dieses Material ebenfalls nicht gut löslich ist.

Zur Berechnung der relativen Strukturanteile (s. Tab. 4) wurde das Programm CDSSTR (Sreerama *et al.*, 1999) aus dem Paket CDPro verwendet (Johnson, 1999), wobei eine Proteindatenbank zugrunde gelegt wurde, die auch denaturierte Proteine enthält. Wie bereits aufgrund der Spektren vermutet, bewirkt das Ausdünnen des SDS hauptsächlich die Abnahme von random-coil-Struktur zugunsten einer Zunahme an β -Faltblatt-Struktur. Die Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Test beinhaltet eine unvermeidbare Ungenauigkeit, da nicht genug recPrP zur Erstellung der Eichreihen zur Verfügung stand und daher BSA als Eichstandard verwendet wurde. Aufgrund der diskutierten Schwierigkeiten sind die ermittelten Strukturanteile nur ein Anhaltspunkt und keine Absolutwerte.

Um den Übergang zur β -Faltblatt-reicheren Struktur genau zu verfolgen, wurden Spektren in verschiedenen SDS-Konzentrationen zwischen 0,2 und 0,005 % gemessen. Um das Erreichen eines Gleichgewichtes für Struktureinstellung und Aggregation zu gewährleisten, wurden die Messungen mindestens 16 Stunden nach Verdünnen des SDS durchgeführt. Eine geeignete Auftragung für den Verlauf dieses Übergangs ist der Quotient der Minima der beiden Strukturen, da dabei geringe Konzentrationsunterschiede herausgerechnet werden. Das Ausgangsmaterial in 0,2 % SDS hat ein Minimum bei 206-207 nm, das sich beim Verdünnen auf etwa 0,06 % zu 208 nm verschiebt. Dagegen hat β -Faltblatt-reiches, unlösliches PrP ein Minimum bei 218 nm. Eine Auftragung des Quotienten der CD-Signale bei 218 nm und 207 nm gegen die SDS-Konzentration wurde gewählt, um den Verlauf des Übergangs darzustellen, wobei ein größerer Wert des Quotienten auf einen höheren β -Faltblatt-Anteil schließen lässt. Eine solche Übergangskurve ist in Abb. 3.19 dargestellt.

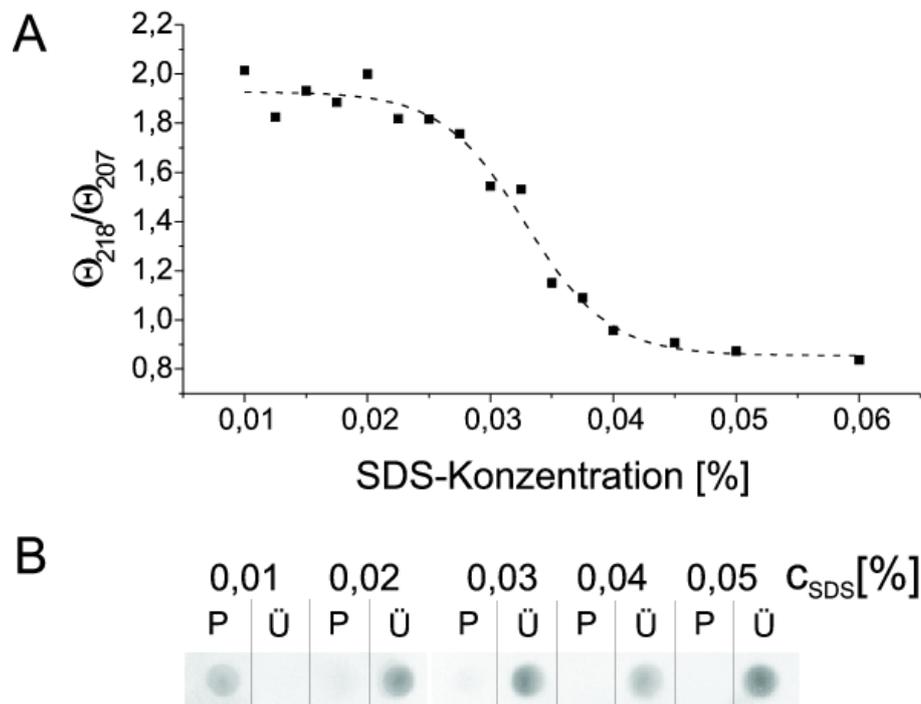


Abbildung 3.19: Strukturübergang von α -Helix zu β -Faltblatt und Löslichkeit von recPrP im SDS-System. A. Der Strukturübergang zu höherem β -Faltblatt-Anteil ist als Quotient der Minima im CD-Spektrum bei 218 und 207 nm dargestellt, wobei ein höherer Wert einem höheren β -Faltblatt-Anteil entspricht.

B. Die Löslichkeit der Proben wurde durch differentielle Ultrazentrifugation ermittelt, wobei der relative Proteinanteil in Überstand(Ü) und Pellet(P) mittels Dot-Blot und immunologischer Detektion ermittelt wurde.

Neben dem Strukturübergang ist für einige SDS-Konzentrationen die mittels differentielle Ultrazentrifugation und Dot-Blot ermittelte Löslichkeit gezeigt. Man sieht, dass es einen SDS-Konzentrationsbereich gibt (hier: 0,02-0,025 %), bei denen bereits die β -Faltblatt-Struktur erreicht ist, das Protein jedoch noch löslich bleibt. Es ist also gelungen, einen stabilen „löslichen β -Faltblatt-Zustand“ des PrP zu isolieren, der über längere Zeit stabil (löslich) bleibt.

3.1.1 Standardisierung anhand der CD-Übergangskurve

Der Verlauf der Übergangskurve und das Phänomen des löslichen β -Faltblatt-Zustandes sind hervorragend reproduzierbar. Allerdings kann die Lage (SDS-Konz.) des Übergangs je nach Aufarbeitung und Vorbehandlung des verwendeten recPrP um 0,01-0,02 % schwanken. Um die Reproduzierbarkeit so groß wie möglich zu machen, wurden die Proben immer bei genau 25 °C für mindestens 16 h inkubiert, bevor

die Spektren gemessen wurden. Für weitere Experimente, bei denen die Struktur bzw. die Lage im Übergangsbereich genau bekannt sein musste, wurde jedesmal die Übergangskurve für die verwendeten Proben bestimmt. Es zeigte sich dabei, dass andere Parameter wie z. B. die Oligomergröße sehr gut mit der anhand der CD-Kurve ermittelten Struktur korrelierten, die genauen SDS-Konzentrationen jedoch leichten Schwankungen unterworfen sind.

Wenn der erwähnte lösliche β -Faltblatt-Zustand untersucht werden sollte, wurde die höchste SDS-Konzentration eingesetzt, bei der das Protein die β -Faltblatt-Struktur zeigte, wobei die SDS-Konzentration je nach Experiment leicht verschieden war.

3.2 Kinetik der Struktureinstellung

Für das Ausgangsmaterial in 0,2 % SDS und für aggregiertes PrP in 0,01 % SDS ist bekannt, dass der Strukturübergang schnell erfolgt (Post *et al.*, 1998). Um herauszufinden, ob dies auch für die mittleren SDS-Konzentrationen, also für den Übergangsbereich, der Fall ist, wurden CD-Spektren zum einen sofort nach Verdünnen und zum anderen nach ü. N. Inkubation bei 25 °C gemessen. Abb. 3.20 zeigt entsprechende Übergangskurven, die wieder als Quotient der Minima bei 218 bzw. 207 nm dargestellt sind. Es wird deutlich, dass für mittlere SDS-Konzentrationen die Struktur nach Einstellung des Gleichgewichtes am stärksten von der sofort beobachteten Struktur abweicht. Bei höheren SDS-Konzentrationen (hier: $\geq 0,04$ %) ist keine Änderung der Struktur zu beobachten, während bei niedrigen SDS-Konzentrationen (hier: $\leq 0,01$ %) die Struktureinstellung zum größten Teil innerhalb der Zeit erfolgt, die bis zur ersten Messung vergeht (≥ 1 Minute). Nur bei mittleren SDS-Konzentrationen ist die Kinetik der Struktureinstellung langsam, d. h. im Stundenbereich.

Abb. 3.21A zeigt Spektren für eine solche mittlere Konzentration (hier: 0,0275 % SDS) und eine Proteinkonzentration von 20 ng/ μ l. Im Vergleich zu Abb. 3.20 wurde hier Material aus einer anderen PrP-Aufarbeitung verwendet, so dass die SDS-Konzentration für den Übergangsbereich leicht verschoben ist. Um die Kinetik verfolgen zu können, wurden nach Verdünnen Spektren im Abstand weniger Minuten aufgezeichnet. Die Zunahme an β -Faltblatt-Struktur ist anhand des Quotienten in Abb. 3.21B dargestellt. Das Erreichen der β -Faltblatt-Struktur und die Einstellung des Gleichgewichtes erfolgt im Verlauf mehrerer Stunden. Bei höheren Proteinkon-

zentrationen beschleunigt sich dieser Prozess (Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, dass der Übergang mit einer Aggregation verbunden ist.

Der in Abschnitt 3.1 beschriebene „lösliche β -Faltblatt-Zustand“ findet sich genau bei den hier beschriebenen mittleren SDS-Konzentrationen, d. h. die Struktureinstellung erfolgt langsam. Hier liegt ein Zwischenzustand vor, der zunächst noch die α -helikale Struktur zeigt, sich im Verlauf einiger Stunden aber zur β -Faltblatt-Struktur umfaltet. Nach Erreichen der endgültigen Struktur bleibt dieser Zustand des löslichen β -Faltblatt für mindestens ein bis zwei Wochen stabil.

Die Kinetikmessungen zeigen, dass die Struktureinstellung des recPrP nach einigen Stunden ein Gleichgewicht erreicht hat. Nach ü. N. Inkubation kann man deshalb davon ausgehen, dass sich die Struktur nicht mehr ändert.

3.3 Vernetzung von PrP Dimeren und Oligomeren mittels chemischer Crosslinker

Um herauszufinden, welche Intermediate bei dem beschriebenen Strukturübergang entstehen bzw. welches Molekulargewicht sie haben, wurden verschiedene chemische Crosslinker getestet. Dabei handelt es sich um reaktive Moleküle, die neue kovalente

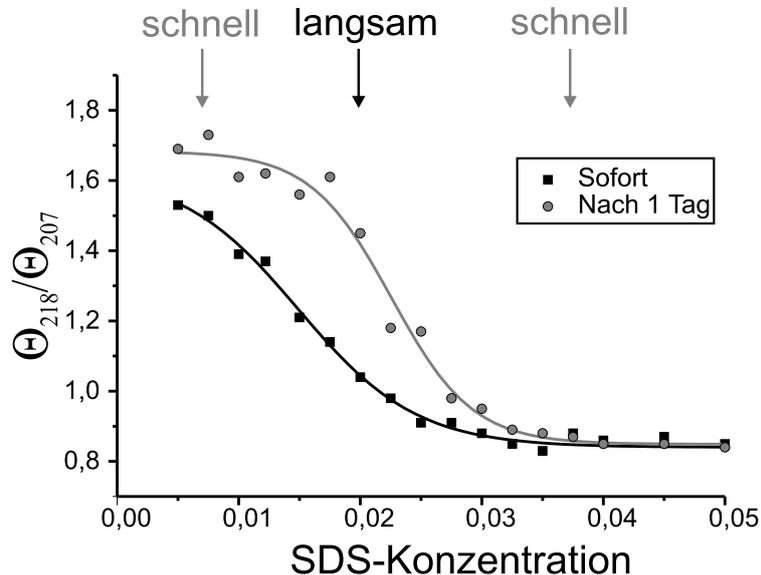


Abbildung 3.20: Langsame Struktureinstellung des recPrP bei mittleren SDS-Konzentrationen. Gezeigt sind Übergangskurven wie in Abb. 3.19. Die zugrundeliegenden Spektren von 20 ng/ μ l recPrP bei den angegebenen SDS-Konzentrationen wurden jeweils sofort nach Verdünnen des SDS und nach ü. N. Inkubation bei 25 °C gemessen.

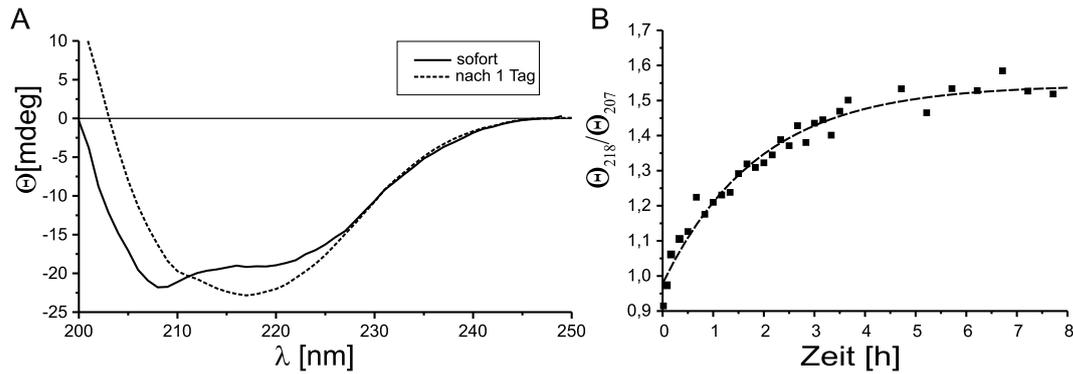


Abbildung 3.21: Kinetik der Struktureinstellung **A.** Spektren für recPrP in 0,0275 % SDS bei direkter Messung bzw. nach \ddot{u} . N. Inkubation. **B.** Verlauf der Struktureinstellung aus Abb. A anhand des Quotienten. Das Erreichen der endgültigen β -Faltblatt-Struktur dauert mehrere Stunden.

Bindungen in Proteine oder Proteinkomplexe einfügen. Durch die Wahl geeigneter Bedingungen ist es so möglich, vorhandene, nicht-kovalente Dimere und Oligomere kovalent zu verknüpfen. Das ermöglicht den einfachen Nachweis z. B. durch SDS-PAGE.

3.3.1 Verknüpfung zwischen Lysin-Seitenketten mit NHS-Estern

Nachdem erste Versuche mit Linkern, die Succinimidyl-Ester als reaktive Gruppen besitzen, fehlgeschlagen waren (ohne Abbildung), wurden homobifunktionale NHS-Ester getestet. Diese besitzen zwei reaktive Gruppen, die spezifisch mit der Aminogruppe von Lysinseitenketten bzw. mit dem N-Terminus reagieren. Dabei wird eine zusätzliche Gruppe („Spacer“) von einigen Å Länge eingefügt. Zum Mechanismus der Reaktion vgl. Abb. 2.11. Das Ergebnis einer Vernetzung von PrP in verschiedenen SDS-Konzentrationen mit dem NHS-Ester BS³ [bis(sulfosuccinimidyl)suberate] ist in Abb. 3.22 gezeigt. Die Bedingungen für den Crosslink sind in Abschnitt 2.13 beschrieben. Die entstandenen Produkte wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot aufgetrennt. In den beiden äußeren Spuren sind unbehandelte Kontrollen von PrP in 0,2 bzw. 0,01 % SDS aufgetragen. Wie erwartet, ist in beiden Spuren hauptsächlich die Monomer-Bande zu sehen, da die in 0,01 % entstandenen Aggregate durch das Kochen in Auftragspuffer aufgelöst werden. Ein geringer Anteil an Dimer ist allerdings auch in diesen Proben zu erkennen, wie zuvor schon beschrieben (Post, 1998). Bei den BS³-behandelten Proben ist jedoch die Dimer-Bande ab etwa 0,05 % intensiver als in den Kontrollen. Mit weiter abnehmender SDS-Konzentration nimmt die

Intensität weiter zu, und auch Trimere und Tetramere können mit geringer Intensität detektiert werden. Gezeigt ist ein Beispiel mit maximaler Ausbeute an Crosslink-Produkten. Aufreinigungen der Crosslink-Proben mittels Größenausschluss-Chromatographie, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, ergaben eine maximale Ausbeute von etwa 20 % Dimer pro Ansatz. Im gezeigten Blot ist bei 0,01 % SDS die Gesamtintensität der Proteinbanden wesentlich geringer, was auf sehr starke Quervernetzung zurückzuführen sein könnte, so dass die Produkte zum größten Teil nicht ins Gel einlaufen konnten. Dieses Phänomen wurde allerdings nur selten beobachtet.

Die Ergebnisse zeigen, dass das Ausdünnen von SDS zur Bildung von Dimeren und Oligomeren führt. Allerdings ist die Effektivität des BS³ offensichtlich nicht groß genug, um eine komplette Verknüpfung großer Aggregate, wie sie bei SDS-Konzentrationen $\leq 0,02\%$ entstehen, zu gewährleisten. Da BS³ nur Lysin-Reste verknüpft, ist die beobachtete Vernetzung jedoch vermutlich sehr spezifisch.

Der Einsatz höherer BS³-Konzentrationen führte nicht zu einer stärkeren Verknüpfung, war jedoch ungünstig, da die PrP-Banden beim immunologischen Nachweis nach einer solchen Reaktion deutlich schlechter detektiert wurden (ohne Abbildung). Das könnte auf eine Bindung des BS³ an Lysin-Reste ohne Bildung einer Quervernetzung zurückzuführen sein, die die PrP-Erkennung durch den Antikörper

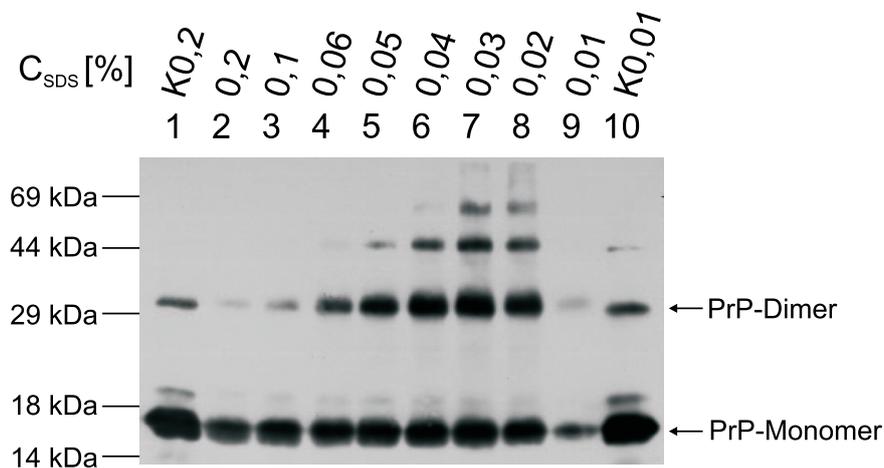


Abbildung 3.22: Crosslinking mit BS³. PrP wurde auf die angegebenen SDS-Konz. eingestellt und nach ü. N. Inkubation mit BS³ behandelt (s. 2.13). Anschließend wurden die entstandenen Crosslink-Produkte mittels SDS-PAGE und Western-Blot (Antikörper 3F4) nachgewiesen. Die jeweiligen SDS-Konzentrationen sind angegeben. Mit K gekennzeichnete Proben wurden nicht mit BS³ versetzt.

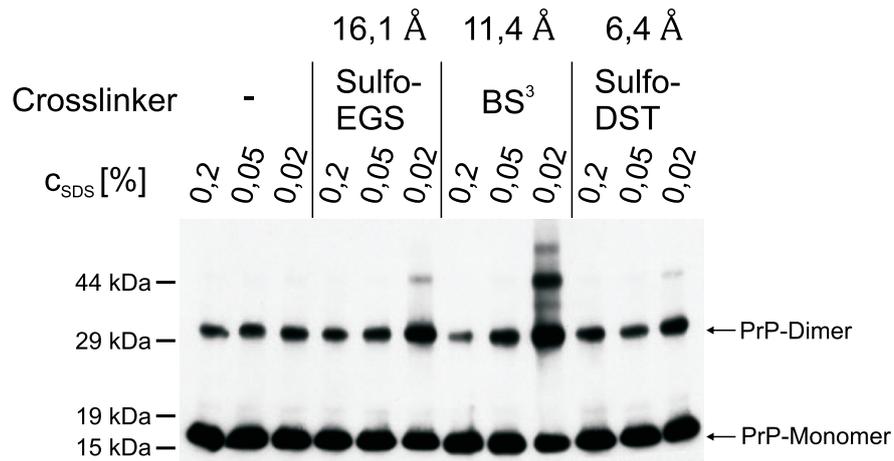


Abbildung 3.23: Crosslinking mit NHS-Estern verschiedener Länge. PrP wurde auf die angegebenen SDS-Konzentrationen eingestellt, ü. n. bei 25 °C inkubiert und mit den Crosslinkern behandelt. Die verwendeten Linker sowie die jeweilige Länge des Spacers sind angegeben. Der PrP-Nachweis im Western-Blot erfolgte mit dem Antikörper 3F4.

3F4 behindern. Der Antikörper bindet an das Epitop PrP 107-112, das ein Lysin (Lys110) beinhaltet.

Eine mögliche Erklärung für die relativ schlechte Effektivität des Crosslinks wäre, dass der Spacer nicht die richtige Länge hat. Deshalb wurden zusätzlich zwei Crosslinker mit identischen reaktiven Gruppen, aber kürzerem (Sulfo-DST, 6,4 Å) bzw. längerem (Sulfo-Egs, 16,1Å) Spacer getestet. Das Ergebnis ist in Abb. 3.23 gezeigt.

Getestet wurden hier SDS-Konzentrationen, bei denen α -Helix-Struktur vorliegt (0,05 %), sowie 0,02 % für die β -Faltblatt-reichere, aggregierte Form. Zusätzlich wurde PrP in 0,2 % SDS als Kontrolle eingesetzt. Hier liegt das Protein als Monomer vor (Pitschke, 1999), sollte also durch den Crosslink nicht beeinflusst werden. Die Bedingungen für die Crosslink-Reaktion waren für alle drei Crosslinker identisch. Die Abbildung zeigt, dass sowohl der längere als auch der kürzere Linker zu einer wesentlich schlechteren Verknüpfung führen. Die mittlere Länge von 11,4 Å scheint also am besten geeignet, und eine noch höhere Effektivität kann mit dieser Klasse von Crosslinkern nicht erreicht werden.

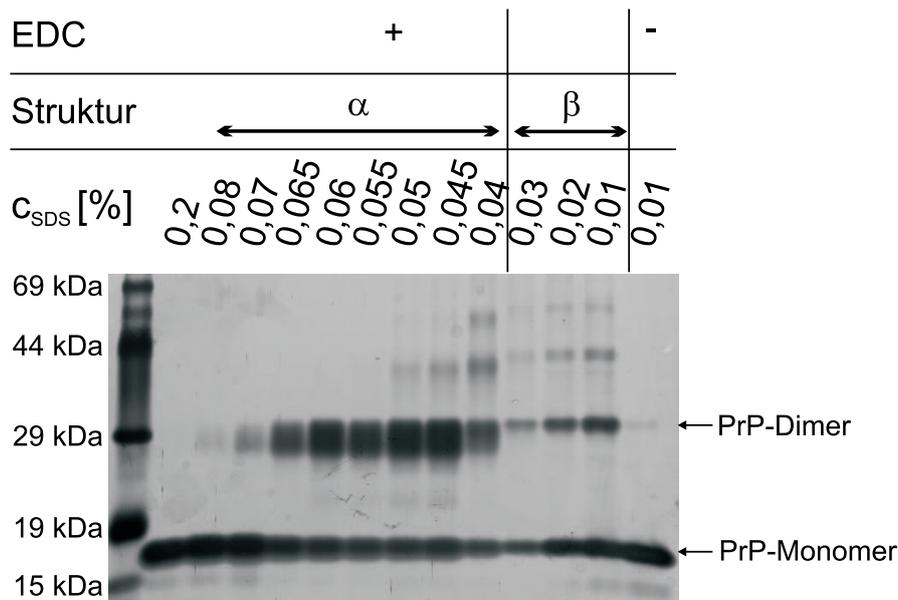


Abbildung 3.24: Crosslinking mit EDC. Nachweis der Crosslink-Produkte von PrP in verschiedenen SDS-Konzentrationen mit dem Carbodiimid EDC durch SDS-PAGE und Silberfärbung. Die SDS-Konzentrationen sind angegeben. Vor dem Crosslinking wurde die jeweilige Struktur des Proteins mit Circular dichroismus bestimmt (vgl. Abschnitt 3.1).

3.3.2 Verknüpfung von sauren Aminosäureresten mit Lysin mittels des Carbodiimids EDC

Um eine höhere Effektivität der Verknüpfung zu erreichen, wurde mit EDC [1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride] ein weiterer Crosslinker mit anderer Spezifität getestet. Es handelt sich um ein Carbodiimide, das zunächst freie Carbonsäuregruppen im Protein, also Glutamat, Aspartat oder den C-Terminus, angreift und nachfolgend die Ausbildung einer Isopeptidbindung dieser Gruppe zu freien Aminogruppen von Lysin oder dem N-Terminus bewirkt. Wenn sich kein geeigneter Reaktionspartner in der Nähe befindet, reagiert EDC mit Wasser ab, wobei die Säuregruppe des Proteins wiederhergestellt wird (Einzelheiten zum Mechanismus s. Abschnitt 2.13). Die Reaktionsbedingungen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit etabliert (Kaimann, 2002).

Für den Crosslink wurden PrP-Proben eingesetzt, deren Struktur vorher mittels Circular dichroismus bestimmt wurde, um einen direkten Vergleich zwischen Crosslink und Struktur zu ermöglichen. Abb. 3.24 zeigt ein silbergefärbtes Gel der Crosslink-Produkte für PrP in verschiedenen SDS-Konzentrationen.

In 0,2 % SDS liegt PrP monomer vor und wird auch nicht durch EDC verknüpft. Die schwache Dimer-Bande in den Kontrollen ist hier weniger ausgeprägt als in Abb. 3.22, was bei silbergefärbten Gelen im Vergleich zum Westernblot immer beobachtet wurde und vermutlich an der geringen Empfindlichkeit der Silberfärbung liegt. Bei niedrigeren SDS-Konzentrationen ab etwa 0,07 % tritt eine Dimerbande auf, die mit weiter abnehmender SDS-Konzentration bis ca. 0,045 % immer stärker wird. Unter diesen Bedingungen lag das Protein in der α -helikalen Struktur vor. Auch ein geringer Anteil an Trimer und Tetramer ist zu erkennen. Noch niedrigere SDS-Konzentrationen haben zur Folge, dass die Menge an detektiertem Gesamtprotein abnimmt, ohne dass die Monomerbande vollständig verschwindet. Wahrscheinlich wurden hier größere Aggregate so stark verknüpft, dass sie zum größten Teil nicht mehr ins Gel einlaufen konnten. Bei 0,01 % SDS ist die Intensität wieder etwas größer, was durch eine vergleichsweise schlechtere Verknüpfung dieser sehr großen Aggregate aufgrund einer schlechteren Zugänglichkeit für das EDC erklärt werden könnte.

Die Effektivität der mit EDC erreichten Verknüpfung ist deutlich größer als es zuvor mit BS³ erreicht werden konnte. Die Anwesenheit von PrP-Dimeren mit α -helikaler Struktur konnte gezeigt werden. Für die Verknüpfung von PrP-Oligomeren bzw. Aggregaten mit β -Faltblatt-Struktur ist EDC allerdings nur bedingt geeignet.

3.4 Chromatographischer Nachweis von PrP Dimeren und Oligomeren

Als Methode zum direkten Nachweis nicht-kovalenter Dimere und Oligomere im verwendeten System bietet sich die Größenausschluss-Chromatographie an. Da hier unter nativen Bedingungen gearbeitet werden kann, bleiben nicht-kovalente Komplexe stabil, solange die Konzentration des Dimers deutlich über der Dissoziationskonstanten bleibt. Zudem können die Pufferbedingungen frei gewählt werden.

Als Elutionspuffer wurde jeweils NaP_i mit der entsprechenden SDS-Konzentration der PrP-Probe verwendet. PrP wurde wie beschrieben nach Einstellen der gewünschten SDS-Konzentrationen ü. N. bei 25 °C inkubiert (PrP-Konzentration 0,1 mg/ml) und die Struktur mit Circular dichroismus bestimmt. Anschließend wurden die Proben eine Stunde bei 100 000 x g zentrifugiert. Das ist nötig, weil große, unlösliche Partikel die verwendete Säule verstopfen und damit unbrauchbar machen würden. Zum Nachweis großer, unlöslicher Aggregate ist diese Methode somit nicht

geeignet. Aus den Ergebnissen der differentiellen Ultrazentrifugation (s. Abschnitt 3.1) geht allerdings hervor, dass PrP löslich und mit β -Faltblatt-Struktur vorliegen kann, so dass eine Bestimmung der Größe dieser Moleküle möglich sein sollte.

Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte anhand eines Standards aus Proteinen verschiedener Größe (s. Abschnitt 2.14.1). Dieser wurde vor der Chromatographie auf die SDS-Konzentration der jeweiligen PrP-Probe und damit des Elutionspuffers eingestellt und 10 min bei 21 000 \times g zentrifugiert, um unlösliche Partikel zu entfernen. Da sich durch die SDS-Anlagerung das Volumen der Proteine verändern kann, muss für jede SDS-Konzentration eine solche Messung erfolgen. Die Trennung der Proteine des fertigen Standards bei einigen SDS-Konzentrationen, insbesondere für die größeren Molekulargewichte, war nicht immer ausreichend. Deshalb wurden für die hier gezeigten Messungen teilweise einzelne Proteine verwendet: 17 kDa: Myoglobin; 44 kDa: Ovalbumin; 67 kDa: bovines Serumalbumin; 97 kDa: Phosphorylase; 117 kDa: β -Galaktosidase. Die Standardproteine wurden vor der Chromatographie mit 2 mM DTT zur Trennung von durch Disulfidbrücken verknüpften Untereinheiten und NaP_i mit der SDS-Konzentration des verwendeten Elutionspuffers versetzt.

Abb. 3.25 A zeigt die Übergangskurve für die PrP-Struktur laut Circular-Dichroismus-Messung (s. Abschnitt 3.1). Bei den gekennzeichneten Punkten handelt es sich um die Proben, die für die chromatographische Analyse eingesetzt wurden. Die zugehörigen Chromatogramme sind in Teil B zu sehen; die Retentionszeiten des Standards sind eingezeichnet.

In 0,2 % SDS wurde wie erwartet das Molekulargewicht für monomeres PrP detektiert (MW recPrP 90-231=16,2 kDa). Bei einer SDS-Konzentration gerade oberhalb des Übergangs zur β -Faltblatt-Struktur, hier 0,05 %, ist dagegen ein Molekulargewicht zwischen 17 und 44 kDa, d. h. ein PrP-Dimer, zu erkennen. In der Mitte des Übergangsbereiches, hier 0,04 %, ist im Chromatogramm ein deutlich breiterer Peak zu erkennen, dessen mittleres Molekulargewicht bei etwa 100 kDa liegt. PrP im „löslichen β -Faltblatt-Zustand“ (hier: 0,03 %) zeigt ein noch größeres Molekulargewicht, liegt also als Oligomer vor.

Eine Schwierigkeit bei den beschriebenen Messungen ist, dass die Größenbestimmung anhand eines Standards erfolgt. Allerdings wird hier mit SDS-Konzentrationen gearbeitet, die nicht im Sättigungsbereich der SDS-Bindung an Proteine liegen. Deshalb ist nicht ganz klar, ob die verwendeten Standardproteine das gleiche Verhalten

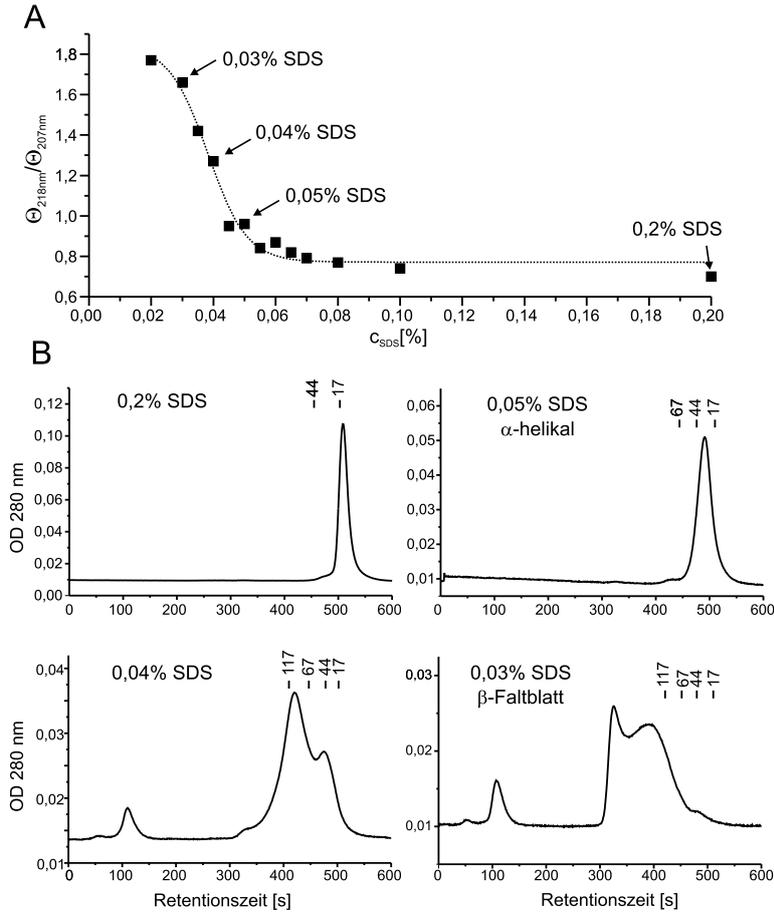


Abbildung 3.25: Nachweis von PrP Dimeren und Oligomeren mit Größenausschluß-Chromatographie. A. Vor der Chromatographie wurde mit Circular dichroismus die Struktur des PrP in den verschiedenen SDS-Konzentrationen ermittelt. Gezeigt ist eine Übergangskurve wie in Abschnitt 3.1 beschrieben. Die Proben bei den mit Pfeilen gekennzeichneten SDS-Konzentrationen wurden für die Chromatographie eingesetzt.

B. Chromatogramme von PrP in den angegebenen SDS-Konzentrationen. Die Retentionszeiten eines Proteinstandards sind eingezeichnet.

im Bezug auf SDS-Bindung und die damit verbundene Volumenzunahme zeigen wie PrP.

Ein besser geeigneter Standard wären Monomere und Dimere des PrP selber, da man hier von gleichen SDS-Bindungs-Eigenschaften ausgehen kann. Eine Möglichkeit zur Präparation eines solchen PrP-Standards bietet das im vorigen Abschnitt verwendete Crosslinking. Mit dieser Methode können kovalent verknüpfte Dimere des PrP hergestellt werden. Um sie als Standard einsetzen zu können, ist es

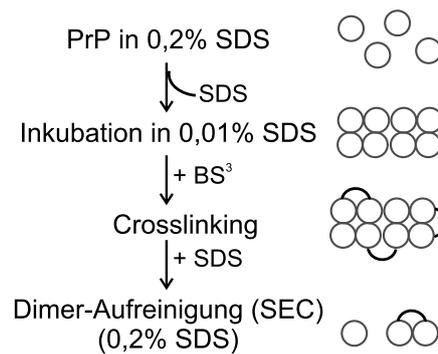


Abbildung 3.26: Schema zur Präparation kovalent verknüpfter PrP-Dimere mit BS^3 . Einzelheiten s. Text.

von Vorteil, diese Dimere bzw. die Monomere vorher zu isolieren, da die Trennung sonst möglicherweise nicht ausreichend ist. Als Crosslinker wurde hier BS^3 verwendet, da EDC zum einen zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung stand und die EDC-Crosslink-Produkte zudem chromatographisch sehr schlecht zu trennen sind. Das Verfahren zur Präparation des PrP-Standards ist schematisch in Abb. 3.26 dargestellt.

Zunächst wurde PrP auf 0,01 % SDS eingestellt, ü. N. inkubiert und mit BS^3 vernetzt. Mit BS^3 ist unter diesen Bedingungen die größte Ausbeute an Dimer zu erwarten. Um die nicht-kovalenten große Aggregate aufzulösen, wurde die Probe anschließend auf 0,2 % SDS eingestellt. Kovalent verknüpfte Dimere wurden mittels Größenausschluss (SEC) von den nicht verknüpften Monomeren getrennt. Die Fraktionen, die ausschließlich Monomer oder Dimer enthielten, wurden mittels Western-Blot bestimmt und jeweils vereinigt. Abb. 3.27 zeigt ein solches Chromatogramm und den dazugehörigen Western-Blot der einzelnen Fraktionen.

Das Monomer wird bei einer Retentionszeit von 511 s eluiert, das Dimer bei 472 s. Ein dritter Peak im Chromatogramm bei 411 s besteht wahrscheinlich aus nicht-kovalenten PrP-Oligomeren, die durch die Inkubation in SDS nicht wieder komplett aufgelöst wurden. Durch das Kochen in Auftragspuffer werden diese Oligomere jedoch getrennt, so dass im Western-Blot nur Monomer und Dimer zu erkennen sind.

Das aufgereinigte PrP-Dimer eignet sich als Größenvergleich besonders gut bei höheren SDS-Konzentrationen, da bei niedrigeren SDS-Konzentrationen das Dimer selbst Oligomere bilden könnte. In Abb. 3.28 sind Chromatogramme für das α -helikale PrP (hier: 0,06 % SDS) bzw. den löslichen β -Faltblatt-Zustand des PrP

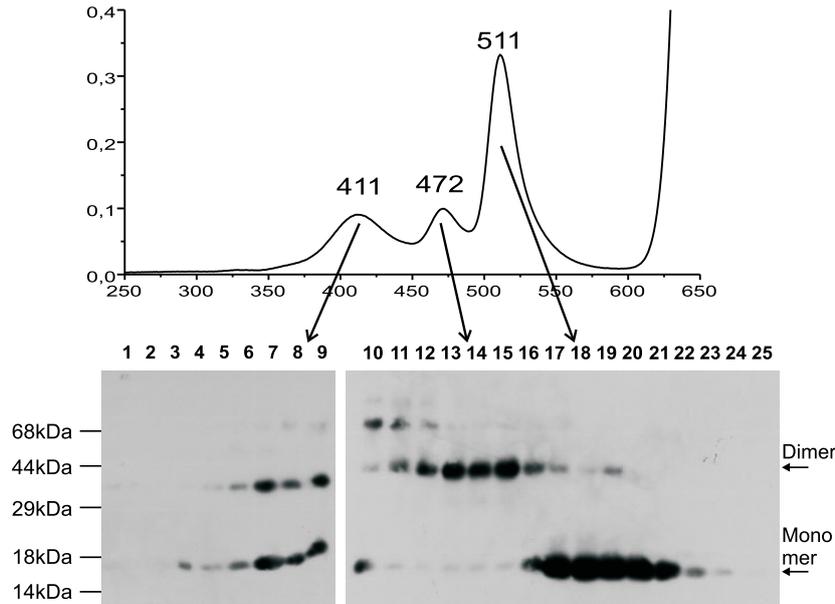


Abbildung 3.27: Chromatogramm und Western-Blot zur Fraktionierung von BS³-verknüpften PrP Monomeren und Dimeren. Ein kleiner Teil der bei der Chromatographie gesammelten Fraktionen wurde zur Absicherung der Reinheit von Monomer und Dimer im Western-Blot eingesetzt. Die Zahlen kennzeichnen die einzelnen Fraktionen.

(hier: 0,03 % SDS) im Vergleich zum Dimer gezeigt. Die Strukturen wurden wieder vor der Chromatographie bestimmt.

In der α -helikalen Struktur, bei SDS-Konzentrationen kurz oberhalb des Übergangs zur β -Faltblatt-Struktur (in der Abbildung als α -PrP bezeichnet), ist die Retentionszeit des PrP genau identisch mit der des kovalent verknüpften Dimers. Unter diesen Bedingungen liegt das Protein also als Dimer vor. Das stimmt gut mit den Ergebnissen des EDC-Crosslinks überein, durch den ebenfalls ein hoher Anteil an Dimer für die entsprechenden SDS-Konzentrationen nachgewiesen werden konnte (s. Abschnitt 3.3.2).

Für das lösliche β -Faltblatt (β -PrP) ist zu erkennen, dass hier ein Oligomer vorliegen muß, da die Retentionszeit wesentlich geringer und das Molekulargewicht entsprechend höher ist als beim Dimer. Die Breite des Peaks für das oligomere PrP lässt darauf schließen, dass es sich um eine Größenverteilung handelt.

PrP in der höchsten SDS-Konzentration, bei der die β -Faltblatt-reichere Struktur beobachtet wird, liegt also als Oligomer vor und wird im Folgenden auch als „ β -Oligomer“ bezeichnet. Entsprechend wird PrP in der niedrigsten SDS-Konzentration, bei der noch die α -helikale Struktur vorliegt, als „ α -Dimer“ bezeichnet.

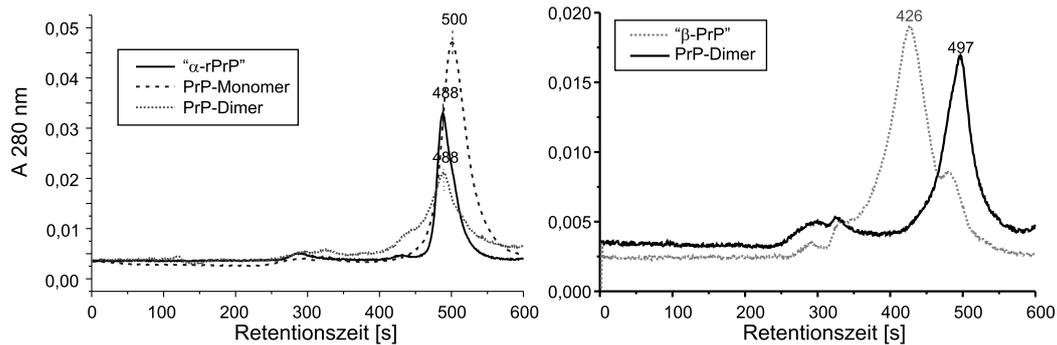


Abbildung 3.28: Nachweis der PrP-Dimere und Oligomere mittels eines PrP-Standards. Gezeigt sind Chromatogramme für PrP in α -helikaler Struktur (hier: 0,06 % SDS) und im löslichen β -Faltblatt-Zustand (hier: 0,03 % SDS) im Vergleich zum PrP Monomer bzw. Dimer.

3.5 Größenbestimmung mit analytischer Ultrazentrifugation (AUZ)

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes nicht-kovalenter Proteinkomplexe bietet sich die analytische Ultrazentrifugation an. Es kann unter nativen Bedingungen, d. h. in unter frei wählbaren Pufferbedingungen, gemessen werden. Die Ergebnisse der Größenausschluss-Chromatographie sollten mit dieser unabhängigen Methode bestätigt bzw. die Größe des β -Oligomers genauer bestimmt werden.

3.5.1 M-Lauf zur Bestätigung des α -Dimers

Die Existenz eines α -Dimers konnte bereits mit Größenausschluss-Chromatographie gezeigt werden. Zur Messung des Molekulargewichtes für ein PrP-Dimer mittels AUZ eignet sich ein Molekulargewichtslauf (vgl. 2.15.1), weil er eine direkte Bestimmung des Molekulargewichtes unabhängig von der Form erlaubt. Außerdem ist es für das erwartete Molekulargewicht von 32 kDa nicht möglich, das Protein komplett zu sedimentieren, so dass eine s-Wert-Bestimmung schwierig wäre.

Abb. 3.29 zeigt die Konzentrationsprofile im M-Lauf für PrP in 0,2 % SDS und 0,06 % SDS, also für Monomer und Dimer. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Profil für das Dimer wesentlich steiler ist als für das Monomer, was auf ein höheres Molekulargewicht schließen lässt.

Eine Auswertung der Profile zur Ermittlung des Molekulargewichtes für das erwartete Dimer war jedoch nicht möglich. Es wurden bei mehreren Drehzahlen gemessen, um einen guten Fit der Daten zu ermöglichen. Die bei verschiedenen Drehzahlen

ermittelten Ergebnisse waren jedoch widersprüchlich, und es konnte kein Modell gefunden werden, dass mit den Messdaten übereinstimmt. Das ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass sich während des Laufes in der Zelle auch für SDS selber ein Konzentrationsprofil einstellt. Dadurch ergeben sich innerhalb der Zelle verschiedene (SDS-)Bedingungen. Im Bereich des Strukturübergangs haben aber bereits geringe Änderungen der SDS-Konzentration drastische Auswirkungen auf Struktur und Aggregationszustand, so dass hier kein einheitliches System beobachtet wurde und eine Auswertung praktisch unmöglich war. Die Daten zeigen jedoch eine Erhöhung des Molekulargewichtes gegenüber dem Monomer in 0,2% SDS und sind damit in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Größenausschluss-Chromatographie.

3.5.2 Analyse des β -Oligomers mittels S-Lauf

Mit Hilfe der Größenausschluss-Chromatographie war die Frage nach dem Molekulargewicht des β -Oligomers nicht eindeutig zu beantworten. Bei der Durchführung eines M-Laufes würden jedoch die im vorigen Abschnitt beschriebenen Schwierigkeiten auftreten: Es würde sich ein SDS-Konzentrationsprofil über die Zelle einstellen.

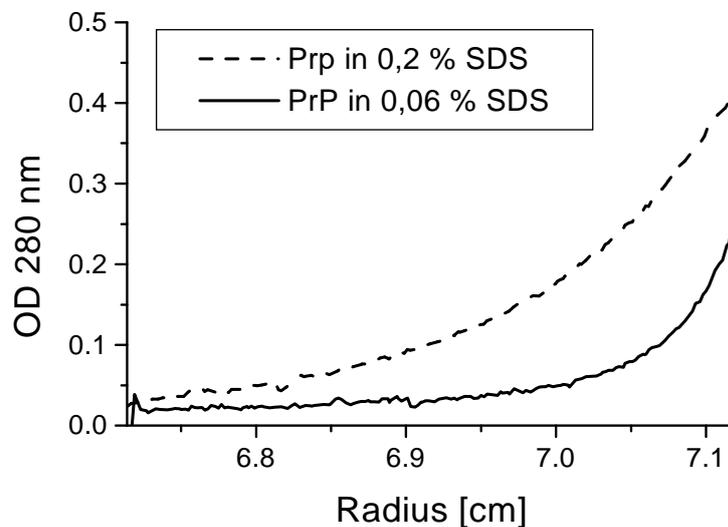


Abbildung 3.29: Absorptionsprofile im Molekulargewichts-Lauf für das PrP-Monomer und das PrP-Dimer. Es wurden SDS-Konzentrationen von 0,2% (PrP-Monomer) und 0,06% (PrP-Dimer) mit je 100 ng/ μ l eingesetzt. Die Profile wurden bei einer Drehzahl von 25 000 rpm und 25 °C aufgezeichnet. Das steilere Profil in 0,06% bestätigt die Annahme eines höheren Molekulargewichtes unter diesen Bedingungen, eine weitere Auswertung war jedoch nicht möglich.

Geringste Änderungen der SDS-Konzentration beeinflussen aber die Einstellung des β -Oligomers, so dass in der Zelle kein einheitliches System beobachtet werden kann und eine genaue Auswertung unmöglich wird.

Eine andere Methode zur Bestimmung der Größe nicht-kovalenter Komplexe bietet ein Sedimentations-Geschwindigkeitslauf oder kurz S-Lauf (vgl. Abschnitt 2.15.2). Hier wird der s-Wert der sedimentierenden Partikel bestimmt, aus dem unter bestimmten Voraussetzungen (z. B. Annahme eines kugelförmigen Moleküls) auf das Molekulargewicht geschlossen werden kann. Beim S-Lauf wird bei wesentlich höheren Drehzahlen gemessen, und nicht das Konzentrationsprofil im Gleichgewicht, sondern die Wanderung der Grenzschicht Richtung Boden wird beobachtet. Aufgrund der kürzeren Messzeiten und der anderen Auswertemethode spielt der Einfluss der Zentrifugation auf das SDS hier keine Rolle.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass PrP bei der minimaler SDS-Konzentration für die α -helikale Struktur als Dimer vorliegt, sollte jetzt die kleinste in unserem System nachweisbare Größe für PrP mit β -Faltblatt-Struktur, also das β -Oligomer, genauer bestimmt werden. Es wurde bereits diskutiert, dass die Kenntnis der SDS-Konzentration alleine nur bedingt eine Voraussage über Struktur und Aggregationszustand erlaubt. Deshalb wurden für jeden Versuch die CD-Spektren der eingesetzten Proben gemessen, um genau die Position im Übergang zu finden, bei der schon vollständig β -Faltblatt-Struktur vorlag, aber die SDS-Konzentration möglichst hoch war. Die PrP-Proben mit einer Konzentration von $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ wurden dazu auf die gewünschte SDS-Konzentration eingestellt und vor den Messungen ü. N. bei 25°C inkubiert. Für den S-Lauf konnten jeweils drei Proben eingesetzt werden.

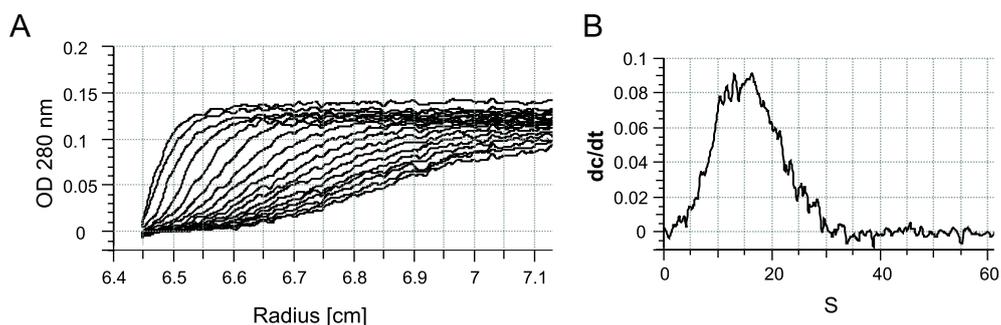


Abbildung 3.30: Sedimentations-Geschwindigkeits-Lauf des PrP β -Oligomers. **A.** Absorptionsprofile zu verschiedenen Zeitpunkten des Laufs in der Analytischen Ultrazentrifuge. **B.** Auswertung zur Bestimmung des s-Wertes mittels dc/dt -Analyse.

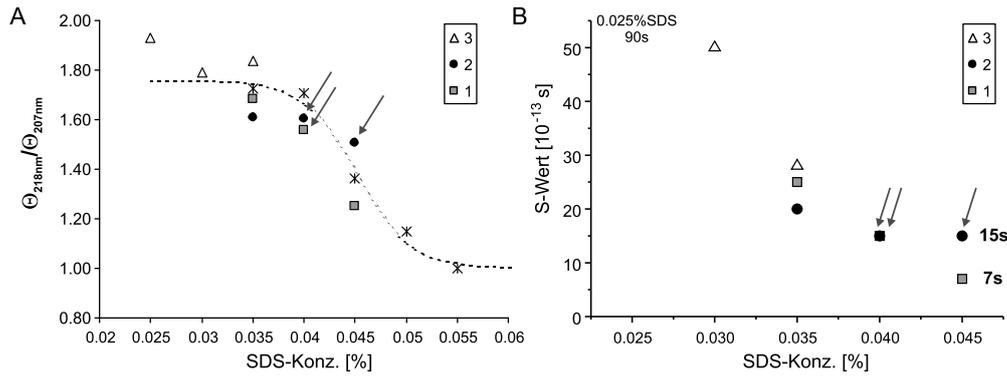


Abbildung 3.31: Vergleich von Struktur und s-Wert für das PrP β -Oligomer. Insgesamt drei unabhängige Experimente mit jeweils drei SDS-Konzentrationen wurden durchgeführt. Die grauen Pfeile bezeichnen die als β -Oligomer angesehenen Proben. **A.** Mit Circular Dichroismus ermittelte Struktur-Übergangskurve. **B.** Für die identischen Proben ermittelte s-Werte. Für alle drei β -Oligomer-Proben ergibt sich ein Wert von ca. 15 S.

Abb. 3.30 A zeigt exemplarisch die Sedimentationsprofile für recPrP-Oligomere, hier in 0,04 % SDS. Die Detektion des Proteins erfolgte bei 280 nm, da bei 230 nm auch SDS eine leichte Absorption zeigt, die das Signal verfälschen würde. Die Auswertung und Bestimmung des s-Wertes erfolgte wie in Abschnitt 2.15.2 beschrieben über die zeitliche Ableitung der Profile (dc/dt-Methode). Abb 3.30 B zeigt die ermittelte s-Wert-Verteilung. Hier ergibt sich ein Maximum bei 15 S.

Entsprechende Messungen wurden mit mehreren unabhängigen Messreihen durchgeführt, für die das CD-Spektrum jeder Probe vorher bestimmt wurde. In Abb. 3.31 ist die mittels Circular Dichroismus ermittelte Struktur in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration für die eingesetzten Proben dargestellt (links). Die gestrichelte Linie zeigt den gesamten Strukturübergang anhand einer weiteren Messreihe, die nicht für AUZ-Messungen eingesetzt wurde. Die drei unabhängigen Experimente sind gekennzeichnet. Hier wird deutlich, dass sich die tatsächliche Struktur auch bei identischer SDS-Konzentration leicht unterscheiden kann. Rechts sind die für die einzelnen Proben ermittelten s-Werte dargestellt.

Die grauen Pfeile kennzeichnen die Proben, die der Definition des β -Oligomers entsprechen. Die zugehörigen s-Werte geben also Aufschluss über die Größe des kleinsten beobachteten PrP-Oligomers, bei dem β -Faltblatt-Struktur vorliegt. Für alle drei Proben, die laut CD gerade den Übergang zur β -Faltblatt-Struktur abgeschlossen haben, ergibt sich ein mittlerer s-Wert von etwa 15 S. Unter Annahme eines kugelförmigen Moleküls entspricht das rechnerisch 14,6 PrP-Molekülen (15 S

≈ 236 kDa $\approx 14,6$ PrP-Moleküle). Diese Rechnung wurde mit dem Programm Ultrascan durchgeführt (s. Abschnitt 2.15). Eine mögliche SDS-Bindung wurde dabei zunächst vernachlässigt, siehe dazu auch den nächsten Abschnitt.

3.5.3 Bestimmung der SDS-Bindung an monomeres PrP durch analytische Ultrazentrifugation

Wie in Abschnitt 3.4 gezeigt, konnten die Daten aus Pitschke (1999) bestätigt werden, nach denen recPrP in 0,2 % SDS als Monomer vorliegt. Bis jetzt war allerdings nicht bekannt, wieviel SDS unter diesen Bedingungen an das Protein gebunden ist. Mit dem Molekulargewichtslauf in der analytischen Ultrazentrifuge steht eine Methode zur Verfügung, mit der diese SDS-Bindung direkt bestimmt werden kann. Dabei wird ausgenutzt, dass das Molekulargewicht des Proteins bekannt ist. Man kann also im M-Lauf das Molekulargewicht des Protein-SDS-Komplexes bestimmen und aus der Differenz zur tatsächlichen Masse des Proteins die Menge des gebundenen SDS berechnen. Dabei muss noch das partielle spezifische Volumen, \bar{v} , korrigiert werden, da SDS eine geringere Dichte bzw. ein höheres spezifisches Volumen hat als das Protein.

Es wurden M-Läufe mit 0,1 mg/ml recPrP in 0,2 % SDS bei verschiedenen Drehzahlen (20 000, 25 000 und 40 000 rpm) durchgeführt. Die Detektion erfolgte bei 280 nm. Abb. 3.32 zeigt Konzentrationsprofile für die verschiedenen Drehzahlen. Die Daten wurden unter der Annahme eines Ein-Komponenten-Systems ausgewertet. Die Abweichungen der entsprechenden Fits von den tatsächlichen Werten sind ebenfalls dargestellt. Für alle drei verwendeten Drehzahlen konnte für das Ein-Komponenten-System ein guter Fit erzielt werden. Das verwendete Modell passt also zu den gemessenen Daten. Es wurden insgesamt drei unabhängige Experimente, jeweils bei allen drei Drehzahlen, durchgeführt.

Der dargestellte Fit wurde zunächst unter Verwendung des partiellen spezifischen Volumens des Proteinanteils durchgeführt. Dieses wurde für PrP aus der Aminosäuresequenz berechnet (nach Cohn & Edsall, 1943): $\bar{v}_{PrP} = 0,7082$ cm³/g. Die Berechnung des tatsächlichen Molekulargewichtes aus dem ermittelten apparenten Molekulargewicht erfolgte nach folgendem Prinzip:

Ein M-Lauf mit nur einer Art von Molekülen kann nach folgender Gleichung ausgewertet werden (vgl. 2.15.2):

$$\frac{d \ln A}{dr^2} = M \cdot \frac{(1 - \bar{v}_M \cdot \rho_L) \cdot \omega^2}{2RT}$$

Das Molekulargewicht des Protein-SDS-Komplexes setzt sich aus dem bekannten Molekulargewicht des Proteins (Prot) und dem Molekulargewicht der SDS-Hülle (SDSH) zusammen, so dass gilt:

$$\frac{d \ln A}{dr^2} = M_{Prot} \cdot \frac{(1 - \bar{v}_{Prot} \cdot \rho_L) \cdot \omega^2}{2RT} + M_{SDSH} \cdot \frac{(1 - \bar{v}_{SDS} \cdot \rho_L) \cdot \omega^2}{2RT}$$

Sowohl für den PrP-Anteil (s.o.) als auch für den SDS-Anteil ist \bar{v} bekannt. Für Protein-gebundenes SDS wird mit dem Wert für micellares SDS ($\bar{v} = 0,87 \text{ g/cm}^3$) gerechnet, weil die SDS-Moleküle durch die Proteinbindung in räumliche Nähe gebracht werden (Tanford *et al.*, 1974). Die Dichte des Lösungsmittels, ρ_L , beträgt für 0,2% SDS $0,999 \text{ g/cm}^3$. In der obigen Gleichung sind alle Parameter außer M_{SDSH} bekannt. Das Molekulargewicht der SDS-Hülle könnte demnach prinzipiell aus der Steigung einer Ausgleichsgeraden bei Auftragung der Absorption gegen das Quadrat des Radius berechnet werden. Genauer ist es jedoch, für die Auswertung mehrere Scans bei verschiedenen Drehzahlen zugrunde zu legen und die Daten basierend auf der genannten Gleichung anzupassen (zu „fitten“), was mit dem Programm Ultra-

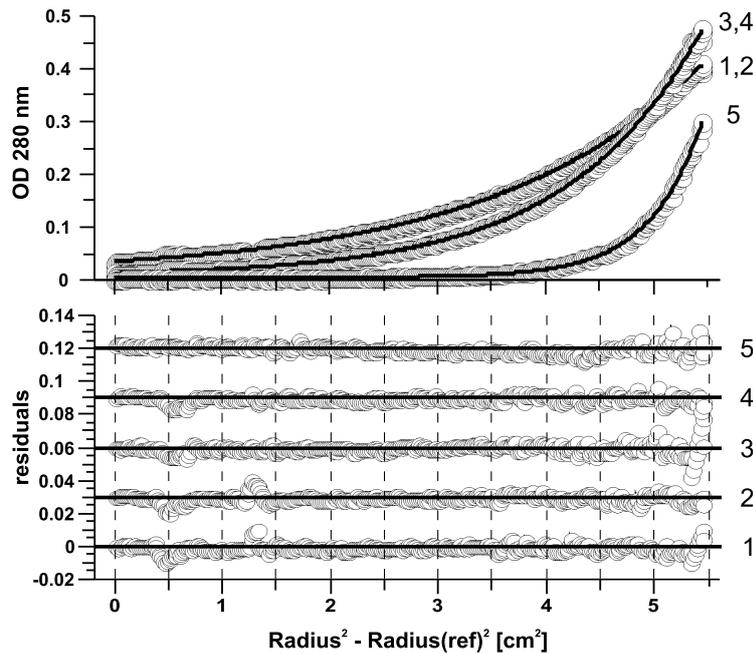


Abbildung 3.32: Molekulargewichts-Lauf für PrP in 0,2% SDS. Gezeigt sind die Absorptionsprofile bei verschiedenen Drehzahlen und die durch den Fit berechneten Kurven (oben) sowie die Abweichungen zwischen Fit und Messung (unten). Es wurden drei verschiedene Drehzahlen für die Auswertung zugrunde gelegt. 1,2: 20 000 rpm; 3,4: 25 000 rpm; 5: 40 000 rpm.

scan erfolgte. Deshalb ist es geschickter, zunächst mit der Auswertesoftware unter Annahme eines geschätzten \bar{v} (hier verwendet: \bar{v} des PrP) ein apparentes Molekulargewicht zu ermitteln, das anschliessend korrigiert wurde. Das Molekulargewicht der SDS-Hülle wurde folgendermaßen ermittelt:

$$\begin{aligned} \frac{d \ln A}{dr^2} &= M_{app} \cdot \frac{(1 - \bar{v}_{Prot} \cdot \rho_L) \cdot \omega^2}{2RT} \\ &= M_{Prot} \cdot \frac{(1 - \bar{v}_{Prot} \cdot \rho_L) \cdot \omega^2}{2RT} + M_{SDSH} \cdot \frac{(1 - \bar{v}_{SDS} \cdot \rho_L) \cdot \omega^2}{2RT} \\ M_{SDSH} &= \frac{(1 - \bar{v}_{Prot} \cdot \rho_L)}{(1 - \bar{v}_{SDS} \cdot \rho_L)} (M_{app} - M_{Prot}) \\ M_{SDSH} &= 2,235 \cdot (M_{app} - 16,2) \quad [\text{kDa}] \end{aligned}$$

Das Molekulargewicht des PrP-SDS-Komplexes ist die Summe der Molekulargewichte des PrP alleine und der SDS-Hülle. Aus den drei Experimenten ergaben hierfür folgende Werte:

Exp.	M [kDa]	\bar{v} [cm ³ /g]
1	24,95	0,7650
2	25,18	0,7659
3	22,93	0,7557

Das partielle spezifische Volumen \bar{v} des Komplexes wurde aus den Anteilen des PrP und des SDS am Komplex berechnet:

$$\bar{v}_{Komplex} = \text{Anteil PrP} \cdot \bar{v}_{PrP} + \text{Anteil SDS} \cdot \bar{v}_{SDS}$$

Da der dritte Wert etwas stärker von den beiden anderen Werten abweicht und für dieses Experiment auch der schlechteste Fit erzielt wurde, wurden nur die beiden ersten Experimente für die weitere Berechnung zugrundegelegt. Es ergab sich ein Mittelwert von 25,1 kDa für das Molekulargewicht und 0,765 für \bar{v} . Das entspricht einer SDS-Bindung von 0,55 g SDS / g Protein bzw. 31 Molekülen SDS pro Molekül PrP ($M_{SDS} = 0,288$ kDa). Auf diese Art konnte der Maximalwert für die SDS-Bindung an PrP unter den verwendeten Bedingungen im SDS-System bestimmt werden.

Die Kenntnis der SDS-Bindung konnte genutzt werden, um die Bestimmung des Molekulargewichtes für das β -Oligomer nochmals zu überprüfen. Es ist nicht

bekannt, wieviel SDS unter den entsprechenden Bedingungen an PrP bindet, jedoch kann es maximal die Menge (in g/g bzw. SDS-Molekülen pro Monomer gerechnet) sein, die auch an das Monomer bindet. Deshalb wurde aus den ermittelten 15 S (vgl. Abschnitt 3.5.2) nochmals das Molekulargewicht bzw. die Anzahl an PrP-Monomeren berechnet. Diesmal wurde das berechnete Molekulargewicht von 25,1 kDa für den PrP-SDS-Komplex und $\bar{v} = 0,765 \text{ cm}^3/\text{g}$ zugrundegelegt. In diesem Fall entsprechen die ermittelten 15 S rechnerisch 13,5 PrP-Molekülen, was fast genau dem vorher berechneten Wert von 14,6 PrP-Molekülen entspricht. Die geringe Abweichung ist durch die geringe Dichte des SDS zu erklären, denn das erhöhte Molekulargewicht eines SDS-Protein-Komplexes im Vergleich zum Protein alleine wirkt sich auf den s-Wert nur gering aus, da der Effekt durch den größeren Auftrieb des Komplexes z. T. wieder ausgeglichen wird.

Wahrscheinlich handelt es sich um eine Größenverteilung mit einem Maximum bei etwa 14 PrP-Molekülen. Man kann als Größe für das β -Oligomer demzufolge einen Größenbereich von etwa 12-16 PrP-Molekülen angeben.

Diese kleinste Größe des β -Oligomers ist im Einklang mit den Ergebnissen der Größenausschluss-Chromatographie, bei der im Vergleich zum Standard ein Molekulargewicht von deutlich mehr als 120 kDa ermittelt wurde (vgl. Abb. 3.25), was einem Oligomer aus mehr als acht PrP-Molekülen entsprechen würde (Monomer: 16,2 kDa; Oktamer: 129,6 kDa).

3.6 Bestimmung der Crosslink-Stellen im PrP-Dimer

Für die Struktur der infektiösen Isoform des Prion-Proteins, PrP^{Sc}, gibt es bis heute keine hochaufgelöste Struktur. Ebenso wenig ist etwas über die Struktur von PrP-Dimeren bekannt, die als erster Schritt bei der Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} angesehen werden. Ein chemischer Crosslink, wie er in dieser Arbeit etabliert werden konnte, bietet eine neue Möglichkeit, strukturelle Informationen zu gewinnen. Wenn bekannt ist, welche Peptide oder im Idealfall welche Aminosäurereste des Proteins verknüpft wurden, ergeben sich daraus Hinweise auf die Nachbarschaft der beteiligten Gruppen innerhalb der Struktur.

Zur Etablierung der benötigten Methoden wurde das EDC-verknüpfte α -Dimer eingesetzt, da dieses mit ca. 50 % Ausbeute entsteht und somit in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Für die Bestimmung der Crosslink-Stellen müssen jeweils drei Proben miteinander verglichen werden:

1. Das PrP-Monomer ohne EDC-Behandlung
(im Folgenden auch als Monomer-Kontrolle bezeichnet)
2. Das PrP-Monomer nach EDC-Behandlung (EDC-Monomer)
3. Das PrP-Dimer nach EDC-Behandlung (EDC-Dimer)

Die Begriffe Monomer und Dimer werden hier in Bezug auf das Laufverhalten in der SDS-PAGE benutzt, bei der bekanntlich nur kovalent zum Dimer verknüpftes Protein als Dimer erscheint.

Die drei Proben müssen aufgereinigt und in kleine Peptide zerlegt werden. Die jeweils entstandenen Peptide müssen anschließend nachgewiesen und identifiziert werden. Aus dem Vergleich der drei Proben untereinander kann dann auf mögliche Crosslink-Stellen geschlossen werden: Beim Vergleich von Monomer-Kontrolle und EDC-Monomer deuten Peptide, die nur in der Monomer-Kontrolle vorhanden sind, aber im EDC-Monomer fehlen, auf *intramolekulare* Crosslinks hin. Beim Auftauchen zusätzlicher Peptide für das EDC-Monomer sollte es sich demzufolge um Crosslink-Produkte aus den im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr nachweisbaren Peptide handeln. Der Vergleich von EDC-Monomer und EDC-Dimer liefert analog Hinweise auf *intermolekulare* Verknüpfungen.

3.6.1 Aufreinigung der EDC-Crosslink-Produkte

Der erste Schritt für die Durchführung der genannten Versuche bestand in der Aufreinigung der bei der EDC-Behandlung entstehenden Produkte (EDC-Monomer und -Dimer). Die benötigte Monomer-Kontrolle wurde immer parallel behandelt, um einen Einfluss der Aufreinigungsschritte auszuschließen.

Als Methode der Wahl stellte sich hier die Gelelution heraus (s. auch 2.11), da Versuche zur Trennung von EDC-Monomer und -Dimer mittels Größenausschluss-Chromatographie nicht zum Erfolg führten. Der Crosslink-Ansatz wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Es wurden je nach Ausgangsmaterial 0,06-0,07% SDS eingesetzt, um die maximale Menge an Dimer zu verknüpfen. Das entsprach den Bedingungen für das α -Dimer. Um eine ausreichende Menge Protein für die nachfolgenden Versuche zur Verfügung zu haben, wurden pro Ansatz zwischen 100 und 200 μg PrP für das Crosslinking bzw. 50-100 μg PrP für die Kontrolle eingesetzt. Da das bei der gewünschten Konzentration von 0,1 mg/ml einem Volumen von 1-2 ml entspricht, wurden die Proben vor dem Auftragen auf das Gel in Microcon-Röhrchen

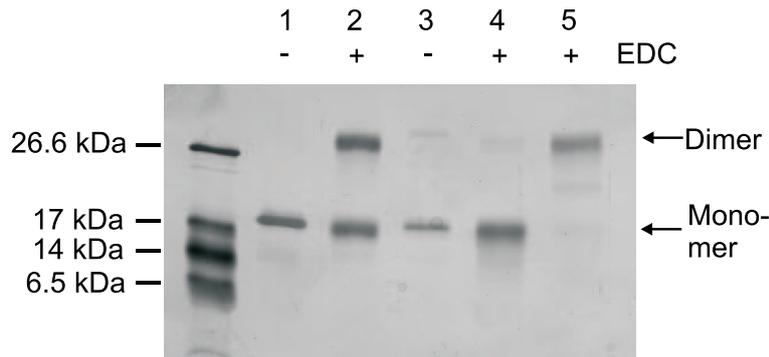


Abbildung 3.33: Isolierung der EDC-Crosslink-Produkte des PrP mittels Gelelution. Spuren 1-2: vor Gelelution; 3-5: nach Gelelution. 1: Nicht EDC-behandeltes PrP (Monomer-Kontrolle). 2: EDC-Crosslink des PrP α -Dimers; hier in 0,07 % SDS. 3: Monomer-Kontrolle nach Gelelution 4: EDC-Monomer 5: EDC-Dimer

(Millipore) aufkonzentriert. Die Zuordnung der Banden im Gel erfolgte anhand eines Standards mit vorgefärbten Eichproteinen.

Mittels Gelelution war es möglich, das EDC-Monomer und -Dimer quantitativ voneinander zu trennen. Abb. 3.33 zeigt das Ergebnis anhand SDS-PAGE mit nachfolgender Silberfärbung. Aufgetragen sind die Kontrolle und der Crosslink-Ansatz vor (Spuren 1 und 2) und nach (Spuren 3-5) der Gelelution. Es ist praktisch keine Verunreinigung der Monomer- bzw. Dimer-Proben mit der jeweils anderen Probe zu erkennen.

Als Puffer für die Gelelution wurde 10 mM NaP_i mit 0,025 % SDS eingesetzt. Laut Herstellerangaben ist unter diesen Bedingungen eine Aufkonzentrierung des SDS bis auf etwa 0,1 % zu erwarten. Da die nachfolgende Analyse mittels Massenspektrometrie erfolgen sollte, war es essentiell, das SDS aus der Probe zu entfernen, da in Anwesenheit von SDS Peptide in der Massenspektrometrie praktisch nicht detektiert werden können. Während der Gelelution konnte auf das SDS nicht verzichtet werden, da PrP sonst unlöslich wird und die Ausbeute drastisch abnimmt. Es musste also ein Weg gefunden werden, das SDS möglichst quantitativ zu entfernen, ohne die Löslichkeit des PrP zu sehr zu beeinflussen. Als einziges praktikables Verfahren zeigte sich hier ein Pufferaustausch gegen 6-8 M Harnstoff. Die hohe Harnstoffkonzentration reichte aus, um das PrP in Lösung zu halten. Gleichzeitig wurde die Bindung des SDS an das Protein gelöst, so dass SDS durch Waschen mit Harnstoff-Lösung entfernt werden konnte. Dies wurde durch mehrmaliges Verdünnen und anschließendes Aufkonzentrieren in Microcon-Röhrchen erreicht. Die Harnstoff-Lösung

sollte stets frisch angesetzt werden, da Harnstoff in Wasser hydrolysiert wird und dann den N-Terminus von Proteinen modifizieren kann. Durch die Verwendung einer frisch angesetzten Lösung wird das Ausmaß dieser als Carbamylierung bezeichneten Reaktion so gering wie möglich gehalten.

3.6.2 Tryptische Verdauung von PrP

Um definierte Peptidfragmente für die nachfolgende massenspektrometrische Analyse herzustellen, eignet sich Trypsin als Protease. Dieses Enzym schneidet spezifisch hinter (carboxyl-seitig) von Lysin- oder Arginin-Resten. Folgt allerdings auf eine solche basische Aminosäure ein Prolin, so wird in der Regel nicht geschnitten. Verwendet wurde modifiziertes, TPCK-behandeltes Trypsin der Firma Promega. Bei TPCK handelt es sich um einen Chymotrypsin-Inhibitor, der eine Chymotrypsin-Aktivität des Trypsin unterbindet. Die Modifizierung sorgt dafür, dass sich das Enzym nicht selbst verdaut, wie es bei normalem Trypsin der Fall ist.

Im vorigen Präparationsschritt wurden die PrP-Proben in Harnstoff denaturiert. Das ist für einen quantitativen Trypsin-Verdau wichtig und nötig, da nur denaturiertes Protein erkannt wird. Eine niedrige Konzentration an denaturierenden Agenzien, also z. B. 1 M Harnstoff, wird vom Enzym ohne weiteres toleriert. Nach dem Pufferwechsel zu 6 M Harnstoff und nachfolgendem Aufkonzentrieren wurden die PrP-Proben auf 3 M Harnstoff verdünnt und die Konzentration anhand der Extinktion bei 280 nm im Photometer bestimmt ($\epsilon=1.496 \frac{ml}{g \cdot cm}$). Bei diesem Schritt konnte die Ausbeute an aufgereinigtem Monomer bzw. Dimer bestimmt werden. Sie lag bei $\leq 50\%$. Anschließend wurden die Proben auf 2 mM DTT eingestellt, um die Disulfidbrücke zu reduzieren, und für 10 Minuten bei 95 °C inkubiert. Dadurch ist gewährleistet, dass das Protein vollständig denaturiert ist und damit von Trypsin mit guter Effizienz verdaut werden kann.

Nach der Denaturierung wurden die Proben mit 60 mM Ammoniumcarbonat pH 7,8 auf das dreifache Volumen verdünnt, um die Harnstoffkonzentration auf 1 M zu senken und den vom Trypsin benötigten basischen pH-Wert einzustellen. Die Verdauung erfolgte mit einem Enzym:Substrat Verhältnis von 1:10 (w/w) für 16 Stunden bei 37 °C unter ständigem Schütteln. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/30 Volumen 10 % Trifluoressigsäure (TFA) abgestoppt und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Eine typische Präparation ergab für jede Probe ca. 200-400 μ l Volumen mit einer PrP-Konzentration von 0,1-0,2 mg/ml.

Mittels SDS-PAGE kann getestet werden, ob die Verdauung erfolgreich war, indem das Verschwinden der Banden mit der vollen Länge nachgewiesen wird. Ein solches Gel ist in Abb. 3.34 zu sehen.

In den Kontrollen ohne Trypsin sind die Banden mit den für Monomer bzw. Dimer erwarteten Molekulargewichten zu erkennen. Die Vorbehandlung der Proben hat demzufolge keine Degradation des Proteins bewirkt. In den Proben mit Trypsin ist keine PrP-Bande mehr nachweisbar.

Ein Nachweis der tryptischen Fragmente im Gel ist allerdings nicht möglich, da die Peptide zu klein sind, um in einem Gelsystem aufgetrennt und nachgewiesen zu werden. Zum Nachweis dieser Peptidfragmente eignet sich eine chromatographische Auftrennung mittels reversed-phase-HPLC. Zur Elution der Proben wurde ein Acetonitril/Wasser-Gradient mit 0,1 % TFA verwendet. Die genauen Bedingungen waren wie folgt:

Puffer A: 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA)

Puffer B: 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) / 80 % Acetonitril

Flussrate: 0,1 ml/min

5 min 5 % B

In 60 min 5-70 % B (linearer Gradient)

Diese chromatographischen Bedingungen waren zunächst an einem tryptischen Verdau von PrP (ohne Gelelution) optimiert worden, um eine optimale Auftrennung

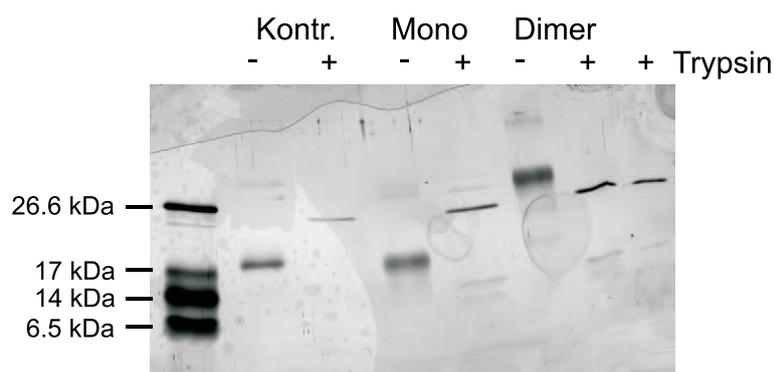


Abbildung 3.34: Kontrolle des tryptischen Verdaus von PrP. Mittels SDS-PAGE und Silberfärbung wurde das Verschwinden der Volllänge-Bande für die PrP-Proben nach tryptischem Verdau überprüft. Gezeigt ist jeweils eine unverdaute und eine Trypsin-verdaute Probe der Monomer-Kontrolle, des EDC-Monomers und des EDC-Dimers. Ganz rechts ist Trypsin alleine ohne PrP-Zugabe aufgetragen.

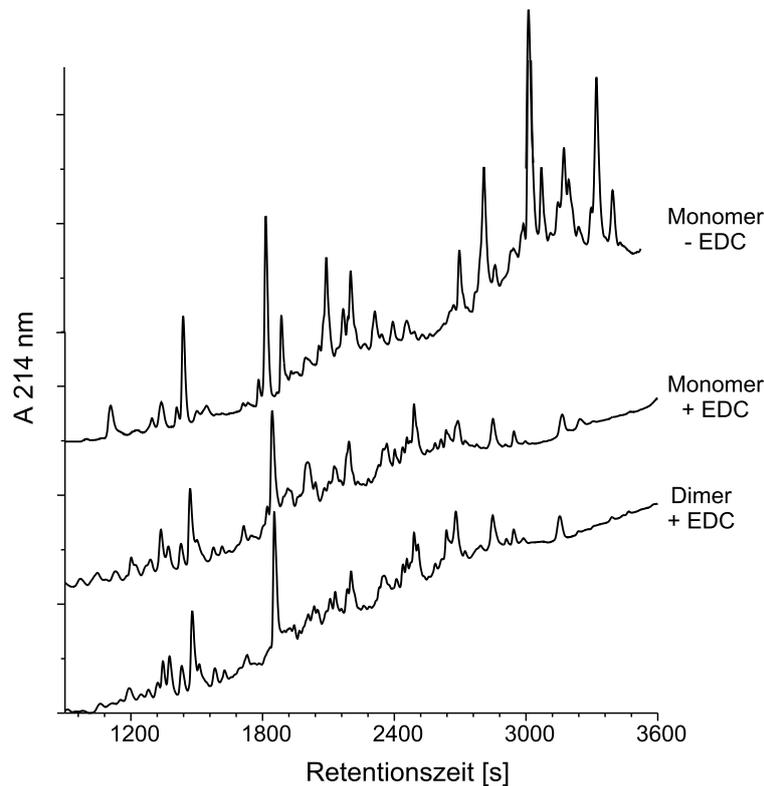


Abbildung 3.35: Reversed-phase Chromatographie von tryptischen Peptiden des PrP. Die Proben wurden mit einem Acetonitril/Wasser-Gradienten (je 0,1 % TFA) eluiert.

der PrP-Peptide zu erreichen. Abb. 3.35 zeigt Chromatogramme der PrP-Kontrolle sowie des EDC-Monomers und -Dimers. Es sind in allen Proben eine Reihe von Peptid-Peaks zu erkennen, so dass die Verdauung offensichtlich erfolgreich war. Es fällt auf, dass das Chromatogramm für die Monomer-Kontrolle sich relativ deutlich von denen der EDC-behandelten Proben unterscheidet. Das ist ein erster Hinweis darauf, dass das Crosslinking zu intramolekularen Verknüpfungen im Monomer geführt hat, da sich sonst zwischen Monomer-Kontrolle und EDC-Monomer keine Unterschiede ergeben dürften.

Weitere Aussagen anhand der Chromatogramme zu treffen ist schwierig, da bei der zur Verfügung stehenden Säule relativ hohe Mengen (50-100 μg) benötigt wurden. Es wurde demzufolge an der Nachweisgrenze gearbeitet, so dass der Peptidnachweis nicht optimal war. Diese Methode wurde aufgrund des hohen Materialverbrauchs nicht weiterverfolgt, sondern es wurde nach einem Verfahren zum direkten Nachweis der Peptide mittels Massenspektrometrie gesucht.

3.6.3 Nachweis und Identifizierung tryptischer Peptide des PrP mittels Elektrospray-Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie eignet sich sehr gut zur Analyse komplexer Peptidgemische. Hier wurde als Ionenquelle eine Nano-Elektrospray-Quelle eingesetzt, so dass Probenvolumina unter $1\ \mu\text{l}$ gemessen werden konnten. Um die Proben aus dem tryptischen Verdau mit ESI-MS analysieren zu können, mussten zunächst die Puffersalze aus den Proben entfernt werden. Dies geschah mittels sogenannter ZipTips. Dabei handelt es sich um Chromatographie-Material, das in eine Pipettenspitze eingelassen wurde. Hier wurden C_{18} ZipTips verwendet, d. h. es handelte sich um eine reversed phase „Chromatographie“. Da in ersten Versuchen festgestellt wurde, dass die vor dem Trypsin-Verdau eingesetzten 2 mM DTT zur Reduktion der Disulfidbrücke nicht ausreichend waren, wurden die Proben vor dem Entsalzen mit Ammoniumcarbonat-Puffer pH 7,8 neutralisiert (Endkonzentration: 0,1 M) und für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 25 mM DTT inkubiert.

Das Entsalzen erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Waschen der Spitze mit 100 % Methanol (2 x)
- Waschen der Spitze mit 60 % Methanol / 1 % Ameisensäure (3 x)
- Equilibrieren der Spitze mit 4 % Methanol / 1 % Ameisensäure (3 x)
- Auftragen der Probe (ca. $20\ \mu\text{l}$)
- Waschen mit 4 % Methanol / 1 % Ameisensäure (5-10 x)
- Elution der Probe in $5\ \mu\text{l}$ 80 % Methanol / 1 % Ameisensäure oder Fraktionierung in 20-80 % Methanol / 1 % Ameisensäure

Durch die Elution in einem kleineren Volumen kann die Konzentration der Probe erhöht werden. Probenlösung, die nicht sofort für die Messung verwendet wurde, konnte in silanisierten Eppendorf-Gefäßen bei -20°C gelagert werden, ohne dass ein Qualitätsverlust in den gemessenen Massenspektren auftrat. Um alle Peptide von der ZipTip zu eluieren, muss eine Methanolkonzentration von 80 % gewählt werden. Einige längere, hydrophobe Peptide (PrP 107-136, PrP 111-136, PrP 157-185 und PrP 165-185) werden bei der sonst üblichen Methanol-Konzentration von 60 % auf dem C_{18} -Material zurückgehalten. Mit den ZipTips kann auch eine Fraktionierung der Peptide erfolgen, z. B. durch Elution mit 20, 40 und 80 % Methanol.

Das eluierte Material kann direkt für die Messung mittels ESI-MS eingesetzt werden. Abb. 3.36 zeigt ein Übersichtsspektrum der tryptischen Peptide der PrP Monomer-Kontrolle in 80% Methanol. Das Massenspektrum wird von den (meist mehrfach geladenen) Peptid-Peaks dominiert. Das zeigt, dass die verwendete Präparationsmethode die Gewinnung hochkonzentrierter und reiner tryptischer Peptide des PrP ermöglicht.

In einem solchen Spektrum findet man eine Vielzahl von möglichen Peptid-Peaks. Neben den erwarteten tryptischen Fragmenten des PrP können Verunreinigungen, z. B. aus dem Lösungsmittel auftreten. Dabei handelt es sich meist um einfach geladene Peaks, deren Fragmentierungsmuster keiner Aminosäuresequenz zugeordnet werden kann. Auch unspezifische Abbrüche bzw. Trypsin-Schnitte können auftreten.

Im Prinzip kann die Zuordnung der Signale anhand der Massen der aufgrund der Spezifität des Trypsin erwarteten Peptide erfolgen. Die im ESI auftretenden

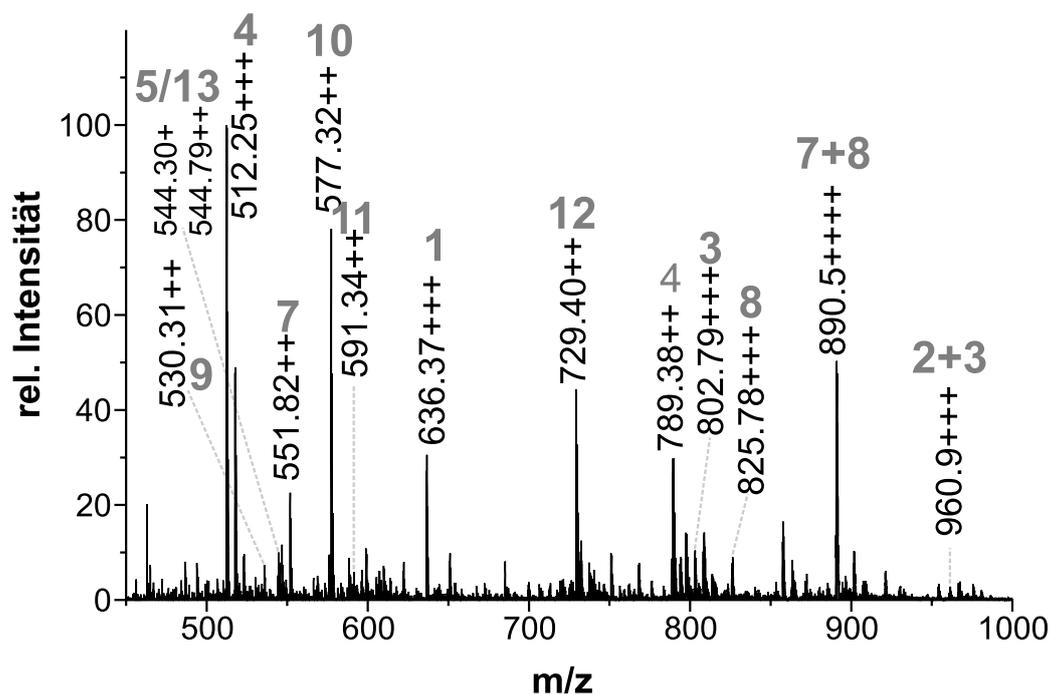


Abbildung 3.36: Übersicht-Massenspektrum von PrP-Peptiden nach tryptischem Verdau. Es wurden 20 μl der PrP Monomer-Kontrolle nach Trypsin-Verdau wie im Text beschrieben mittels ZipTip entsalzt und in 5 μl 80% Methanol/1% Ameisensäure eluiert. Zur Zuordnung der Peaks zur PrP-Sequenz s. Tab. 5.

Mehrfachladungen sind dabei kein Hindernis, denn der Ladungszustand kann anhand des Isotopenmusters erkannt und die Gesamtmasse berechnet werden (s. auch Abschnitt 2.16). Genauer ist es jedoch, die einzelnen Peptide zumindest teilweise zu sequenzieren. Beim Auftreten von Modifizierungen wie z. B. Methionin-Oxidation oder Carbamylierung des N-Terminus, die in solchen Peptidmischungen häufig auftreten, ist dies sogar die einzige Möglichkeit für eine zweifelsfreie Identifizierung. Die Sequenzierung der Peptide ist mittels MS/MS-Analyse möglich. Hier wird ein einzelnes Vorläufer-Ion ausgewählt und fragmentiert. Es entsteht ein Massenspektrum, das nur Fragmente dieses Vorläufer-Ions zeigt. Aus den Massendifferenzen in einem solchen Spektrum kann wie in Abschnitt 2.16 beschrieben die Sequenz des Peptids abgelesen werden.

Für die eindeutige Zuordnung der Signale im Übersichtsspektrum zu den aus der PrP-Sequenz und der Spezifität des Trypsin erwarteten Peptiden war es ausreichend, wenn ein Teil der Sequenz identifiziert werden konnte. Alle zugeordneten Peptide wurden mittels MS/MS identifiziert. Bei nicht gekennzeichneten Signalen handelt es sich entweder um Verunreinigungen oder unspezifische Schnittstellen bzw. Abbrüche. Ein Beispiel für ein MS/MS-Spektrum ist in Abb. 3.37 dargestellt. Das Vorläufer-Ion bei $m/z=729,4$ mit zweifacher Ladung wurde in der Kollisionszelle fragmentiert und die Massen der entstandenen Fragmente detektiert. Tryptische Peptide haben eine basische Aminosäure am C-Terminus, so dass in den Spektren normalerweise

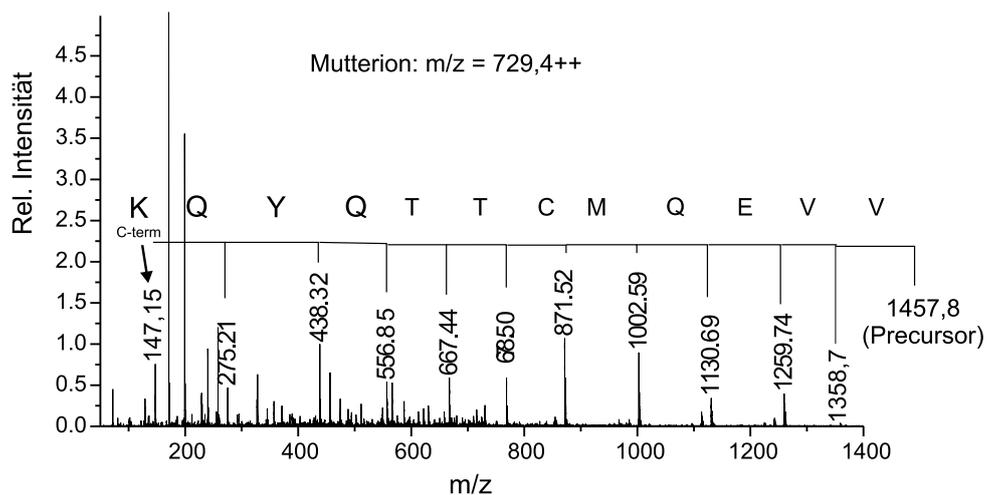


Abbildung 3.37: MS/MS-Spektrum des Peptids PrP 209-220. Anhand der Y-Serie war wie eingezeichnet die komplette Sequenzierung des Peptids möglich.

die Y-Serie dominiert (s. Abschnitt 2.16). Anhand der Massendifferenzen zwischen den Fragment-Ionen kann auf die Aminosäuresequenz geschlossen werden, wie in Abb. 3.37 angedeutet. Für das gezeigte Peptid sowie auch für die meisten anderen war eine komplette Sequenzierung möglich. Bei allen zugeordneten Peptiden wurde zumindest ein Großteil der Aminosäuresequenz bestimmt, so dass in allen Fällen eine zweifelsfreie Zuordnung der Peaks zu bestimmten PrP-Sequenzen erfolgen konnte.

In Abb. 3.36 sind die auf diese Art identifizierten Signale des Übersichtsspektrums mit Zahlen gekennzeichnet. Diese beziehen sich auf die durchnummerierten einzelnen PrP-Fragmente. Die Fragmente mit ihrer Aminosäuresequenz und den zugehörigen m/z -Werten und Ladungen sind in Tab. 5 angegeben. Bei vielen Peptiden wurde eine Massendifferenz von +43 zur theoretisch erwarteten Masse beobachtet. Das kann durch eine Carbamylierung der N-Termini aufgrund der hohen Harnstoffkonzentration (1 M während des Verdaus) erklärt werden. Die Sequenzierung ermöglichte jedoch eine eindeutige Zuordnung auch für diese Signale, wobei die Massendifferenz von 43 an den N-terminalen Aminosäuren detektiert wurde.

Die zugeordneten Signale ergeben mit 95 % eine sehr hohe Sequenzabdeckung. Lediglich das Peptid PrP 152-156 konnte im Massenspektrum nicht wiedergefunden werden. Das Fragment PrP 107-110 konnte alleine nicht nachgewiesen werden, jedoch wurde es zusammen mit dem nachfolgenden Peptid 111-136 detektiert. Da PrP 111-136 auch alleine gefunden wurde, muss man davon ausgehen, dass die Verdauung an dieser Stelle nicht vollständig erfolgte. In der Probe sind somit sowohl beide Peptide alleine als auch das unvollständig verdaute Produkt aus beiden Peptiden vorhanden, wobei nur PrP 107-110 alleine nicht nachgewiesen werden konnte. Sowohl bei PrP 107-111 als auch bei PrP 152-156 handelt es sich um sehr hydrophile, kleine Peptide. Sehr wahrscheinlich sind diese bei den Wasch-Schritten bereits von den ZipTips eluiert worden.

Nachdem fast die gesamte Sequenz des PrP in der Monomer-Kontrolle, also ohne EDC-Behandlung, im Massenspektrum identifiziert wurde, konnte ein Vergleich mit den Proben nach Crosslinker-Behandlung erfolgen.

Der genaue Vergleich der Übersichtsspektren zeigte ein zunächst überraschendes Ergebnis. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Spektren für das EDC-Monomer und das EDC-Dimer zu erkennen. Zwar traten teilweise leicht unterschiedliche Intensitäten der Peaks auf, oder es wurden bevorzugt andere Ladungszustände für ein bestimmtes Peptid detektiert. Jedoch war kein Unterschied in der Intensität für bestimmte PrP-Peptide detektierbar.

Tabelle 5: Tryptische Peptide des PrP

Die Zuordnung zu den Signalen des ESI-Übersichtsspektrums erfolgte anhand der Sequenzierungen mittels MS/MS-Analyse.

Nr.	AS	Sequenz	Peaks(m/z)	Ladung
1	90-106	GQGGGTHNQWNKPSKPK	636,37 ²	3+
2	107-110	TNMK	-	
2+3	107-136	TNMK AMSR	960,90 ¹	3+
3	111-136	HMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSR	802,79 ¹	3+
			788,45	3+
4	137-148	PMMHFGNDWEDR	512,25	3+
			517,58 ³	3+
			789,38 ¹	2+
5	149-151	YYR	544,30 ¹	1+
6	152-156	ENMNR	-	
7	157-164	YPNQVYYR	551,82	2+
7+8	157-185	YPNQ ITIK	890,50	4+
			1186,95	3+
8	165-185	PVDQYNNQNNFVHDCVNITIK	825,78	3+
9	186-194	QHTVTTTTTK	530,31 ¹	2+
10	195-204	GENFTETDIK	577,32	2+
11	205-208	IMER	594,34 ¹	1+
12	209-220	VVEQMCTTQYQK	729,40	2+
			750,90 ¹	2+
13	221-229	ESQAYYDGR	544,79	2+

¹Carbamylierung ²zweifache Carbamylierung ³oxidiertes Methionin

Im Gegensatz dazu war ein deutlicher Unterschied zwischen den Spektren mit und ohne Crosslinker-Behandlung, also Monomer-Kontrolle und EDC-Monomer bzw. EDC-Dimer, zu detektieren. Fast alle Peptide wurden in den EDC-behandelten Proben mit ähnlicher Intensität wie in der Kontrolle detektiert. Für zwei Peptide galt das jedoch nicht: Das Fragment PrP 195-204 war in der Kontrolle eines der prominentesten Signale. In den EDC-Proben dagegen war es kaum noch nachweisbar. Ähnlich verhielt es sich mit dem N-terminalen Fragment PrP 90-106: Dieses Peptid war zwar in allen Proben zu finden, die Intensität in der Kontrolle war jedoch reproduzierbar wesentlich höher als im EDC-Monomer und im EDC-Dimer. Die beiden in ihrer Intensität verringerten Peptide sind potentielle Kandidaten für eine Beteiligung an der Crosslinking-Reaktion. Theoretisch ist zu erwarten, dass in den

EDC-behandelten Proben nicht nur Peptide fehlen, sondern dass zusätzliche Peaks auftauchen, die auf quervernetzte Peptide zurückzuführen sind. Solche Signale konnten jedoch nicht gefunden werden. Zwar wurden in den EDC-Proben wenige neue Signale entdeckt, diese konnten jedoch durch MS/MS-Analyse eindeutig bestimmten Peptiden zugeordnet werden. Die Massendifferenz zum identifizierten Peptid war dabei in allen Fällen zu gering, als dass es sich um Crosslinking-Produkte handeln könnte. Diese sind wahrscheinlich beim Entsalzen mit ZipTips nicht mehr eluiert worden und/oder sind in zu geringer Konzentration vorhanden. Um sie nachweisen zu können, wäre eine spezifische Anreicherung der verknüpften Peptide nötig. Auf dieses Problem und mögliche Ansätze zu seiner Lösung wird in der Diskussion näher eingegangen.

Zur Darstellung der Intensitäts-Unterschiede für die beiden diskutierten PrP-Peptide wurden die entsprechenden Bereiche der Spektren vergrößert und sind in Abb. 3.38 dargestellt. Bei der Messung der Proben fiel auf, dass das Fragment 195-204 mit dem Signal bei $m/z=577,3$ zu Beginn einer Messung stets den prominentesten Peptid-Peak darstellte, während gegen Ende der Messungen (ca. 0,5-1 Stunde) das Fragment 137-148 ($m/z=512,3$ oder $m/z=789,4$) dominierte. Dieses Verhalten wurde in allen Messungen beobachtet und ist vermutlich auf eine Elektrophorese-ähnliche Auftrennung des Peptidgemisches in der Proben-Nadel während der Messung zurückzuführen.

Um die Intensitäten der genannten Peptide zu vergleichen, sind deshalb für PrP 195-204 drei Spektren ausgewählt worden, die alle zu Beginn einer Messreihe aufgezeichnet wurden (Abb. 3.38 A). Die relativen Intensitäten wurden auf das stärkste Signal als 100 % normiert, was bei der Kontrolle der entsprechende Peak selber mit $m/z=577,3$ war. Bei beiden EDC-behandelten Proben ist das Signal dagegen kaum noch nachweisbar.

Entsprechend wurden für PrP 90-106 Spektren vom Ende der jeweiligen Messungen ausgewählt, da die Intensität für den entsprechenden Peak bei $m/z=636,4$ im Laufe einer Messreihe zunahm (Abb. 3.38 B). Auch hier wurde der intensivste Peak auf 100 % normiert. Der Unterschied in den relativen Intensitäten ist in diesem Fall nicht ganz so dramatisch wie für PrP 195-204, doch wurde reproduzierbar eine deutliche Verringerung der Intensität in beiden EDC-behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle detektiert.

Die beiden Peptide PrP 90-106 und PrP 195-204 zeigen also sowohl im EDC-Monomer als auch im EDC-Dimer eine stark verminderte Intensität. Das spricht

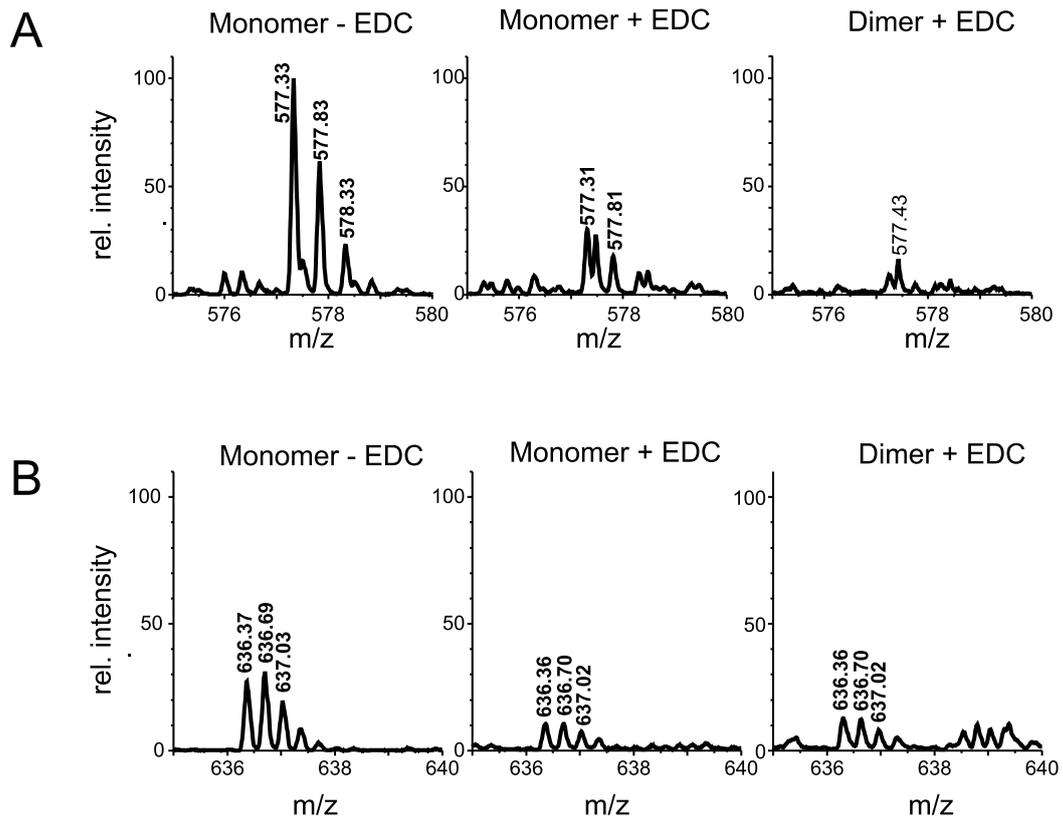


Abbildung 3.38: Vergleich der relativen Intensitäten für PrP 90-106 und PrP 195-204. **A** Intensitäten für den Peak bei $m/z=577,3$, der PrP 195-204 entspricht. Für alle drei PrP-Proben wurden Spektren ausgewählt, die zu Beginn einer Messung aufgezeichnet wurden. **B** PrP 90-106 mit $m/z=636,4$. Hier sind Spektren nach 0,5-1 h Messzeit gezeigt.

dafür, dass sowohl eine intramolekulare Verknüpfung innerhalb eines Monomers als auch die intermolekulare Verknüpfung zum Dimer unter anderem durch diese Peptide erfolgt ist.

4 Diskussion

Ein zentraler Schritt im Infektionsmechanismus der Prion-Krankheiten ist die Umwandlung der zellulären, nicht infektiösen Isoform PrP^C des Prion-Proteins in die pathogene Isoform PrP^{Sc}. Bei diesem Prozess kommt es zur Umfaltung der größtenteils α -helikalen Struktur des PrP^C in eine β -Faltblatt-reiche Struktur, verbunden mit Aggregation und z. T. auch der Bildung amyloider Fibrillen. Der genaue Mechanismus dieses Prozesses ist noch unverstanden. Genauso ist unklar, ob PrP^{Sc}-Ablagerungen selber oder aber Intermediate im Umwandlungsprozess die eigentlich pathogenen Moleküle sind (Chiesa & Harris, 2001).

Das in dieser Arbeit verwendete SDS-abhängige *in vitro*-Konversionssystem erlaubt bis zu einem gewissen Grad die Simulation der diskutierten Übergänge. Dabei wird das Prion-Protein durch Reduktion der SDS-Konzentration von einer monomeren, löslichen Form mit hauptsächlich α -helikaler bzw. random coil Sekundärstruktur in eine aggregierte, unlösliche Form mit hohem Anteil an β -Faltblatt-Struktur überführt. Eine Wiederherstellung von Infektiosität in diesem oder einem anderen *in vitro*-System wäre der endgültige Beweis der Prion-Hypothese. Das ist jedoch bis heute nicht gelungen.

Eine Voraussetzung zum Verständnis des Umwandlungsprozesses von PrP^C in PrP^{Sc} ist die Isolierung und Charakterisierung von Zwischenformen bzw. Intermediaten. Das beschriebene *in vitro*-Konversionssystem eignet sich dafür in idealer Weise, da das verwendete Prion-Protein in reiner Form vorliegt und deshalb gut charakterisiert werden kann. Ziel dieser Arbeit war es, im SDS-System Intermediate der beschriebenen Umwandlung zu isolieren, sie stabil in Lösung zu halten und damit eine genaue Charakterisierung zu ermöglichen.

4.1 Intermediate des Umwandlungs-Prozesses im SDS-System

Das System zur *in vitro* Konversion von PrP war bereits im Vorfeld dieser Arbeit etabliert. Es war bekannt, dass rekombinantes PrP 90-231 in 0,2% SDS als Monomer vorliegt und durch Verdünnen des SDS auf 0,02-0,01% SDS die Bildung von Multimeren bzw. Aggregaten induziert werden kann (Post *et al.*, 1998). Auf die Intermediate, die bei diesem Prozess eine Rolle spielen, gab es jedoch nur einige sehr indirekte Hinweise (Schäfer, 1997).

In dieser Arbeit konnten solche Intermediate erstmals direkt analysiert werden. Das war möglich, indem die SDS-Konzentration nicht sofort auf 0,01% gesenkt

wurde, sondern verschiedene SDS-Konzentrationen zwischen den Extremwerten betrachtet wurden. Strukturmessungen mittels Circular-Dichroismus zeigten dabei, dass die zuvor schon beobachtete Strukturänderung in einem sehr kleinen SDS-Konzentrationsbereich erfolgt. Zusammen mit dem sigmoiden Kurvenverlauf deutet das auf einen kooperativen Prozess hin.

Der Verlauf des Strukturübergangs ist absolut reproduzierbar. Die genaue Lage bezüglich der SDS-Konzentration kann jedoch leicht unterschiedlich sein. Auf diese Problematik wurde bereits in Abschnitt 3.1.1 eingegangen. Der beschriebene Übergang kann anhand der CD-Spektren und der Auftragung des Quotienten der Minima für die beiden betrachteten Strukturen (s. Abschnitt 3.1) verfolgt werden. Die nachfolgende Bestimmung der Oligomergrößen korrelierte stets mit der Lage in der Übergangskurve, die absolute SDS-Konzentration konnte jedoch von Experiment zu Experiment leicht variieren. Deshalb wurde für die Analyse der Oligomergrößen immer auch die Struktur bestimmt, bevor mit den Proben weitere Experimente gemacht wurden.

Erste Hinweise auf ein interessantes Intermediat im SDS-System konnten bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit gewonnen werden (Jansen, 1998) und sind hier im Zusammenhang mit den genaueren Messungen der Sekundärstruktur nochmals bestätigt worden. Es konnte durch den Vergleich von Sekundärstruktur und Löslichkeit gezeigt werden, dass bei bestimmten SDS-Konzentrationen PrP bereits die β -Faltblatt-reiche Struktur hat, aber noch komplett löslich ist. Dieses Intermediat („löslicher β -Faltblatt-Zustand“) wurde nun weiter charakterisiert. Zudem stellte sich die Frage, ob eine Selbstassoziation des Prion-Proteins bereits im α -helikalen Zustand möglich ist oder ob sie immer mit einer Umfaltung zu β -Faltblatt einhergeht.

Mit verschiedenen, einander ergänzenden Methoden konnte diese Frage eindeutig geklärt werden: Bei der schrittweisen Verdünnung des SDS entsteht zunächst ein PrP-Dimer, das aber noch die α -helikale Struktur zeigt. Weitere Verdünnung des SDS induziert die Bildung von β -Faltblatt-Struktur, verbunden mit einer Oligomerisierung des Moleküls.

Die Dimerisierung konnte mittels Größenausschluss-Chromatographie gezeigt werden. Dieses Ergebnis wurde im Vergleich zu einem Proteinstandard erzielt, der unter identischen Bedingungen (SDS-Konzentration, Puffer) vorlag. Um auszuschließen, dass die SDS-Bindung an den Proteinstandard sich von der Bindung an PrP unterscheidet, wurden diese Ergebnisse nochmals mit Hilfe kovalent verknüpfter PrP-

Dimere als Standard bestätigt. Chemisches Crosslinking und analytische Ultrazentrifugation haben die Existenz dieser α -Dimere ebenfalls bestätigt. Das chemische Crosslinking hat dabei im Vergleich zum Größenausschluss den Nachteil, dass die relativen Anteile verschiedener Spezies (z. B. Monomer und Dimer) nicht unbedingt quantitativ, also den tatsächlichen Konzentrationsverhältnissen entsprechend, wiedergegeben werden. Bei der analytischen Ultrazentrifugation war aufgrund des sich einstellenden SDS-Konzentrationsprofils in der Messzelle eine genaue Auswertung nicht möglich, doch konnte auch mit dieser Methode eindeutig ein im Vergleich zum Monomer erhöhtes Molekulargewicht detektiert werden.

Für die Bestimmung der Größe des „löslichen β -Faltblatt-Zustandes“ war der S-Lauf in der Analytischen Ultrazentrifuge die Methode der Wahl. Der ermittelte s-Wert von 15 S entspricht etwa 12-16 PrP-Molekülen. Die Messung der SDS-Bindung an monomeres PrP in 0,2 % SDS ermöglichte dabei eine Abschätzung für die beiden Extremfälle, dass an das Oligomer gar kein SDS mehr bindet bzw. dass noch genauso viel SDS gebunden ist wie an das Monomer. Beide Abschätzungen lieferten fast das selbe Ergebnis (13,5 bzw. 14,6 PrP-Moleküle), so dass der angegebene Größenbereich von 12-16 PrP-Molekülen als konservative Abschätzung auf jeden Fall zutreffen sollte. Auch eine Größenverteilung mit einem Maximum bei ca. 14 PrP-Molekülen ist möglich.

Zusammengefasst konnten also mit verschiedenen, einander ergänzenden Methoden zwei Intermediate des Umwandlungsprozesses charakterisiert werden:

1. Ein PrP-Dimer, das vorwiegend α -helikale Struktur hat und das bei SDS-Konzentrationen kurz oberhalb der Strukturumwandlung zu β -Faltblatt vorliegt.
2. Ein PrP-Oligomer aus ca. 12-16 PrP-Molekülen, das bei SDS-Konzentrationen direkt unterhalb des Strukturübergangs entsteht.

Diese Intermediate werden im Folgenden, wie bereits im Ergebnisteil, als α -Dimer bzw. β -Oligomer bezeichnet. Das SDS-abhängige *in vitro*-Konversionssystem, ergänzt durch die beschriebenen Intermediate, ist in Abb. 4.39 dargestellt. Es ist dabei nicht unbedingt gesagt, ob die SDS-abhängig charakterisierten Intermediate auch kinetische Intermediate sind. Bei der direkten Verdünnung entstehen evtl. andere oder zusätzliche Zwischenformen, die nach der Gleichgewichtseinstellung in mittleren SDS-Konzentrationen nicht zu finden sind.

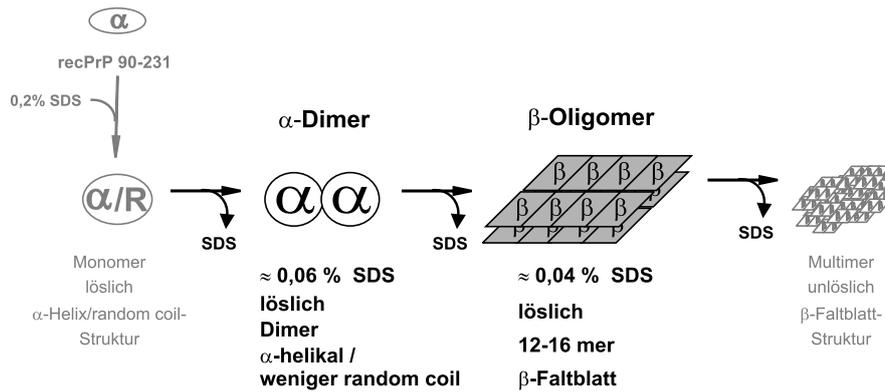


Abbildung 4.39: Schema des SDS-abhängigen *in vitro*-Konversionssystems. Die in diese Arbeit gefundenen Intermediate sind hervorgehoben; Einzelheiten s. Text.

4.2 PrP-Dimere und Oligomere in anderen Systemen

Das beschriebene SDS-System ist nicht die einzige Möglichkeit zur Erzeugung von Intermediaten mit teils PrP^C und teils PrP^{Sc}-Eigenschaften.

So ist es z. B. möglich, durch den Einsatz von denaturierenden Agenzien wie Guanidinium Hydrochlorid oder Harnstoff und / oder hoher Salzkonzentration in rekombinanten PrP-Molekülen einen Übergang von α -helikaler Struktur zu einer β -Faltblatt-reicheren Struktur zu induzieren. Dieses Prinzip wird von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen erfolgreich angewendet (Swietnicki *et al.*, 2000; Morillas *et al.*, 2001; Baskakov *et al.*, 2001, 2002). Die Induktion löslicher Oligomere mit einem hohen Anteil an β -Faltblatt-Struktur erfolgte durch Inkubation des Proteins bei saurem pH (pH 4) und 1 M Guanidinium Hydrochlorid. Der Strukturübergang war dabei ähnlich wie in dieser Arbeit beschrieben langsam, d. h. im Laufe mehrerer Stunden. Dabei konnten beide Gruppen zeigen, dass sowohl die denaturierenden Eigenschaften des Guanidinium als auch seine ionischen Eigenschaften wichtig sind. Harnstoff als nichtionisches Denaturierungsmittel war alleine nicht in der Lage, den beschriebenen Übergang zu induzieren. In Gegenwart von Harnstoff und Salz (3,5-5 M Urea, 150-200 mM NaCl) ist dagegen das gleiche Verhalten wie mit Guanidinium zu beobachten. Das lösliche β -Oligomer konnte nur dann stabil gehalten werden, wenn nach der Strukturumwandlung und Oligomerisierung ein Pufferaustausch zu niedrigeren Harnstoff- bzw. Salzkonzentrationen erfolgte (Baskakov *et al.*, 2001). Bei gleichbleibenden Pufferbedingungen wurde im Zeitbereich von mehreren Stunden

bis Tagen eine fortschreitende Aggregation und für einen Teil der Probe die Bildung amyloider Fibrillen beobachtet.

Diese Eigenschaft der vorgestellten Oligomere stellt einen wesentlichen Unterschied zu den in dieser Arbeit charakterisierten β -Oligomeren dar. Durch SDS induzierte PrP β -Oligomere sind im Zeitbereich von Tagen stabil. Auch nach 1-2 Wochen war die Struktur unverändert und die Probe blieb löslich (Daten nicht gezeigt). Diese Langzeitstabilität ist eine wichtige Voraussetzung für weitere Untersuchungen wie z. B. hochauflösende Strukturaufklärung.

Die Angaben zur Größe der β -Oligomere unterscheiden sich je nach den genauen Bedingungen. Nach Baskakov *et al.* (2002) handelt es sich um Oktamere, wie mit Massenspektrometrie gezeigt wurde. Morillas *et al.* (2001) beschreiben dagegen ein mit Größenausschluss-Chromatographie ermitteltes apparentes Molekulargewicht von ca. 400 kDa, was etwa 25 recPrP 90-231 Molekülen entspricht. Die in dieser Arbeit ermittelte Größe von 12-16 Molekülen liegt zwischen diesen beiden Größen. Die genaue Größe von β -Oligomeren ist dabei wahrscheinlich stark von den Bedingungen wie Proteinkonzentration, Temperatur oder Salzkonzentration abhängig.

In keiner der erwähnten Studien konnten dimere Intermediate gefunden werden. Diese sind jedoch zur Erforschung des Umwandlungsprozesses besonders wichtig, da sie gewissermaßen den „ersten Kontakt“ zwischen zwei PrP-Molekülen darstellen. Das Auftreten von α -Dimeren ist zudem ein Hinweis darauf, dass die Umwandlung in β -Faltblatt-Struktur nicht innerhalb einzelner Monomere erfolgt, sondern die Assoziation mehrerer (>2) PrP-Moleküle erfordert. Zudem zeigt es, dass eine Selbsssoziation des PrP auch ohne eine drastische Strukturänderung möglich ist.

Eine weitere Möglichkeit zur Induktion von β -Faltblatt-Struktur in recPrP wurde im Zusammenhang mit einer Reduktion der Disulfidbrücke beschrieben (Jackson *et al.*, 1999). Durch Erniedrigung des pH-Wertes auf 4 und reduzierende Bedingungen konnte eine β -Faltblatt-reiche Struktur eingestellt werden, wobei PrP als Monomer vorlag. Dies ist die einzige Beschreibung einer monomeren β -Faltblatt-reichen Struktur für PrP. Durch Zugabe von Salz konnte dieses Monomer zur Aggregation und zur Bildung amyloider Fibrillen gebracht werden. Eine Reduktion der Disulfidbrücke als Voraussetzung für die Bildung des infektiösen PrP^{Sc} erscheint jedoch unwahrscheinlich, da die Disulfidbrücke sowohl in PrP^C als auch in PrP^{Sc} oxidiert vorliegt (Turk *et al.*, 1988). Zudem konnte sowohl in einem *in vitro* System als auch in Zellkulturen gezeigt werden, dass die Disulfidbrücke eine Voraussetzung für die

Bildung von PK-resistentem PrP 27-30 ist (Herrmann & Caughey, 1998; Muramoto *et al.*, 1996).

Ein Modell für die Struktur eines PrP 27-30 Oligomers wurde mittels Elektronenmikroskopie-Daten an zweidimensionalen PrP 27-30 Kristallen aufgestellt (Wille *et al.*, 2002, s. auch Abb. 1.4). Infektiöse Prion-Stäbchen könnten aus diesen Kristallen aufgebaut sein. Das ist ein Hinweis darauf, dass PrP β -Oligomere tatsächlich *in vivo* eine Rolle spielen könnten. Die Autoren sehen ein Trimer aus Dimeren, d. h. insgesamt sechs PrP-Moleküle pro Oligomer, als das wahrscheinlichste Modell an. Als Größe des β -Oligomers wurden in dieser Arbeit 12-16 Moleküle bestimmt. Ein Oligomer aus 12 PrP Molekülen, das zwei der von Wille beschriebenen Hexamere enthält, wäre somit im Bereich des Möglichen.

4.3 SDS als Membranumgebung?

Die Konversion des PrP zu einer β -Faltblatt-reicheren, oligomeren bzw. multimeren Form, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, funktioniert bei neutralem pH und unter oxidierenden Bedingungen. Im Vergleich dazu arbeiten alle anderen Systeme, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, bei niedrigen pH-Werten (meist pH 4). Welche pH-Werte der tatsächlichen *in vivo*-Situation besser entsprechen, ist nicht genau bekannt, da nicht klar ist, wo in der Zelle der eigentliche Umwandlungsprozess abläuft. Diskutiert werden späte Endosomen bzw. Lysosomen (Clarke *et al.*, 2001, und dort angegebene Referenzen), in denen saure pH-Werte vorliegen. Viele Hinweise deuten dagegen auf Caveolae-ähnliche Bereiche in der Plasmamembran als Umwandlungs-ort, wo ein neutraler pH zu erwarten wäre (Taraboulos *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996; Kaneko *et al.*, 1997a). SDS gilt allgemein als eine membranähnliche Umgebung, da seine chemischen Eigenschaften denen von Membranlipiden ähneln. Die Inkubation in SDS könnte also eine Membranumgebung simulieren. Durch Verdünnen des SDS würde dann ein Austreten aus der Membran simuliert, das die Strukturumwandlung und Aggregation induziert. Zur Zeit durchgeführte Arbeiten zur Bestimmung der PrP^C-Struktur in Modellmembranen bzw. direkt nach dem Austritt aus der Membran sollen helfen, diese Hypothese zu untersuchen (Doktorarbeit Kerstin Elfrink).

4.4 Interaktionsstellen im PrP-Dimer

Im Zusammenhang mit dem Nachweis der Intermediate im SDS-System wurde chemisches Crosslinking eingesetzt, das besonders für das α -Dimer sehr effizient war. Die durch den Crosslinker eingefügte neue kovalente Bindung sollte nun genutzt werden, um direkte biochemische Daten zur Struktur des Dimers zu gewinnen. Im Idealfall wäre es möglich, die genaue Lage der Verknüpfung bzw. die beteiligten Aminosäureseitenketten zu bestimmen.

Es konnte ein Verfahren zur Herstellung definierter Peptidfragmente aus den Crosslink-Proben etabliert werden, das die zur Messung benötigten Peptide in hoher Ausbeute und hoher Reinheit liefert. Das ist eine wesentliche Voraussetzung für die Bestimmung der Crosslink-Stellen. Für die vorhandene Fragestellung müssen nach Möglichkeit alle beim Verdau entstandenen Peptide des PrP im Massenspektrum nachgewiesen werden, damit Unterschiede mit bzw. ohne Crosslink bzw. zwischen Monomer und Dimer gefunden werden können. Bei Messungen zur Identifizierung unbekannter Proteine über Datenbanken, die im Prinzip genauso funktionieren, reicht dagegen die Bestimmung eines sogenannten „sequence-tags“ von wenigen Aminosäuren Länge aus, so dass in diesem Fall die Konzentration der Peptide viel geringer sein darf.

Es konnte mit dem in den Abschnitten 3.6.1 bis 3.6.3 beschriebenen Verfahren eine Sequenzabdeckung von 96 % erzielt werden, was den geforderten Ansprüchen gerecht wird. Die gezielte Suche nach Unterschieden in den verglichenen Proben (s. Abschnitt 3.6) war also möglich.

4.4.1 Zwei Peptide als Kandidaten für die Crosslink-Stelle

Beim Vergleich der Massenspektren konnten zwei Peptide identifiziert werden, die in beiden EDC-behandelten Proben, also Monomer und Dimer, eine gegenüber der Kontrolle deutlich verringerte Intensität aufwiesen. Dabei handelt es sich um PrP90-106 und PrP195-204 (zu den verschiedenen PrP-Peptiden s. auch Tab. 5).

Diese beiden Peptide waren sowohl im EDC-behandelten PrP-Monomer als auch im EDC-behandelten PrP-Dimer nur mit deutlich verringerter Intensität detektierbar. Produkte eines Crosslinks der beiden Peptide konnten nicht gefunden werden. Bevor auf diese beiden Punkte genauer eingegangen wird, soll zunächst diskutiert werden, ob eine Verknüpfung der beiden Peptide durch EDC überhaupt möglich wäre.

Wie bereits erwähnt, vermittelt EDC die Bildung einer Isopeptid-Bindung zwischen sauren Seitenketten (Asp, Glu) und Lysin bzw. dem N-Terminus. Dabei ist zu erwarten, dass durch EDC verknüpfte Lysinreste nicht mehr von Trypsin geschnitten werden, da die positive Ladung am Lysin bzw. Arginin für die Erkennung entscheidend ist. Wird also ein Lysinrest durch EDC verknüpft, der ohne Crosslink von Trypsin als Schnittstelle erkannt wurde, so sollte auch das nachfolgende Peptid nicht mehr einzeln detektierbar sein.

Im PrP90-106 gibt es drei Lysinreste. Lys101 und Lys104 werden von Trypsin nicht als Schnittstelle erkannt, da in beiden Fällen in der Sequenz ein Prolin folgt. Da es sich bei PrP90-106 um das N-terminale Fragment des verwendeten PrP90-231 handelt, würde zudem auch der N-Terminus als freie Aminogruppe zur Verfügung stehen. PrP195-204 dagegen besitzt drei saure Reste. Eine Verknüpfung der beiden Peptide wäre also gut möglich, da es mehrere Möglichkeiten für eine Isopeptid-Bindung gibt. Die C-terminalen Lysine beider Peptide, also Lys106 und Lys204, sind dabei als Reaktionspartner unwahrscheinlich. Ein Crosslink an einem dieser Lysin-Reste würde dazu führen, dass die Schnittstelle von Trypsin nicht mehr erkannt wird und die nachfolgenden Peptide, also PrP107-136 bzw. PrP205-208, ebenfalls mit deutlich verminderter Intensität detektiert werden. Ein solcher Effekt konnte nicht gezeigt werden, ist jedoch auch nicht mit Sicherheit auszuschließen. Es bleiben also Lys101 und Lys104 bzw. der N-Terminus und Glu196, Glu200 und Asp202 als mögliche Reaktionspartner. Die Sequenzen beider Peptide und die diskutierten potentiellen Crosslink-Stellen sind in Abb. 4.40 dargestellt. Auch die Bildung mehrerer Isopeptid-Bindungen ist vorstellbar.

In der Aminosäuresequenz des PrP gibt es insgesamt acht Lysin-, sechs Asparaginsäure- und sieben Glutaminsäure-Reste. Welche davon sind für eine Verknüpfung wahrscheinlich? Für den C-terminalen Bereich des PrP, ab Aminosäure 129, konnte mittels NMR eine geordnete Struktur bestimmt werden, während der N-terminale Bereich, hier also die Aminosäuren 90-128, als mehr oder weniger flexibel beschrieben wird (vgl. Abb. 1.3). Da die NMR-Struktur in anderen Lösungsbedingungen gemessen wurde (pH 5,2; kein SDS), ist sie nur ein Anhaltspunkt für die Struktur des PrP in SDS. Im strukturierten C-Terminus befinden sich vier der acht Lysine. Der kürzeste Abstand zwischen einer Carboxyl-Gruppe und einer Aminogruppe eines Lysins laut NMR-Struktur beträgt dabei 4,8 Å (Glu146 und Lysin204, s. Abb. 4.41). Als Salzbrücke im Protein werden entsprechende Gruppen im Abstand von weniger als 4 Å angesehen (Barlow & Thornton, 1983). Definitionsgemäß handelt

es sich also nicht um eine Salzbrücke, doch eine EDC-vermittelte Verknüpfung erscheint dennoch gut möglich. Die Massenspektren sprechen jedoch gegen eine solche Reaktion, denn für das Peptid PrP137-148 konnte keine signifikante Reduktion der Intensität nach Crosslinking beobachtet werden, obwohl PrP137-148 eines der prominentesten Signale im Spektrum darstellte. Deshalb erscheint es unwahrscheinlich, dass die verminderte Intensität für PrP195-204 auf einer Bindung des Lys204 an Glu146 beruht. Alle anderen laut NMR-Struktur ermittelten Entfernungen für Lysin- und Glu/Asp-Reste sind noch größer (nächstkleinere Entfernung: Glu196-Lys194 mit 7,2Å), so dass andere Verknüpfungen in diesem Bereich des Moleküls ebenfalls unwahrscheinlich sind.

Die Beteiligung eines oder mehrerer der vier Lysine im flexiblen N-terminalen Bereich des PrP90-231 an der Crosslinking-Reaktion erscheint wesentlich wahrscheinlicher. Lys101 bzw. Lys104 als Teil einer neu entstandenen Isopeptid-Bindung sind somit sehr plausibel. Lys106 und Lys110 sind aus den oben genannten Gründen weniger wahrscheinliche, aber ebenfalls mögliche Crosslink-Stellen.

Asparagin- und Glutaminsäure-Reste sind im C-terminalen, also strukturierten, Bereich des Moleküls mehr oder weniger gleichmäßig verteilt. Aufgrund der Sequenz und der NMR-Struktur kann hier keine Voraussage über am Crosslink beteiligte Aminosäuren getroffen werden. Die Massenspektren zeigten jedoch für das Peptid PrP195-204 eine wesentlich deutlichere Verminderung der Intensität als für PrP90-106. In der Kontrolle handelte es sich um das Signal mit der höchsten Intensität, während es in den Crosslink-Proben kaum noch nachweisbar war. Zudem

PrP90-106

**NH₂-Gly-Gln-Gly-Gly-Gly-Thr-His-Asn-Gln-Trp-Asn-
Lys₁₀₁-Pro-Ser-Lys₁₀₄-Pro-Lys₁₀₆-Thr-Asn-Met-Lys**

Gly-Glu₁₉₆-Asn-Phe-Thr-Glu₂₀₀-Thr-Asp₂₀₂-Ile-Lys

PrP195-204

Abbildung 4.40: Aminosäuresequenz der als „Crosslinking-Kandidaten“ diskutierten PrP-Peptide mit möglichen Angriffsstellen für EDC. Im Peptid 90-106 gibt es drei freie NH₂-Gruppen, in PrP195-204 drei freie Carbonsäuregruppen. Diese sind jeweils grau unterlegt.

besitzt es drei saure Reste, die als Bindungspartner für die Lysine des PrP90-106 zur Verfügung stehen. Eine Beteiligung eines dieser drei Reste am Crosslink erscheint damit ebenfalls plausibel.

4.4.2 Warum wurden keine Crosslink-Produkte identifiziert?

Wie in Abschnitt 3.6 erklärt, würde man beim Vergleich der drei Proben PrP-Kontrolle, PrP als EDC-Monomer und PrP als EDC-Dimer nicht nur das Verschwinden am Crosslink beteiligter Peptide, sondern auch das Auftauchen neuer Signale erwarten. Diese würden den neu entstandenen verknüpften Peptiden entsprechen. Solche zusätzlichen neuen Peptide konnten in keiner Probe nachgewiesen werden. Das kann mehrere Gründe haben. Zunächst wäre es möglich, dass es nicht nur eine, sondern mehrere Crosslink-Stellen im PrP gibt. Dann würden unterschiedliche verknüpfte Peptide entstehen. Wenn die möglichen Crosslink-Stellen mehr oder weniger zufällig verknüpft werden, könnte so eine Reihe verschiedener Produkte mit jeweils relativ geringer Konzentration entstehen. Diese wären dann vor dem hohen Hintergrund der nicht verknüpften Peptide nicht mehr nachweisbar. In der Literatur sind Beispiele für sehr heterogene Crosslink-Produkte zu finden (Mauk & Mauk, 1989).

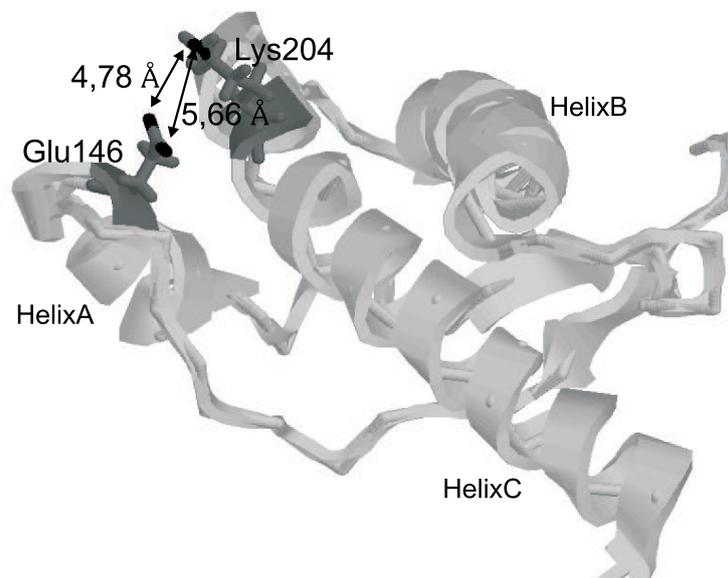


Abbildung 4.41: Mögliche Salzbrücken zwischen Lysin und Asp/Glu laut der NMR-Struktur des PrP90-231 aus Hamster. Der kürzeste Abstand zwischen positiver Ladung an Lysin-Resten und negativer Ladung an sauren Resten beträgt 4,8 Å zwischen Glu146 und Lys204. Beide Seitenketten sind hervorgehoben.

Ein völlig unspezifisches Crosslinking an sehr vielen verschiedenen Stellen im Molekül erscheint jedoch unwahrscheinlich, da für genau zwei Peptide eine deutliche Verringerung der Signalintensität beobachtet wurde und beide aufgrund ihrer Sequenz einen Crosslink miteinander ausbilden können. Allerdings konnte für beide kein vollständiges Verschwinden des Signals gezeigt werden, so dass zu einem geringeren Teil auch andere Peptide an der Reaktion beteiligt sein müssen. Möglich wäre auch, dass die beiden diskutierten Peptide in der nativen Struktur des Monomeres bzw. Dimers so liegen, dass mehrere Crosslinks zwischen ihnen entstehen können. Bei drei Lysinen und drei Säuregruppen ergeben sich rein rechnerisch schon 9 Möglichkeiten für einen einzelnen bzw. 36 Möglichkeiten für 1-3 Crosslinks. Wenn mehrere davon möglich sind und mehr oder weniger zufällig gebildet werden, wären ebenfalls mehrere Crosslink-Produkte in jeweils niedriger Konzentration die Folge. Die Massen für jedes der Produkte mit genau einer bzw. zwei oder drei Verknüpfungen sind zwar gleich. Es können sich jedoch Unterschiede bei der Anlagerung der positiven Ladungen während des ESI-Prozesses ergeben, so dass verschiedene Crosslink-Produkte mit gleicher Masse nicht unbedingt das gleiche m/z -Verhältnis aufweisen müssen und im Massenspektrum als verschiedene Signale auftreten können.

Die gesuchten Peptide mit neuer Isopeptid-Bindung unterscheiden sich in ihren Eigenschaften von den anderen Peptiden dadurch, dass sie verzweigt sind und außerdem im Mittel größer und weniger hydrophil, denn durch die neue Bindung gehen zwei Ladungen verloren. Diese Eigenschaften können ebenfalls der Grund für eine prinzipiell schlechtere Nachweisbarkeit dieser Peptide sein. Große, unlösliche Peptide werden vom C_{18} -Material der ZipTips, die zum Entsalzen verwendet wurden, nur schlecht eluiert. Selbst die größeren, hydrophoberen Peptide, die aus der PrP-Kontrolle beim Trypsin-Verdau entstehen, konnten nur dadurch eluiert werden, dass die Methanol-Konzentration bei der Elution gegenüber den Hersteller-Angaben erhöht wurde (vgl. Abschnitt 3.6.3). Crosslink-Produkte könnten noch hydrophober sein, so dass sie evtl. nur sehr schlecht wieder eluiert werden. Zudem ist nicht klar, welchen Einfluss die durch die Isopeptid-Bindung eingefügte Verzweigung auf das Elutionsverhalten hat. Naheliegend war der Versuch, das C_{18} -Material gegen C_4 -Material auszutauschen, das für größere Peptide oder ganze Proteine besser geeignet ist. Auch nach Entsalzen mit C_4 -Material konnten jedoch keine Crosslink-Produkte nachgewiesen werden, die Nachweisbarkeit der anderen PrP-Peptide war dagegen deutlich schlechter (Daten nicht gezeigt).

Um in Zukunft einen direkten Nachweis der Crosslink-Produkte zu ermöglichen, wäre deren Anreicherung, z. B. mit chromatographischen Methoden, ein sinnvoller Ansatz.

4.4.3 Warum gibt es keine Unterschiede zwischen EDC-Monomer und EDC-Dimer?

Spezifische EDC-vermittelte Verknüpfungen im PrP-Dimer sollten Aufschluss über Wechselwirkungen bzw. benachbarte Aminosäurereste im Dimer geben. Die Dimer-spezifischen Crosslink-Stellen wurden zunächst als Unterschiede zwischen EDC-behandeltem Monomer und Dimer erwartet. Ein solcher Unterschied konnte jedoch nicht gezeigt werden. Ähnliches gilt auch für die Analyse der Peptidgemische nach Trypsin-Verdau mittels reversed-phase-Chromatographie (s. Abschnitt 3.6.2). Zudem wurde in einer Diplomarbeit untersucht, ob das Crosslinking die α -helikale Struktur des Monomers bzw. des Dimers stabilisieren kann (Kaimann, 2002). Es zeigte sich, dass sowohl das EDC-Monomer als auch das EDC-Dimer im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle deutlich schlechter durch Ausdünnen von SDS zur Bildung von β -Faltblatt-Struktur gebracht werden konnten. Das ist ein direkter Hinweis auf das Vorhandensein intramolekularer Crosslinks, da sich sonst das Verhalten des Monomers mit und ohne EDC-Behandlung nicht unterscheiden dürfte. Unterschiedliche experimentelle Ansätze (reversed phase Chromatographie, Stabilisierung der α -Helix-Struktur nach Crosslinking, Analyse der Peptidgemische mit Massenspektrometrie) haben also übereinstimmend gezeigt, dass man deutliche Unterschiede zwischen EDC-behandelten Proben und der Kontrolle, aber keine Unterschiede zwischen EDC-Monomer und EDC-Dimer findet.

Für das Fehlen solcher Unterschiede bei der massenspektrometrischen Analyse gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Ähnlich wie bereits im vorigen Abschnitt für das Fehlen verknüpfter Peptide diskutiert, könnte auch bei der Bildung intermolekularer Crosslinks eine Vielzahl von Möglichkeiten existieren. Dann könnten heterogene Crosslink-Produkte entstehen, die alle nur in geringer Konzentration vorliegen und deshalb nicht nachweisbar waren. Eine andere Erklärung wäre, dass es gar keinen Unterschied zwischen den Verknüpfungen im EDC-Monomer und EDC-Dimer gibt. Das würde erklären, dass mit keiner Methode ein unterschiedliches Verhalten detektiert werden konnte. In diesem Fall müssten also identische Peptide entweder *inter*- oder *intra*-molekular verknüpft sein.

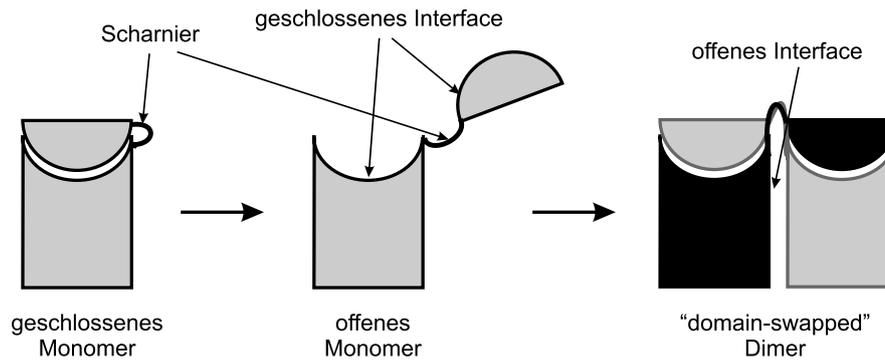


Abbildung 4.42: Schema zur Dimerisierung durch 3D domain swapping. Die Dimerisierung erfolgt durch Austausch einer Domäne zwischen zwei Monomeren. Weitere Einzelheiten s. Text; Abb. nach Liu & Eisenberg (2002).

Ein solches Phänomen würde zum Beispiel dann auftreten, wenn die Dimerbildung durch „3D domain swapping“ erfolgt. Das bedeutet, dass Monomer und Dimer im Prinzip die gleiche dreidimensionale Struktur haben, dabei aber einzelne Strukturelemente zwischen Monomer und Dimer ausgetauscht sind. Darauf soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

4.4.4 Dimer-Bildung durch „3D domain swapping“

Als 3D domain swapping wird das Austauschen einzelner Strukturelemente zwischen zwei Protein-Monomeren zur Bildung eines Dimers oder Oligomers bezeichnet. Dieses Phänomen wurde bereits für etwa 40 Proteine beschrieben (zur Übersicht s. Liu & Eisenberg, 2002). Der Mechanismus der Dimerisierung durch domain swapping ist in Abb. 4.42 dargestellt. Zwei strukturierte Bereiche innerhalb eines Protein-Monomers sind durch einen flexiblen Bereich, ein „Scharnier“ (engl. hinge-loop) verbunden. Unter bestimmten Bedingungen kann durch eine Konformationsänderung dieses flexiblen Bereiches das Scharnier aufklappen, so dass die beiden Bereiche räumlich weiter voneinander getrennt sind. Dann kann sich aus zwei Monomeren ein Dimer bilden, bei dem die gleichen Strukturbereiche interagieren, jedoch diesmal aus zwei verschiedenen Monomeren. Der Bereich, der sich in der Struktur des Monomers und des durch domain swapping gebildeten Dimers nicht unterscheidet, wird dabei als „geschlossenes interface“ bezeichnet, zusätzliche Berührungsbereiche im Dimer als „offenes interface“.

Für ein durch domain swapping gebildetes PrP-Dimer könnte der Fall eintreten, dass durch den Crosslinker EDC vermittelte Verknüpfungen nur im Bereich des closed interface möglich sind. Dann wäre kein Unterschied zwischen den verknüpften Peptiden im EDC-behandelten Monomer und -Dimer zu erwarten. Ein solches Modell könnte demnach die gemessenen Daten erklären. In den meisten beschriebenen Fällen von domain swapping wurden terminale Bereiche der Proteine ausgetauscht (Liu & Eisenberg, 2002). Das passt gut zu der Annahme, dass das N-terminale Peptid PrP90-106 am Crosslink beteiligt war.

Für rekombinantes PrP wurde bereits eine Struktur für ein durch domain swapping gebildetes Dimer beschrieben (Knaus *et al.*, 2001). Dabei handelt es sich um eine Röntgenstrukturanalyse an humanem rekombinanten PrP 90-231. Im Kristall war der N-terminale Bereich von Aminosäure 90 bis 118 allerdings nicht mehr vorhanden. Die Autoren erklären das mit einer leichten Protease-Verunreinigung bei der Kristallisation. Die Struktur der beiden Monomere entsprach fast genau der NMR-Struktur, wobei die Helix 3 (Aminosäure 199-225) zwischen den beiden Monomeren ausgetauscht („domain-swapped“) war. Um das Umklappen dieser Helix zu ermöglichen, muss allerdings zunächst die Disulfidbrücke zwischen Helix 2 und Helix 3 (vgl. Abb. 1.2) gelöst und im Dimer wieder neu gebildet werden. Dieser Prozess muss ebenfalls bei der Kristallbildung abgelaufen sein. Ist die Struktur des in dieser Arbeit beschriebenen Dimers ähnlich zu dieser Dimer-Kristallstruktur? Das von Knaus *et al.* (2001) beschriebene Dimer besitzt eine intermolekulare Disulfidbrücke. Demzufolge muss eine solche Struktur in einer nichtreduzierenden SDS-PAGE nachweisbar sein. Das in dieser Arbeit beschriebene Dimer konnte ohne vorheriges Crosslinking jedoch im nichtreduzierenden Gel nicht nachgewiesen werden. Zudem wurde stets unter oxidierenden Bedingungen gearbeitet, so dass eine Reduktion der Disulfidbrücke unwahrscheinlich erscheint. Die Struktur des beschriebenen Dimers scheint demnach anders zu sein als von Knaus *et al.* (2001) beschrieben. Ob nach der Röntgenstruktur ein Crosslinking zwischen den beiden postulierten Peptiden PrP90-106 und PrP195-204 möglich wäre, kann aufgrund des fehlenden N-Terminus im Kristall nicht überprüft werden.

Neben der Röntgenstruktur existiert auch ein Modell für ein PrP-Dimer (Warwicker, 2000). Die Struktur beider Monomere entspricht dabei ebenfalls der NMR-Struktur. Für den flexiblen Bereich, im Modell Aminosäure 106-128, wird die Bildung eines zusätzlichen β -Strangs und einer α -Helix angenommen. Diese zusätzliche



Abbildung 4.43: Modell eines PrP-Dimers. Das von Warwicker (2000) postulierte Modell beschreibt ein Dimer aus zwei PrP106-231-Molekülen. Die beiden Monomere sind grau und schwarz eingezeichnet. PrP195-204 ist in beiden Monomeren hervorgehoben. Weitere Einzelheiten s. Text.

Helix interagiert dabei jeweils mit dem anderen PrP-Monomer. Das Strukturmodell ist in Abbildung 4.43 dargestellt.

Auch hier handelt es sich also um einen dem domain swapping ähnlichen Mechanismus, wobei im Gegensatz zur Röntgenstruktur der N-Terminus als ausgetauschter Bereich angenommen wird. Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch der Bildung des hier beschriebenen Dimers zugrunde liegen. Eine direkte Bestätigung für das beschriebene Modell können die gemessenen Daten jedoch nicht liefern, da das Peptid PrP195-204 im Modell vom N-Terminus sehr weit entfernt ist und eine Interaktion mit PrP90-106 unwahrscheinlich erscheint. Zwischen Lysin106 und den Carboxyl-Gruppen im Bereich 195-204 ist der Abstand in allen Fällen größer als 20 Å. Genaue Aussagen können jedoch nicht getroffen werden, da Aminosäure 90-105 im Modell nicht enthalten sind.

Eine Dimer-Bildung durch einen domain swapping Mechanismus könnte die Tatsache erklären, dass zwischen EDC-Monomer und EDC-Dimer keine Unterschiede gefunden wurden. Diese Annahme eignet sich somit als Arbeitshypothese, die durch weitere Daten bestätigt werden müsste.

4.5 Ausblick

Sowohl bei Prion-Erkrankungen als auch bei anderen amyloiden Erkrankungen wird zunehmend eine wichtige Rolle von Intermediaten als eigentlich pathogenen Mo-

lekülen diskutiert (vgl. Abschnitt 1.1; Chiesa & Harris, 2001; Clarke *et al.*, 2001). Bei den in dieser Arbeit analysierten Intermediaten könnte es sich um solche potentiell pathogenen Formen handeln. Um diese Frage zu klären, könnten die Neurotoxizität des β -Oligomers und des α -Dimers in neuronalen Zellkulturen untersucht werden. Um einen Vergleich zwischen Infektiosität und Neurotoxizität durchführen zu können, wäre es wichtig, die für rekombinantes PrP erzielten Ergebnisse auf andere Ausgangsmaterialien wie PrP 27-30 oder PrP^C zu übertragen. Nur für vollständig posttranslational modifiziertes PrP scheint die Möglichkeit einer Wiederherstellung von Infektiosität gegeben.

Die Analyse der Crosslink-Stellen im α -Dimer ergab zwei Peptide als potentielle Verknüpfungsstellen. Um diese Ergebnisse zu bestätigen bzw. andere Crosslink-Stellen zu identifizieren, sind verschiedene Ansätze denkbar. So könnte man die beiden infrage kommenden Peptide herstellen lassen und für Inhibierungsexperimente einsetzen. Sind sie wirklich für die Dimerisierung entscheidend, so sollte ein großer Überschuss eines oder beider Peptide die Dimerisierung verhindern können. Die Methoden zur Überprüfung der Dimerisierung sind etabliert und können direkt auf diese Fragestellung angewendet werden. Neben den diskutierten Peptiden könnte das Konversionssystem bzw. insbesondere die Bildung von Dimeren bzw. Oligomeren auch für das Screening anderer Substanzen verwendet werden. Könnte man eine Substanz finden, die spezifisch die Bildung von α -Dimeren oder β -Oligomeren verhindert, so hätte man einen Ansatzpunkt für die Entwicklung von Therapeutika.

Zur exakten Bestimmung der Crosslink-Stellen wäre es wichtig, die verknüpften Peptide aus der Mischung mit den unverknüpften Peptiden anreichern zu können. Eine Möglichkeit dazu könnte eine neue Methode zur chemischen Derivatisierung der N-Termini mit nachfolgender chromatographischer Trennung verknüpfter und unverknüpfter Peptide bieten (Chen *et al.*, 1999).

Das hier etablierte Verfahren zur Bestimmung möglicher verknüpfter Peptide bzw. ein entsprechend verbessertes Verfahren zur genauen Bestimmung der beteiligten Aminosäuren ist ohne Probleme auf andere Moleküle oder Fragestellungen übertragbar. So wäre es z. B. möglich, dieses Verfahren auf das β -Oligomer anzuwenden, indem man deutlich niedrigere Konzentrationen an Crosslinker einsetzt, die das Oligomer nicht vollständig verknüpfen können, sondern gerade zur Bildung kovalenter Dimere ausreichen. Ebenso wäre es möglich, Crosslinks direkt mit infektiösem PrP^{Sc} oder PrP 27-30 durchzuführen und so neue Daten zur Struktur der infektiösen Form des Prion-Proteins zu gewinnen.

5 Zusammenfassung

Prion-Krankheiten sind neurodegenerative Störungen, die sowohl genetisch als auch sporadisch oder infektiös bedingt auftreten. Man nimmt an, dass der Erreger hauptsächlich oder sogar ausschließlich aus einem Protein, dem Prion-Protein oder PrP, besteht. Bei der Konversion der zellulären Isoform des Prion-Proteins, PrP^C, in die infektiöse Isoform, PrP^{Sc}, spielt die Umwandlung von einer hauptsächlich α -helikalen Sekundärstruktur in eine β -Faltblatt-reichere Struktur eine entscheidende Rolle. Es steht ein *in vitro* System zur Verfügung, das einen solchen Strukturübergang induzieren kann. Durch Inkubation von PrP in niedrigen Konzentrationen (0,2 %) des Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) erhält man monomeres PrP mit α -helikaler bzw. random coil Sekundärstruktur. Verdünnung des SDS auf 0,01 % führt zur Aggregation des Proteins, verbunden mit einer deutlichen Erhöhung des β -Faltblatt-Anteils. Damit kann ein Übergang von PrP^C-ähnlichen Eigenschaften zu PrP^{Sc}-ähnlichen Eigenschaften induziert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, Intermediate des beschriebenen Übergangs zu stabilisieren und zu charakterisieren, um neue Hinweise auf den Umwandlungsmechanismus zu gewinnen. Rekombinantes Prion-Protein aus *E. coli* (kurz recPrP) war das Ausgangsmaterial für alle durchgeführten Versuche, da es in ausreichender Menge und Reinheit für biophysikalische Untersuchungen zur Verfügung stand.

PrP wurde in verschiedenen SDS-Konzentrationen inkubiert. Mittels Circular-Dichroismus Spektroskopie wurde eine sigmoide Übergangskurve von α -Helix-Struktur zu erhöhtem β -Faltblatt-Anteil beobachtet. Mittels Größenausschluss-Chromatographie, chemischem Crosslinking und analytischer Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, dass PrP mit α -helikaler Struktur kurz vor dem Übergang zu β -Faltblatt als Dimer vorliegt („ α -Dimer“). Als kleinste Größe für PrP mit β -Faltblatt-Struktur wurde ein lösliches Oligomer aus 12-16 PrP-Molekülen ermittelt. Damit konnten zwei Intermediate des Übergangs gefunden werden, die über längere Zeit stabil und für weitere strukturelle Untersuchungen geeignet sind. Es ist nun möglich, gezielt nach Inhibitoren für die Dimer- oder Oligomerbildung zu suchen, um neue therapeutische Ansätze für die Bekämpfung von Prion-Krankheiten zu finden.

Mit Hilfe des Carbodiimids EDC [1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide Hydrochloride] kann das α -Dimer durch eine Isopeptidbindung zwischen Lysin- und Asparaginsäure- oder Glutaminsäure-Seitenketten kovalent verknüpft werden. Da ein solcher Crosslink nur stattfinden kann, wenn die beteiligten Re-

ste sich in direkter räumlicher Nähe befinden, würde die Ermittlung der beteiligten Aminosäuren einen Hinweis auf die Struktur des Dimers geben. Zur Ermittlung der Crosslink-Stellen wurde ein Verfahren zur Isolation von verknüpftem Dimer mit nachfolgendem Trypsin-Verdau und massenspektrometrischer Analyse (ESI-Q-TOF-MS bzw. MS/MS Analyse) etabliert. Der Vergleich zu EDC-behandeltem PrP Monomer bzw. zu einer unbehandelten Kontrolle sollte dabei Rückschlüsse auf *intra-* bzw. *intermolekulare* Crosslinks ermöglichen. Es konnten mit PrP90-106 und PrP195-204 zwei Peptide identifiziert werden, die sowohl in EDC-behandeltem Monomer als auch im Dimer mit wesentlich geringerer Intensität als in der unbehandelten Kontrolle auftraten und deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit an der Crosslink-Reaktion beteiligt sind. Als mögliche Erklärung dafür, dass zwischen verknüpftem Monomer und Dimer keine Unterschiede beobachtet wurden, kommt ein Domain-Swapping Mechanismus in Frage.

Die hier etablierte Methode zur Ermittlung von Crosslinking-Stellen im Prion-Protein kann auf andere Materialien wie z. B. infektiöses PrP^{Sc} übertragen werden und stellt eine neue Möglichkeit zur Gewinnung struktureller Informationen dar.

6 Literatur

- Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A. & Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, **214**, 764–766.
- Barlow, D. J. & Thornton, J. M. (1983). Ion-pairs in proteins. *J. Mol. Biol.*, **168**, 867–885.
- Baskakov, I.V., Legname, G., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. (2002). Pathway Complexity of Prion Protein Assembly into Amyloid. *J.Biol.Chem.*, **277**, 21140–21148.
- Baskakov, I.V., Legname, G., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. (2001). Folding of prion protein to its native alpha-helical conformation is under kinetic control. *J.Biol.Chem.*, **276**, 19687–19690.
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B. & Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, **46**, 417–428.
- Belay, E.D. (1999). Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu.Rev.Microbiol.*, **53**, 283–314.
- Bellinger-Kawahara, C.G., Kempner, E., Groth, D., Gabizon, R. & Prusiner, S. B. (1988). Scrapie prion liposomes and rods exhibit target sizes of 55,000 Da. *Virology*, **164**, 537–541.
- Bolton, D.C., Meyer, R. K. & Prusiner, S. B. (1985). Scrapie PrP 27-30 is a sialoglycoprotein. *J.Virol.*, **53**, 596–606.
- Bons, N., Mestre-Frances, N., Charnay, Y., Salmona, M. & Tagliavini, F. (1996). Spontaneous spongiform encephalopathy in a young adult rhesus monkey. *C.R.Acad.Sci.III*, **319**, 733–736.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254.
- Brahms, S. & Brahms, J. (1980). Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J. Mol. Biol.*, **138**, 149–178.
- 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., Westa-

- way, D. & Kretzschmar, H. (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, **390**, 684–687.
- Brown, D.R., Schulz-Schaeffer, W. J., Schmidt, B. & Kretzschmar, H. A. (1997). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp.Neurol.*, **146**, 104–112.
- Brown, D.R., Wong, B. S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S. J. & Jones, I. M. (1999). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem.J.*, **344**, 1–5.
- Bruce, M.E., Fraser, H., McBride, P. A., Scott, F. R. & Dickinson, A. G. (1992). The basis of strain variation in scrapie. In *Prion diseases of humans and animals* (Prusiner, S. B., Collinge, J., Powell, J. & Anderton, B., Hrsg.). Horwood, London, S. 497–508.
- Bruce, M.E., McConnell, I., Fraser, H. & 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**, 595–603.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M. & Stefani, M. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, **416**, 507–511.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. & Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, **73**, 1339–1347.
- Bueler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. & Weissmann, C. (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell- surface PrP protein. *Nature*, **356**, 577–582.
- Chandler, R.L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet*, **1**, 1378–1379.
- Chen, X., Chen, Y.H. & Anderson, V.E. (1999). Protein Cross-Links: Universal Isolation and Characterization by Isotopic Derivatization and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Anal.Biochem.*, **273**, 192–203.

-
- Chiesa, R. & Harris, D. A. (2001). Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol.Dis.*, **8**, 743–763.
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M., Ramponi, G. & 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.
- Clarke, A.R., Jackson, G. S. & Collinge, J. (2001). The molecular biology of prion propagation. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, 356, 185–195.
- Cohen, F.E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J. & Prusiner, S. B. (1994). Structural clues to prion replication. *Science*, **264**, 530–531.
- Cohn & Edsall, Hrsg. (1943). *Proteins, AminoAcids and Peptides as Ions and Dipolar Ions*. Reinhold, New York.
- Collinge, J. (1999). Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, **354**, 317–323.
- Collinge, J., Palmer, M. S., Sidle, K. C., Gowland, I., Medori, R., Ironside, J. & Lantos, P. (1995). Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals. *Lancet*, **346**, 569–570.
- Collinge, J. & Rossor, M. (1996). A new variant of prion disease. *Lancet*, **347**, 916–917.
- Damaschun, G., Damaschun, H., Gast, K. & Zirwer, D. (1999). Proteins can adopt totally different folded conformations. *J.Mol.Biol.*, 291, 715–725.
- Dickinson, A.G., Meikle, V. M. & 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.
- Dobson, C.M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem.Sci.*, **24**, 329–332.
- Dobson, C.M. (2001). The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*, **356**, 133–145.
- Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Wright, P. & Dyson, H.J. (1997). Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N-terminus is highly flexible. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A*, **94**, 13452–13457.

- Dumpitak, C. (1998). Analyse von nicht-proteinartigen Komponenten in Prionen. Diplomarbeit, Heinrich Heine-Universität Düsseldorf.
- Eigen, M. (1996). Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys.Chem.*, **63**, A1–18.
- Ellis, R.J. & Pinheiro, T. J. T. (2002). Medicine: Danger - misfolding proteins. *Nature*, **416**, 483–484.
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B. & Kobata, A. (1989). Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie prion protein. *Biochemistry*, **28**, 8380–8388.
- Fandrigh, M., Fletcher, M. A. & Dobson, C. M. (2001). Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature*, **410**, 165–166.
- Ferguson, N.M., Ghani, A. C., Donnelly, C. A., Hagensars, T. J. & Anderson, R. M. (2002). Estimating the human health risk from possible BSE infection of the British sheep flock. *Nature*, **415**, 420–424.
- Fink, A.L. (1998). Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding & Design*, **3**, R9–R23.
- Frankish, H. (2001). Samples blunder renders sheep-BSE study useless. *Lancet*, **358**, 1436.
- Gasset, M., Baldwin, M.A., Fletterick, R.J. & Prusiner, S.B. (1993). Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **90**, 1–5.
- Gill, S.C. & von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal.Biochem.*, **182**, 319–326.
- Griffith, J.S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, **215**, 1043–1044.
- Griffiths, P.D. (2002). Preparing to treat prions. *Rev.Med.Virol.*, **12**, 1–3.
- Herms, J. W. & Kretschmar, H.A. (2001). Die Funktion des zellulären Prion-Proteins als kupferbindendes Protein an der Synapse. In *Prionen und Prionkrankheiten*. De Gruyter, Berlin, S. 92–102.
- Herrmann, L. M. & Caughey, B. (1998). The importance of the disulfide bond in prion protein conversion. *Neuroreport.*, **9**, 2457–2461.

-
- Heukeshoven, J & Dernick, R. (1989). Simplified method for silverstaining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silverstaining. *Elektrophoresis*, **6**, 103–112.
- Hill, A. F., Antoniou, M. & Collinge, J. (1999). Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *J.Gen.Virol.*, **80**, 11–14.
- Hjelmeland, L. M. & Chrambach, A. (1984). Solubilization of functional membrane proteins. *Methods Enzymol.*, **104**, 305–318.
- Horiuchi, M. & 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.
- Hörnlimann, B. (2001). BSE außerhalb Großbritanniens: Einschleppung durch Rinder oder Tiermehl. In *Prionen und Prionkrankheiten*. De Gruyter, Berlin, S. 92–102.
- Hörnlimann, B., Riesner, D. & Kretzschmar, H., Hrsg. (2001). *Prionen und Prionkrankheiten*. De Gruyter, Berlin.
- Hsiao, K.K., Groth, D., Scott, M., Yang, S. L., Serban, H., Rapp, D., Foster, D., Torchia, M., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1994). Serial transmission in rodents of neurodegeneration from transgenic mice expressing mutant prion protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91**, 9126–9130.
- Huang, Z., Prusiner, S.B. & Cohen, F.E. (1996). Scrapie prions: a three-dimensional model of an infectious fragment. *Folding & Design*, **1**, 13–19.
- Jackson, G. S., Hosszu, L. L., Power, A., Hill, A. F., Kenney, J., Saibil, H., Craven, C. J., Waltho, J. P., Clarke, A. R. & Collinge, J. (1999). Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrillogenic conformations. *Science*, **283**, 1935–1937.
- James, T.L., Liu, H., Ulyanov, N.B., Farrjones, S., Zhang, H., Donne, D.G., K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S.B. & 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.

- Jarrett, J.T. & Lansbury, P. T. (1993). Seeding one-dimensional crystallization of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, **73**, 1055–1058.
- Jenkins, J., Mayans, O. & Pickersgill, R. (1998). Structure and evolution of parallel beta-helix proteins. *J.Struct.Biol.*, **122**, 236–246.
- Johnson, R.S., Martin, S.A. & Biemann, K. (1988). Collision-Induced fragmentation of (M+H)⁺ Ions of Peptides. *Int J Mass Spect*, **86**, 137–154.
- Johnson, W. C. (1999). Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. *Proteins*, **35**, 307–312.
- Jonsson, A.P. (2001). Mass spectrometry for protein and peptide characterisation. *Cell Mol Life Sci.*, **58**, 868–884.
- Kaimann, T. (2002). Strukturveränderungen von kovalent verknüpften Oligomeren des Prion-Proteins. Diplomarbeit, Heinrich Heine-Universität Düsseldorf.
- Kaneko, K., Vey, M., Scott, M., Pilkuhn, S., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1997). CooH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **94**, 2333–2338.
- Kaneko, K., Zulianello, L., Scott, M., Cooper, C. M., Wallace, A. C., James, T. L., Cohen, F. E. & 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, D. M., Fersko, R., Carp, R. I., Wisniewski, H. M. & Diringer, H. (1987). Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J.Virol.*, **61**, 3688–3693.
- Kebarle, P. & Tang, L. (1993). From ions in solution to ions in the gas phase. *Anal. Chem.*, **65**, 972A–986A.
- Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S. B. & Riesner, D. (1992). Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J.Gen.Virol.*, **73**, 1025–1029.
- Klein, T. R., Kirsch, D., Kaufmann, R. & 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.

-
- Knaus, K.J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W. K. & Yee, V. C. (2001). Crystal structure of the human prion protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat.Struct.Biol.*, **8**, 770–774.
- Kocisko, D.A., Come, J.H., Priola, S.A., Chesebro, B., Raymond, G.J., Lansbury, P.T. & Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease resistant prion protein. *Nature*, **370**, 471–474.
- Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E. & DeArmond, S. J. (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol*, **122**, 1–5.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, **227**, 680–685.
- Lansbury, P.-T.J. (1999). Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **96**, 3342–3344.
- Lasmezas, C.I., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J. & Hauw, J. J. (1996). BSE transmission to macaques. *Nature*, **381**, 743–744.
- Liu, H., Farr-Jones, S., Ulyanov, N. B., Llinas, M., Marqusee, S., Groth, D., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & James, T. L. (1999). Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90-231). *Biochemistry*, **38**, 5362–5377.
- Liu, Y. & Eisenberg, D. (2002). 3D domain swapping: As domains continue to swap. *Protein Science*, **11**, 1282–1299.
- Lopez, G.F., Zahn, R., Riek, R. & Wuthrich, K. (2000). NMR structure of the bovine prion protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **97**, 8334–8339.
- Manson, J.C., Clarke, A. R., Hooper, M. L., Aitchison, L., McConnell, I. & Hope, J. (1994). 129/Ola mice carrying a null mutation in PrP that abolishes mRNA production are developmentally normal. *Mol.Neurobiol.*, **8**, 121–127.
- Marsh, R.F. & 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.
- Mauk, M.R. & Mauk, A.G. (1989). Crosslinking of cytochrome c and cytochrome b5 with a water-soluble carbodiimide. Reaction conditions, product analysis and critique of the technique. *Eur. J. Biochem.*, **186**, 473–486.

- McKinley, M.P., Bolton, D. C. & Prusiner, S. B. (1983). A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell*, **35**, 57–62.
- McKinley, M.P., Masiarz, F. R., Isaacs, S. T., Hearst, J. E. & Prusiner, S. B. (1983). Resistance of the scrapie agent to inactivation by psoralens. *Photochem.Photobiol.*, **37**, 539–545.
- 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. & Prusiner, S. B. (1996). High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry*, **35**, 5528–5537.
- Meyer, N., Rosenbaum, V., Schmidt, B., Gilles, K., Mirenda, C., Groth, D., Prusiner, S. B. & Riesner, D. (1991). Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *J.Gen.Virol.*, **72**, 37–49.
- Mo, H., Moore, R. C., Cohen, F. E., Westaway, D., Prusiner, S. B., Wright, P. E. & Dyson, H. J. (2001). Two different neurodegenerative diseases caused by proteins with similar structures. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, 2352–2357.
- 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. & 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., Vanik, D. L. & Surewicz, W. K. (2001). On the mechanism of alpha-helix to beta-sheet transition in the recombinant prion protein. *Biochemistry*, **40**, 6982–6987.
- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J. L., Lehmann, S., Launay, J. M. & Kellermann, O. (2000). Signal transduction through prion protein. *Science*, **289**, 1925–1928.
- Muramoto, T., Scott, M., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1996). Recombinant scrapie-like prion protein of 106 amino acids is soluble. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **93**, 15457–15462.
- 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. & . (1985). A cellular

-
- gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, **40**, 735–746.
- Pan, K.-M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R.J., Cohen, F.E. & Prusiner, S.B. (1993). Conversion of α -helices into β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **90**, 10962–10966.
- Phillips, N., Bridgeman, J. & Ferguson-Smith, M. (2000). *BSE inquiry report. Vol. 2: Science*. Stationary Office, London.
- Pitschke, M. (1999). Mechanismus der Multimerisierung von Prion-Proteinen als Basis eines biophysikalischen Diagnoseverfahrens von spongiformen Encephalopathien 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., Brown, D. R., Groschup, M., Kretzschmar, H. A. & Riesner, D. (2000). Neurotoxicity but not infectivity of prion proteins can be induced reversibly in vitro. *Arch. Virol. Suppl*, **265-273**.
- Post, K., Pitschke, M., Schäfer, O., Wille, H., Appel, T. R., Kirsch, D., Mehlhorn, I., Serban, H., Prusiner, S. B. & Riesner, D. (1998). Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. *Biol. Chem.*, **379**, 1307–1317.
- Priola, S.A., Caughey, B., Wehrly, K. & Chesebro, B. (1995). A 60-kDa prion protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP. *J. Biol. Chem.*, **270**, 3299–3305.
- Prusiner, S.B. (1998). Prions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **95**, 13363–13383.
- Prusiner, S.B. (2001). Shattuck lecture—neurodegenerative diseases and prions. *N. Engl. J. Med.*, **344**, 1516–1526.
- Prusiner, S.B., Bolton, D. C., Groth, D. F., Bowman, K. A., Cochran, S. P. & McKinley, M. P. (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry*, **21**, 6942–6950.
- Prusiner, S.B., Cochran, S. P., Groth, D. F., Downey, D. E., Bowman, K. A. & Martinez, H. M. (1982). Measurement of the scrapie agent using an incubation

- time interval assay. *Ann.Neurol.*, **11**, 353–358.
- Prusiner, S.B., Groth, D., Serban, A., Koehler, R., Foster, D., Torchia, M., Burton, D., Yang, S. L. & 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., Groth, D. F., Cochran, S. P., Masiarz, F. R., McKinley, M. P. & 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. & 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. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science*, **252**, 1515–1522.
- Raetz, C.R. & Roderick, S. L. (1995). A left-handed parallel beta helix in the structure of UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase. *Science*, **270**, 997–1000.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. & Wüthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*, **382**, 180–182.
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Glockshuber, R. & Wüthrich, K. (1997). NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.*, **413**, 282–286.
- Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, H., Groth, D., Baldwin, M.B. & Prusiner, S.B. (1996). Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high α -helical content and lacking scrapie infectivity. *J. Virol.*, **70**, 1714–1722.
- Roberts, G.W. & Clinton, J. (1992). Prion disease: the spectrum of pathology and diagnostic considerations. In *Prion diseases of humans and animals*. Ellis Horwood, London, S. 215–242.
- Rochet, J.C. & Lansbury, P.-T. J. (2000). Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr.Opin.Struct.Biol.*, **10**, 60–68.
- Roepstorff, P. (1984). Proposal for a Common Nomenclature for Sequence Ions in Mass Spectra of Peptides. *Biomedical Mass Spectrometry*, **11**, 601–631.

-
- Rossi, D., Cozzio, A., Flechsig, E., Klein, M. A., Rulicke, T., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (2001). Onset of ataxia and Purkinje cell loss in PrP null mice inversely correlated with Dpl level in brain. *EMBO J.*, **20**, 694–702.
- Safar, J., Ceroni, M., Piccardo, P., Liberski, P. P., Miyazaki, M., Gajdusek, D. C. & Gibbs, C. J., Jr. (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., Gaydusek, D.C. & Gibbs, C.J.Jr. (1993). Conformational transitions, dissociation and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20276–20284.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat.Med.*, **4**, 1157–1165.
- 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. & 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. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd Ed.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- Schäfer, O. (1997). Biophysikalische Analyse verschiedener Aggregationszustände von rekombinantem Prion-Protein. Diplomarbeit, Heinrich Heine-Universität Düsseldorf.
- Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M. A., Ball, H. L., Bradon, N., Bosque, P. J., Crossin, K. L., Edelman, G. M., DeArmond, S. J., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (2001). Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular prion protein. *J.Mol.Biol.*, **314**, 1209–1225.
- Schätzl, H.M. (2001). Die Phylogenetik des PrP. In *Prionen und Prionkrankheiten*. De Gruyter, Berlin, S. 92–102.
- Scott, M.R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H. O., Tremblay, P., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (1999). Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*

- 96**, 15137–15142.
- Seckler, R. (1998). Folding and function of repetitive structure in the homotrimeric phage P22 tailspike protein. *J.Struct.Biol.*, **122**, 216–222.
- Shaked, G. M., Fridlander, G., Meiner, Z., Taraboulos, A. & Gabizon, R. (1999). Protease-resistant and detergent-insoluble prion protein is not necessarily associated with prion infectivity. *J.Biol.Chem.*, **274**, 17981–17986.
- Silverman, G.L., Qin, K., Moore, R. C., Yang, Y., Mastrangelo, P., Tremblay, P., Prusiner, S. B., Cohen, F. E. & 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.
- Sipe, J.D. (1992). Amyloidosis. *Annu.Rev.Biochem.*, **61**, 947–975.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T, Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M. & Olson, B.J.and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76–85.
- Sreerama, N., Venyaminov, S. Y. & Woody, R. W. (1999). Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci.*, **8**, 370–380.
- Stafford, W.F. (1992). Boundary analysis in sedimentation transport experiments: a procedure for obtaining sedimentation coefficient distributions using the time derivative of the concentration profile. *Anal. Biochem.*, **203**, 295–301.
- Stahl, N., Baldwin, M.A., Teplow, D.B., Hood, L., Gibson, B.W., Burlingame, A.L. & Prusiner, S.B. (1993). Structural Analysis of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry*, **32**, 1991–2002.
- Sunde, M. & Blake, C. (1997). The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv.Protein Chem.*, **50**, 123–159.
- Swietnicki, W., Morillas, M., Chen, S. G., Gambetti, P. & Surewicz, W. K. (2000). Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP⁹⁰⁻²³¹. *Biochemistry*, **39**, 424–431.
- Tanford, C., Nozaki, Y., Reynolds, J.A. & Makino, S. (1974). Molecular characterization of proteins in detergent solutions. *Biochemistry*, **13**, 2369–2376.

- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L., Prusiner, S. B. & Avraham, D. (1995). Cholesterol depletion and modification of cooh-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform [published erratum appears in *J. Cell Biol.* 1995 jul;130(2):501]. *J. Cell Biol.*, **129**, 121–132.
- Tateishi, J., Brown, P., Kitamoto, T., Hoque, Z. M., Roos, R., Wollman, R., Cervenakova, L. & Gajdusek, D. C. (1995). First experimental transmission of fatal familial insomnia. *Nature*, **376**, 434–435.
- Telling, G.C., Scott, M., Mastrianni, J., Gabizon, R., Torchia, M., Cohen, F.E., DeArmond, S.J. & 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.
- Thomas, P.J., Hu, B-H. & Pedersen, P.L. (1995). Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biol. Sci.*, **20**, 456–459.
- Turk, E., Teplow, D. B., Hood, L. E. & Prusiner, S. B. (1988). Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur. J. Biochem.*, **176**, 21–30.
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R., DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G., Taraboulos, A. & 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.
- Virchow, R. (1851). Struktur und Entwicklung der Stärkekörner. In *Verhandlungen der physikalisch-medizinischen Gesellschaft zu Würzburg*, Bd. 2. Verlag F. Enke, Erlangen, S. 49.
- Waggoner, D.J., Drisaldi, B., Bartnikas, T. B., Casareno, R. L., Prohaska, J. R., Gitlin, J. D. & Harris, D. A. (2000). Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J. Biol. Chem.*, **275**, 7455–7458.
- Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J. & Selkoe, D. J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, **416**, 535–539.

- Warwicker, J. (2000). Modeling a prion protein dimer: predictions for fibril formation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **278**, 646–652.
- Weissmann, C. (1994). Molecular biology of prion diseases. *Trends Cell Biol*, **4**, 10–14.
- Wells, G.A. & McGill, I. S. (1992). Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res. Vet.Sci.*, **53**, 1–10.
- Wiechelman, K., Braun, R. & Fitzpatrick, J. (1988). Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.*, **175**, 231–237.
- Wilesmith, J.W. & 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. & Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, **347**, 921–925.
- Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A. & Prusiner, S. B. (2002). Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **99**, 3563–3568.
- Wong, B.S., Pan, T., Liu, T., Li, R., Gambetti, P. & Sy, M. S. (2000). Differential contribution of superoxide dismutase activity by prion protein in vivo. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **273**, 136–139.
- Yoder, M.D., Lietzke, S. E. & Jurnak, F. (1993). Unusual structural features in the parallel beta-helix in pectate lyases. *Structure.*, **1**, 241–251.
- Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G. & Wüthrich, K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A*, **4**, 145–150.