

**Wechselwirkung von Peptiden
und dem Prion-Protein
in verschiedenen Konformationen
als Konzept für eine Therapie
von Prionkrankheiten**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michael Andreas Wolff

aus Düsseldorf

Düsseldorf 2011

aus dem Institut für Physikalische Biologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Abgabedatum: 07.11.2011

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2011

Betreuer: Prof. Dr. D. Riesner

2. Gutachter: Prof. Dr. D. Willbold

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

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien	1
1.1.1 Scrapie	1
1.1.2 Bovine Spongiforme Enzephalopathie	3
1.1.3 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	4
1.2 Eigenschaften des TSE-Erregers	7
1.3 Struktur des zellulären Prion-Proteins	8
1.4 Natürliche Funktion des zellulären Prion-Proteins	10
1.5 Struktur des krankheitsassoziierten PrP ^{Sc}	11
1.6 Replikation von PrP ^{Sc}	14
1.7 <i>In vitro</i> Konversion von rekPrP(90-231) mittels Natriumdodecylsulfat	18
1.8 Strategien zu Therapie von Prionkrankheiten	20
1.8.1 Empirische Ansätze	21
1.8.2 Molekular Ansätze	21
1.9 Fragestellung	23
2 Material und Methoden	25
2.1 Chemikalien.....	25
2.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	25
2.3 Löslichkeitsbestimmung durch differentielle Ultrazentrifugation	26
2.4 Dot Blot	26
2.5 Immunologischer Proteinnachweis.....	26
2.6 Peptidselektion mittels Phage Display	27
2.7 Zirkular-Dichroismus(CD)-Spektroskopie	29
2.8 Rekombinantes PrP	31
2.9 Fibrillogenese von rekombinantem PrP	31
2.10 Thioflavin T Assay	31
2.11 Elektronenmikroskopie (EM)	32
2.12 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)	32

2.13	Chemischer Crosslink von Proteinen mit EDC	34
2.14	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.15	Silberfärbung von Proteingelen	35
3	Ergebnisse	37
3.1	Konzept von Bindung und Verschiebung der Konversion von PrP im SDS-basierten <i>In-vitro</i> -Konversionssystem durch Peptid-Liganden	37
3.2	Einfluss der Peptide auf die Löslichkeit von PrP	39
3.2.1	Einfluss des Peptids S52 auf die Löslichkeit von PrP	39
3.2.2	Abhängigkeit des Effektes des S52 von der Inkubationszeit	42
3.2.3	Vergleich des Effektes von S52 und scrambled S52	43
3.2.4	Wirkung von S52 auf PrP-Aggregate	45
3.3	Einfluss der Peptide auf die Sekundärstruktur von PrP	46
3.3.1	Bestimmung der geeigneter Konzentrationen von PrP und SDS für die CD-Spektroskopie	46
3.3.2	Wirkung von S52 und S52scr auf die Struktur von PrP	50
3.4	Fibrillogene von PrP mit S52 und S52scr	52
3.4.1	Nachweis amyloider Strukturen über Thioflavin T Fluoreszenz	54
3.4.2	Elektronenmikroskopie von PrP mit S52 und S52scr	56
3.4.3	Auflösung von PrP-Fibrillen durch S52	58
3.5	Charakterisierung der Bindung von PrP und S52	59
3.5.1	Crosslinking von PrP und S52	59
3.5.2	Analyse der S52-Bindung an PrP mittels FCS	62
3.5.3	Abschätzung der Dissoziationskonstante für S52 und PrP-Monomere durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie	67
3.5.4	PrP-Isoformspezifität von S52	71
4	Diskussion	75
4.1	Peptid-Selektion mittels Phage-Display	75
4.2	Bindung von S52 an PrP-Monomere und Dimere	76
4.3	S52 inhibiert die Konversion von PrP	78
4.4	Möglicher Mechanismus der Inhibierung der Konversion von PrP durch S52	81
4.4.1	Modell der molekularen Klammer	81

4.4.2	Modell der Loop-Stabilisierung	82
4.4.3	Modell der β -Faltblatt-Bindung	87
4.5	Eignung von Peptiden zur Therapie von Prionkrankheiten	90
4.6	Fazit und Ausblick	95
5	Zusammenfassung	97
6	Abstract	99
7	Literaturverzeichnis	101

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
Abb.	Abbildung
BCA	Bicinconininsäure
BSA	Bovines Serum Albumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (engl. Creutzfeldt-Jakob-Disease)
cm	Zentimeter
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
Da	Dalton
d.h.	Das heißt
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid-Hydrochlorid
Em	Emission
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
Ex	Excitation
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
g	Gramm
Gl.	Gleichung
h	Stunden
HMW	Molekulargewichts-Marker
Kap.	Kapitel
kDa	Kilo Dalton
l	Liter
M	Molar (mol/l)
max.	Maximal
min	Minuten
ms	Millisekunden
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaP _i	Natriumphosphat-Puffer
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
OG488	Oregon Green 488
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PNS	Peripheres Nervensystem
Prof.	Professor
PrP	Prion Protein
rek	rekombinant
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden

s.	siehe
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (engl. Sodium dodecyl sulfate)
SHaPrP	PrP des Syrischen Goldhamsters (<i>Mesocricetus auratus</i>)
Tab.	Tabelle
TBST	Tris Buffer Sodium Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
ThT	Thioflavin T
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
u.	und
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
vCJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind übertragbare neurodegenerative Erkrankungen, die sich histopathologisch vor allem in einer schwammartigen (spongiformen) Veränderung der grauen Hirnsubstanz äußern. Die spongiformen Veränderungen im Gehirn entstehen durch eine Vakuolisierung und einem nachfolgenden Absterben von Neuronen. Gleichzeitig kommt es zu einem vermehrten Wachstum oder Anschwellen von Mikrogliazellen und Astrozyten, Astrogliose genannt (Masters *et al.*, 1981), durch die es zu Gewebsauflockerungen mit größeren perizellulären Spalträumen kommt (Kretzschmar, 2001). Neben diesen Veränderungen treten meist extrazelluläre proteinöse Ablagerungen (Plaques) auf, die hauptsächlich aus dem wirtseigenen Prion-Protein (PrP) bestehen (Kap. 1.2).

TSE, nach ihrem ungewöhnlichen Erreger den Prionen (s. Kap. 1.2) auch kurz Prionkrankheiten genannt, verlaufen durch den irreversiblen Verlust von Neuronen im Zentralen Nervensystem (ZNS) progressiv und sind immer tödlich, nicht zuletzt da für keine der Erkrankungen eine wirksame Therapie existiert. Sie zeichnen sich durch eine lange Inkubationszeit von bis zu mehreren Jahrzehnten aus, gefolgt von einem meist sehr schnellen Krankheitsverlauf. Symptome sind Bewegungs- und Koordinationsstörungen, rasche unwillkürliche Muskelzuckungen (Myoklonien) und Demenz. Eine der Besonderheiten der Prionkrankheiten ist, dass sie drei unterschiedliche Ätiologien haben können. Sie können nicht nur als Folge einer Infektion auftreten, sondern auch genetisch bedingt sein oder spontan entstehen.

Zu den Prionkrankheiten zählen unter anderem Scrapie (oder *Traberkrankheit*) bei Schafen und Ziegen, die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind und die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) beim Menschen (Tabelle 1.1).

1.1.1 Scrapie

Die Scrapie oder Traberkrankheit ist seit 1732 bekannt und wurde bereits 1759 von dem Veterinärmediziner Leopoldt als ansteckende Krankheit beschrieben (Leopoldt, 1759). Bereits Mitte des 18. Jahrhunderts waren wirtschaftliche Verluste durch Scrapie in der Schafzucht in Großbritannien ein bedeutender Faktor. Die pathologischen Veränderungen im Gehirn erkrankter Schafe sind

Tabelle 1.1: Überblick über alle Formen der Prionkrankheiten bei Mensch und Tier

Vorkommen bei	Krankheit	Abkürzung	Ätiologie
Mensch	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit		
	sporadisch	sCJD	spontan, Somamutation
	familiär	fCJD	genetisch
	iatrogen	iCJD	Infektion
	neue Variante	vCJD	Infektion mit BSE-Erreger
Mensch	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom	GSS	genetisch
	Tödliche Familiäre Schlaflosigkeit	FFI	genetisch
	Kuru	Kuru	Infektion durch rituellen Kannibalismus
Schaf	Scrapie	Scrapie	Infektion, spontan
Rind	Bovine Spongiforme Enzephalopathie	BSE	Infektion durch kontaminiertes Tiermehl, spontan (?)
Hirsch	Chronic Wasting Disease	CWD	Infektion (?)
Katze	Feline Spongiforme Enzephalopathie	FSE	Infektion durch kontaminiertes Tiermehl
Nerz	Transmissible Mink Enzephalopathie	TME	Infektion durch kontaminiertes Tiermehl

seit 1898 bekannt (Cassirer, 1898). Die betroffenen Tiere zeigen Bewegungsstörungen, Verhaltensänderungen und Zittern. Durch einen zusätzlich auftretenden stetigen Juckreiz scheuern und kratzen sich die Tiere teilweise die Wolle von der Haut, wovon sich der englische Name Scrapie ableitet (kratzen: engl. to scrape). Heute tritt Scrapie in fast allen Schaf-züchtenden Ländern auf. Die Inkubationszeit liegt bei ca. 3,5 Jahren. Da man hohe Titer des Erregers im Fruchtwasser und in der Plazenta betroffener Tiere nachweisen konnte, wird angenommen, dass sich deren Nachkommen entweder bereits im Mutterleib oder bei der Geburt durch kleinere Hautläsionen bei ihrer Mutter anstecken (Pattison *et al.*, 1974). Demnach würde die Inkubationszeit dem Alter der erkrankten Tiere entsprechen.

Experimentell ist Scrapie auf die Maus (Chandler, 1961) und den Syrischen Goldhamster übertragbar (Marsh & Kimberlin, 1975). Da diese beiden Arten im Vergleich zum Schaf jedoch viel geringere Inkubationszeiten aufweisen und

einfacher zu halten sind, dienen Scrapie-infizierte Hamster und Mäuse als *in vivo* Modellsystem zur Erforschung der Prionkrankheiten. Auf den Menschen ist Scrapie wahrscheinlich nicht übertragbar, da epidemiologisch und historisch weltweit keinerlei Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Scrapie und irgendeiner Form einer humanen Prionerkrankung festgestellt werden konnte. So ist die Scrapie-Prävalenz in verschiedenen Ländern durchaus unterschiedlich, während die nicht genetisch bedingte CJD weltweit mit einer konstanten Rate auftritt. Selbst bei beruflich exponierten Personen wie z.B. Veterinärpathologen und Forschern konnte keine erhöhte Inzidenz für eine Erkrankung festgestellt werden (Hörnlimann *et al.*, 2007).

1.1.2 Bovine Spongiforme Enzephalopathie

Die 1985 erstmals aufgetretene Bovine Spongiforme Enzephalopathie ist innerhalb kurzer Zeit in das öffentliche Interesse gerückt. Bis heute traten ~183.000 Fälle von BSE auf, der Großteil davon mit 180.000 erkrankten Tieren in Großbritannien (Abb. 1.1). Nach dem Höhepunkt der BSE-Epidemie in der ersten Hälfte der 90er Jahre nehmen die Fälle kontinuierlich ab, lagen aber 2005 immer noch bei ca. 15 Fällen pro Monat. Bei der unterschiedlichen Verteilung der BSE-Fälle ist zudem zu berücksichtigen, dass es sich in Großbritannien überwiegend um klinische Fälle mit bereits ausgeprägter Symptomatik handelte. In den anderen Ländern waren die Rinder überwiegend nur bei Routine-*Post-Mortem*-Tests positiv getestet, waren also infiziert aber noch symptomfrei.

Zunächst tritt bei den erkrankten Rindern ein Konditions- und Gewichtsverlust auf, der zu einer verminderten Milchleistung führt. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es dann zu Verhaltens-, Bewegungs- und Sensibilitätsstörungen. Die Tiere werden hypersensibel gegenüber taktilen Reizen, Lärm und Licht, sie werden ängstlich und schreckhaft, nervös und unruhig. Das spätere Stadium ist von einer ausgeprägten Ataxie geprägt.

Allgemein wird heute angenommen, dass die Ursache der BSE-Epidemie in der Verfütterung von Tiermehl lag, welches entweder aus Scrapie-infizierten Schafskadavern oder aus Rindern hergestellt wurde, die mit einer sporadischen Form von BSE infiziert waren. Zwar wird Tiermehl bereits seit dem 19. Jahrhundert an Rinder verfüttert, jedoch wurden die Tierkadaver in dem Produktionsprozess durch einen Fettextraktionsschritt auf 120 °C erhitzt. Der damals noch unbekannt Erreger wurde so inaktiviert. Ab den 1970er Jahren wurde jedoch aus wirtschaftlichen Gründen auf diese Fettextraktion verzichtet.

Dadurch betrug die Maximaltemperatur während des Gesamtprozesses nur noch 90 °C und der ungewöhnlich hitzeresistente Erreger wurde nicht mehr inaktiviert.

Die weitaus meisten Fälle traten in Großbritannien auf, wobei die Scrapieinzidenz in manchen Gegenden bis zu 1 % betrug. Durch die unbewusste Verarbeitung von infizierten präklinischen BSE-Rindern zu Tiermehl, kam es zu einer weiteren Vermehrung des Erregers. Obwohl schon 1988 Maßnahmen gegen die Verfütterung von Tiermehl ergriffen wurden, kam es aufgrund der Inkubationszeit von 4 - 5 Jahren erst Anfang der 90er Jahre zum Maximum der Epidemie.

1.1.3 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

Die bei weitem häufigste Prionerkrankung beim Menschen ist die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit. Dabei sind ca. 85 % aller Fälle idiopathisch und stellen die sporadische Form der CJD dar. Die Inzidenz beträgt ungefähr 1 Fall pro 1 Mio. Menschen pro Jahr und ist weltweit nahezu gleich. 10 % der Fälle entfallen auf die genetisch bedingte familiäre fCJD, die autosomal-dominant vererbt wird und auf unterschiedliche Mutationen im Gen des Prion-Proteins (*Prnp*) zurückzuführen ist. Von der iatrogenen CJD sind bisher ca. 180 Fälle bekannt. Die meisten dieser Fälle gehen auf die Verabreichung von kontaminierten Wachstumshormonen zurück, die aus den Hypophysen von Leichen hergestellt wurden und damit die Gefahr eines nicht identifizierten CJD-Falles bargen. Etwa ein Drittel der iCJD-Fälle ist auf eine Infektion über Hirnhaut-Transplantate (*Dura mater*) zurückzuführen (Brown *et al.*, 1994). Es sind aber auch Fälle bekannt, bei denen die Infektion über Augenhornhaut-Transplantate oder über kontaminiertes neurochirurgisches Besteck bei neurochirurgischen Eingriffen erfolgte. Die Inkubationszeit der iCJD beträgt bei intrazerebraler Infektion durch kontaminiertes Operationsbesteck 15 - 28 Monate, nach Hirnhauttransplantationen 1 - 16 Jahre und bei peripherer Inokulation durch Hormoninjektionen 4,5 - 30 Jahre (Budka, 2001).

Der Krankheitsverlauf der CJD ist gekennzeichnet durch eine rasch fortschreitende Demenz. Die Krankheit beginnt zunächst schleichend, führt dann aber relativ schnell zu neurologischen Symptomen wie Myoklonie, Spastik, Tremor, einer gesteigerten Erregbarkeit der Reflexe (Hyperreflexie) sowie zu einem stark verminderten Bewegungsdrang (akinetischen Mutismus) und führt in der Regel nach 6 - 12 Monaten zum Tod. Häufig zeigen sich Veränderungen der Hirnaktivität im Elektroenzephalogramm (EEG). Eine gesicherte Diagnose

ist jedoch wegen der Ähnlichkeiten zu anderen Demenz-erkrankungen häufig erst durch histologische und biochemische Untersuchungen des Gehirns *post mortem* möglich.

Im Jahr 1995 wurde eine neue Variante der CJD (vCJD) diagnostiziert. Während die anderen Typen von CJD im Alter von 40 - 80 Jahren klinisch werden (Roos *et al.*, 1973), sind die an der neuen Variante Erkrankten im Durchschnitt erst 28 Jahre alt und der Krankheitsverlauf ist deutlich verlängert. Da die vCJD 10 Jahre nach den ersten BSE-Fällen und zunächst nur in Großbritannien auftrat (Abb. 1.1 und 1.2), wurde schon damals vermutet, dass diese Variante durch den Verzehr von BSE-kontaminierten Rinderprodukten ausgelöst werden könnte. Daher wird für die vCJD eine Inkubationszeit von 10 Jahren oder mehr angenommen. Bei der durch rituellen Kannibalismus bedingten Kuru in Papua-Neuguinea sind Inkubationszeiten von bis zu 40 Jahren möglich und bei der iCJD mit peripherer Inokulation von bis zu 30 Jahren (s.o). Da auch die vCJD wahrscheinlich durch eine periphere Infektion verursacht wird, könnten auch lange Inkubationszeiten möglich sein. Inzwischen sinken die Fallzahlen immer weiter, es wäre aber möglich, dass viel mehr Menschen bereits mit der vCJD infiziert sind, aber erst in ca. 20 Jahren erkranken, und dass noch jahrzehntelang vCJD-Fällen auftreten.

Bei der varianten CJD ist der Erreger bereits in einem frühen Stadium in peripheren Organen wie z.B. der Milz nachweisbar, noch bevor er das Gehirn erreicht, was eine periphere Infektion wahrscheinlich über den Darm vermuten lässt. Des Weiteren konnte durch biochemische und histopathologische

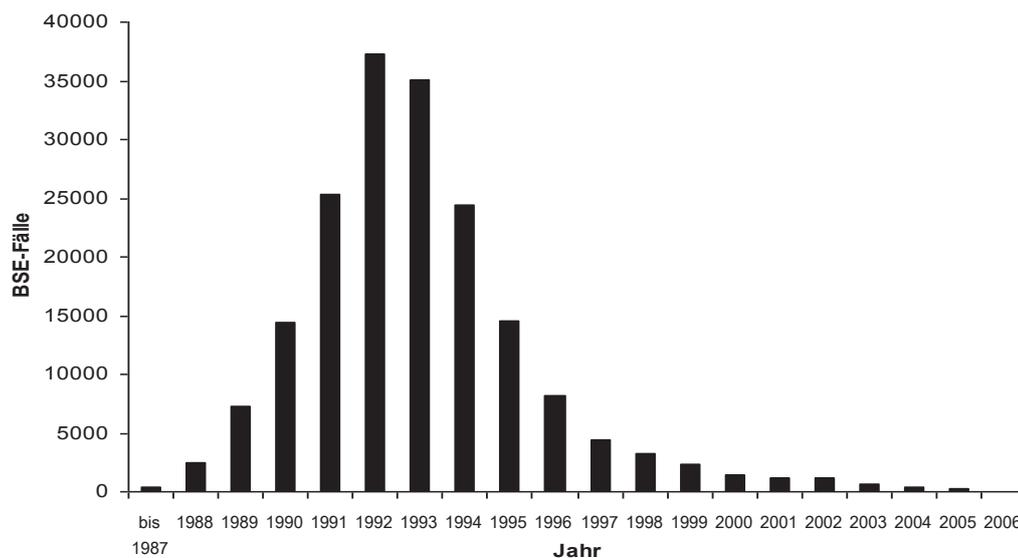


Abb. 1.1: Verlauf der BSE-Epidemie in Großbritannien.

2006 traten bis Mai in Großbritannien 63 BSE-Fälle auf.

(Quelle: OIE World Organisation for Animal Health, DEFRA (UK), Stand 04/2006)

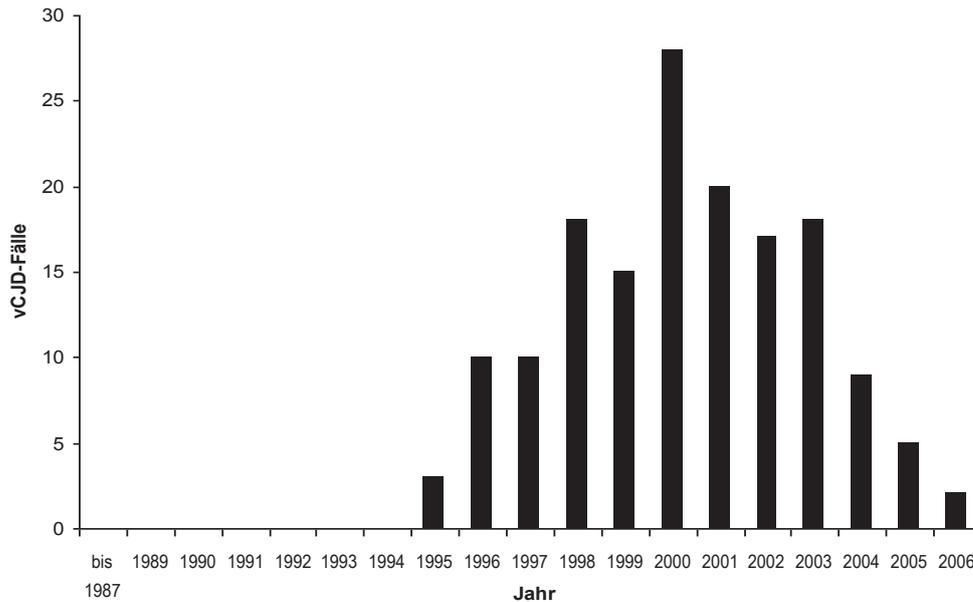


Abb. 1.2: Anzahl der gesicherten vCJD-Fälle in Großbritannien

(Quelle: UK Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit. Stand 04/2006)

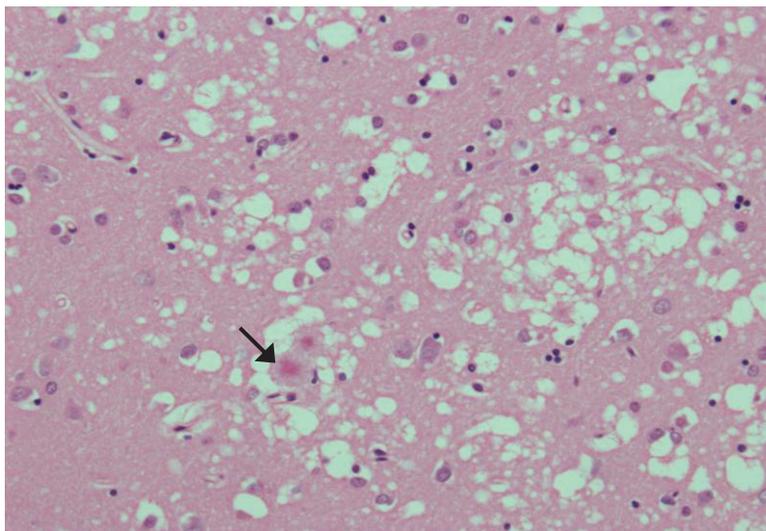


Abb. 1.3: Histopathologie der grauen Hirnsubstanz (*substantia grisea*) bei der neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD). Durch die Vakuolisierung und das Absterben der Neuronen entsteht ein schwammartiges Aussehen des Gewebes. Der Pfeil zeigt einen der für die vCJD typischen floriden Plaques, die bei den anderen Formen der CJD nicht vorkommen, wohl aber bei mit BSE infizierten Rindern. (Foto aus: Dumpitak & Riesner, 2005)

Untersuchungen gezeigt werden, dass sich die Erreger von BSE und vCJD mehr ähneln als die von sCJD und vCJD. So zeigen Hirngewebsschnitte von verstorbenen vCJD-Patienten neben den spongiformen Veränderung auch erheblich dichtere Prion-Protein-Ablagerungen und die typischen so genannten floriden Plaques (Abb. 1.3), die sonst nur bei BSE vorkommen, nicht aber bei

den anderen Formen der CJD. Auch Mäuse und Makaken, die mit BSE und vCJD infiziert wurden, zeigten nahezu identische histopathologische und neurologische Symptome, die sich von denen mit sCJD infizierten deutlich unterscheiden ließen (Lasmezas *et al.*, 1996, Bruce *et al.*, 1997, Hill *et al.*, 1997).

1.2 Eigenschaften des TSE-Erregers

Obwohl einzelne TSE wie Scrapie und sCJD schon seit langem bekannt waren, war es lange Zeit nicht möglich, den Erreger zu isolieren und zu charakterisieren. So wurde weder ein Virus noch ein Bakterium gefunden. Bei Versuchen, den Erreger in Hirnextrakten erkrankter Tiere zu deaktivieren, entdeckte Tikvah Alper 1967, dass dieser im Vergleich zu Nukleinsäuren eine enorme Stabilität gegenüber ionisierender und ultravioletter Strahlung besaß (Alper *et al.*, 1967). Zudem konnte bei keiner der Erkrankungen eine klassische Immunantwort auf die Infektion festgestellt werden, so dass es bereits damals erste Spekulationen gab, dass weder ein Virus noch ein Bakterium für diese Krankheiten verantwortlich sei.

In den 80er Jahren konnte Stanley B. Prusiner zeigen, dass die Infektiosität von Hirnextrakten durch Nukleinsäure abbauende oder denaturierende Methoden nicht, durch Protein-denaturierende und -abbauende Methoden, z.B. ein stark basischer pH-Wert, aber sehr wohl inaktiviert werden konnte (Prusiner *et al.*, 1981). Im Folgenden prägte er für diese vollkommen neue Erregerklasse den Namen *Prion*, abgeleitet von „proteinaceous infectious particle“ (Prusiner, 1982). Nach der Prion-Hypothese besteht der Erreger der TSE überwiegend, wenn nicht sogar ausschließlich, aus Protein. Diese Theorie war jedoch anfangs heftig umstritten, da sie dem Dogma der Molekularbiologie widersprach, wonach Replikation und Weitergabe von Informationen nur über Nukleinsäuren geschehen kann. Doch weitere Analysen des Erregers ergaben, dass eine Erreger-spezifische Nukleinsäure mit einer Größe von mehr als 50 Nukleotiden, später sogar 25, ausgeschlossen werden kann (Kellings *et al.*, 1992; Safar *et al.*, 2005).

Nachdem man dann entdeckte, dass der Erreger gegen eine Verdauung mit Proteinase K (PK) resistent ist, konnte man diesen mittels PK-Behandlung des infizierten Gewebes aufreinigen und das Protein, aus dem er bestand, sequenzieren. Als Hauptbestandteil des Erregers konnte ein wirtseigenes 33 - 35 kDa großes Protein identifiziert werden, das auf dem Chromosom 20 codiert ist und sowohl bei infizierten als auch gesunden Tieren und Menschen

vorkommt. Es wurde daraufhin Prion-Protein (PrP) genannt (Oesch *et al.*, 1985). Bei erkrankten und gesunden Organismen, mit Ausnahme der genetischen Fälle (fCJD), sind die Aminosäuresequenzen des Prion-Protein (Stahl *et al.*, 1993) sowie dessen posttranslationalen Modifikationen identisch. Da das Prion-Protein auch im gesunden Organismus exprimiert wird ohne ein Krankheit auszulösen (Basler *et al.*, 1986), muss es demnach in zwei unterschiedlichen Isoformen vorliegen, einer normalen oder zellulären Isoform PrP^C (C für cellular) und einer erregerassoziierten Isoform PrP^{Sc} (Sc für Scrapie). Eine ausführliche Darstellung der Entdeckung des Prions ist bei Prusiner (1998) nachzulesen.

1.3 Struktur des zellulären Prion-Proteins

PrP^C ist ein membranassoziiertes Protein, welches über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) an die Zellmembran gebunden ist. Es kommt auf den Zellen verschiedener Gewebe und Organe vor, sowie auf Leukozyten, jedoch nicht in der Leber und der Pankreas (Weissmann, 1994). Die größte Menge wird von Neuronen exprimiert. Daher findet sich die weitaus höchste Konzentration von PrP^C im Zentralen Nervensystem (ZNS), wie *in situ* Hybridisierungen gegen PrP^C-mRNA zeigten (Kretzschmar *et al.*, 1986). Doch selbst hier macht es nur weniger als 0,1 % des Gesamtproteins aus (Oesch *et al.*, 1985; Turk *et al.*, 1988).

Die Sequenz des Prion-Proteins ist bei den Säugetieren stark konserviert, d.h. annähernd 90 % der Aminosäuren sind identisch. Das primäre Translationsprodukt des PrP-Gens (*Prnp*) besteht beim Syrischen Goldhamster aus 254 Aminosäuren (Abb. 1.4). Am N-Terminus befindet sich eine 22 Aminosäuren lange Signalsequenz, die beim Eintritt in das Endoplasmatische Retikulum abgeschnitten wird. In der N-terminalen Domäne des PrP^C findet sich zudem ein hochkonservierter unstrukturierter fünffacher Oktarepeat, der eine starke Cu²⁺-Bindeaffinität zeigt (Jackson *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2000). Weitere 23 Aminosäuren am C-Terminus stellen die Signalsequenz für den GPI-Anker dar, der im Golgi-Apparat an das endständige Serin angehängen wird, wodurch das Prion-Protein bereits hier mit der Membran der Golgi-Vesikel assoziiert ist. Zwischen den beiden Cysteinen an den Positionen 179 und 214 wird eine Disulfidbrücke gebildet. Als weitere posttranslationale Modifikationen werden über die Aminosäuren Asn 181 und Asn 197 N-Glykosylierungen angefügt, wobei nicht unbedingt beide Glykosylierungsstellen besetzt sein müssen, so dass ein heterogenes.

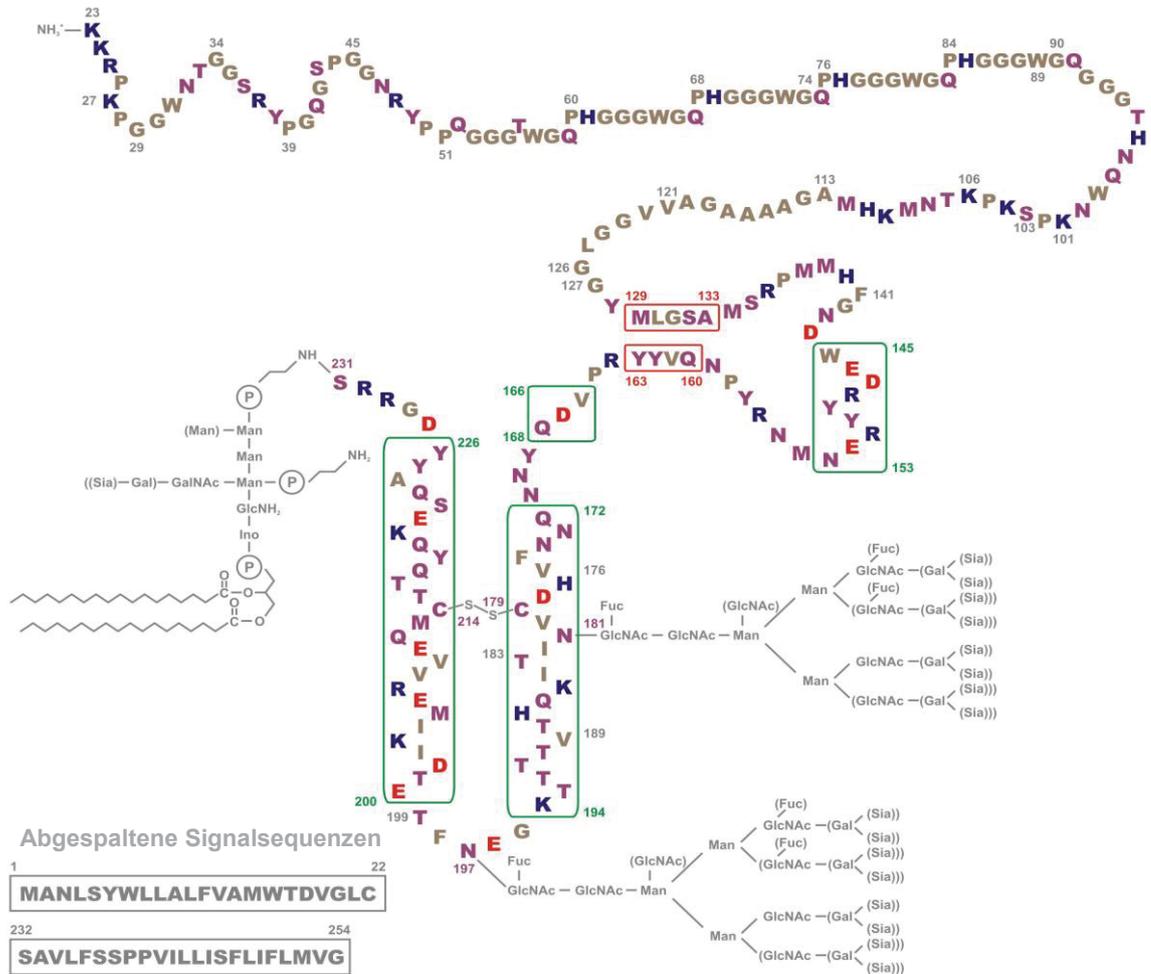


Abb. 1.4: Schematische Darstellung des maturierten PrP^C des Syrischen Goldhamsters
 Grüne Kästen: α -helikale Bereiche; rote Kästen: β -Faltblattstruktur; braune AS: unpolar hydrophob; rote AS: sauer; blaue AS: basisch; violette AS: polar; AS 51-91: fünffacher Oktarepeat (Darstellung aus: Dumpitak, 2003)

Glykosylierungsmuster entsteht. GPI-Anker und N-Glykosylierungen können noch unterschiedlich sialisiert sein, so dass sich eine Molekulargewichtsverteilung von 33 - 35 kDa ergibt. Auf der Plasmamembran ist PrP^C wie viele GPI-verankerte Proteine hauptsächlich in Mikrodomänen, den so genannten Rafts, lokalisiert, die reich an Sphingolipiden und Cholesterol sind (Vey *et al.*, 1996; zur Übersicht: Prado *et al.*, 2004).

Strukturell besteht PrP^C zu 42 % aus α -helikalen Bereichen und nur sehr geringem β -Faltblattanteil, wie Strukturuntersuchungen mittels Infrarotspektroskopie und Circular dichroismus-Spektroskopie gezeigt haben (Pan *et al.*, 1993), während der Rest, vor allem der N-Terminus, relativ flexibel ist, wie NMR-Untersuchungen zeigten (Donne *et al.*, 1997). Die genaue dreidimensionale Struktur wurde durch hochauflösende NMR-Spektroskopie von verkürztem

rekombinanten PrP ermittelt und zeigt 3 α -Helices und ein kurzes β -Faltblatt (Abb. 1.5 A) (Riek *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1999). Zwar fehlten diesen Prion-Proteinen die N-terminale Domäne sowie die posttranslationalen Modifikationen, doch der Vergleich von 1D-NMR-Spektren von rekombinatem bovines PrP und natürlichem PrP^C aus Kälberhirnen zeigte, dass beide Spektren im Wesentlichen übereinstimmen (Hornemann *et al.*, 2004). Daher wird davon ausgegangen, dass die Struktur des rekombinanten PrP dem des PrP^C entspricht.

PrP^C ist in milden Detergentien löslich, jedoch wegen der Membranverankerung und der geringen Menge schwierig aus Säugerhirnen aufzureinigen. Daher wird in der Grundlagenforschung häufig rekombinantes PrP (rekPrP) aus *E. coli* verwendet, welches jedoch aufgrund der bakteriellen Herkunft keine Glykosylierungen und keinen GPI-Anker besitzt (Mehlhorn *et al.*, 1996). Außerdem ist nach dessen Aufreinigung die Disulfidbrücke noch nicht ausgebildet, die sich nur im reduzierenden Milieu des Endoplasmatischen Retikulums bilden kann. Das rekPrP kann daher nicht richtig falten und akkumuliert in den Bakterienzellen in „Inclusion Bodies“. Um es in seine native Form überführen zu können, muss es daher noch *in vitro* reduziert und rückgefaltet werden.

1.4 Natürliche Funktion des zellulären Prion-Proteins

Obwohl die starke Konservierung der PrP-Sequenz auf eine wichtige oder sogar essentielle Rolle im Organismus hinweist, sind PrP-knock-out-Mäuse (PrP^{0/0}) voll entwicklungs- und lebensfähig (Büeler *et al.*, 1992). Sie zeigen lediglich leichte Symptome wie einen veränderten Schlafrhythmus (Tobler *et al.*, 1996). Entweder ist die Funktion des Prion-Proteins redundant oder kommt nur unter selektivem Druck, nicht aber unter Laborbedingungen zum tragen. So zeigt eine neuere Studie an PrP^{0/0}-Mäusen einen Einfluss des PrP^C auf das Verhalten und die Modulation von Angst nach akutem körperlichen und psychischen Stress (Nico *et al.*, 2005).

Unter anderem wird für das Prion-Protein auch eine neuroprotektive Funktion diskutiert, die Neuronen vor Schäden durch traumatische Hirnverletzung schützt (Hoshino *et al.*, 2003). Diese These wird unterstützt durch Ergebnisse, wonach PrP nach ebensolchen Verletzungen stark hochreguliert wird, was für eine Beteiligung an dem Heilungsprozess der Neuronen spricht (Marciano *et al.*, 2004). Mehrere andere Studien lieferten starke Hinweise, dass PrP^C vor Bax-vermittelten Zelltod schützt und somit eine anti-apoptotische Funktion innehat (zur Übersicht: Roucou & LeBlanc, 2005).

Die Kupferbindeaktivität des Prion-Proteins lässt ferner eine Rolle im Kupferhaushalt des ZNS vermuten (Herms & Kretzschmar 2001). So haben PrP^{0/0}-Mäuse einen signifikant niedrigeren Cu²⁺-Gehalt im Hirn als Wildtyp-Mäuse und die Zugabe von Cu²⁺⁺ stimuliert die Internalisierung von PrP (Brown & Harris, 2003). PrP könnte demnach direkt für die Aufnahme von Cu²⁺ verantwortlich sein, oder aber durch dessen Bindung eine antioxidative Funktion besitzen (Rachidi *et al.*, 2003; Haigh *et al.*, 2005). So zeigen Zellkulturen neuronaler Zellen von PrP^{0/0}-Mäusen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber oxidativem Stress. Andere Studien zeigen eine Rolle des PrP^C bei der Signaltransduktion, bei dem über Zelladhäsion vermittelten Zellwachstum und der Differenzierung von Neuronen und der Erhaltung der Myelinscheiden im PNS (Mouillet-Richard *et al.*, 2000; Schmitt-Ulms *et al.*, 2001; Santuccione *et al.*, 2005; Kanaani *et al.*, 2005; Bremer *et al.*, 2010; Benvegnù *et al.*, 2011).

1.5 Struktur des krankheitsassoziierten PrP^{Sc}

Wie bereits erwähnt (Kap. 1.2) weisen PrP^C und PrP^{Sc} die gleiche Aminosäuresequenz auf und sind auch was posttranslationale Modifikationen angeht identisch (Stahl *et al.*, 1993). Sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Struktur sowie ihren biochemischen und physikalischen Eigenschaften. Bei Verdauung von PrP^C mit Proteinase K wird dieses komplett abgebaut. Bei PrP^{Sc} hingegen werden nur ca. 68 Aminosäuren des N-Terminus abgebaut, während die C-terminale Domäne resistent gegen die enzymatische Verdauung ist. Das resistente Fragment weist ein Molekulargewicht von 27 - 30 kDa auf, wird deshalb entweder PrP 27-30 oder aufgrund seiner Resistenz resPrP genannt und bildet nach der Aufreinigung stäbchenartige Strukturen, die so genannten Prion-Rods (Prusiner *et al.*, 1983). Da PrP^C und PrP^{Sc} chemisch identisch sind, wird für PrP^{Sc} eine strukturbedingte verminderte Zugänglichkeit für Proteasen angenommen. Da ferner die Infektiosität von PrP^{Sc} durch die Verkürzung nicht vermindert wird, scheint der N-Terminus für diese nicht essentiell zu sein, so dass *in vitro* häufig rekombinantes PrP(90-231) mit der dem PrP27-30 entsprechenden Sequenz, d.h. den Aminosäuren 90 - 231, verwendet wird. Bei einigen Prion-Stämmen konnte gezeigt werden, dass es PK-sensitives PrP^{Sc} gibt, mit teilweise bis zu 90 % des gesamten PrP^{Sc} (Safar *et al.*, 1998). PK-Resistenz ist somit kein ausreichender Marker, um zwischen PrP^C und PrP^{Sc} zu diskriminieren.

Der eindeutig signifikante Unterschied von PrP^{Sc} zu PrP^C ist die deutlich andere Struktur. Während PrP^C überwiegend α -helikal strukturiert ist, besteht das PrP^{Sc}

zu 43 % aus β -Faltblatt und nur zu einem deutlich geringeren Teil aus α -Helices (Pan *et al.*, 1993; Safar *et al.*, 1993).

Ein weiteres Merkmal von PrP^{Sc} ist die vollständige Unlöslichkeit. Es liegt in milden Detergentien nicht monomer vor, sondern in Form amorpher Aggregate teilweise aber auch amyloiden Fibrillen (Merz *et al.*, 1981). Gerade diese Oligomerisierung scheint für die Infektiosität essentiell zu sein, da die Solubilisierung von PrP^{Sc} zu einem Verlust der Infektiosität führt (Riesner *et al.*, 1996; Silveira *et al.*, 2005). Die Solubilisierung geht jedoch auch mit einer Änderung der Struktur des PrP^{Sc} einher. Der β -Faltblatt-Anteil wird verringert, während der der α -Helices steigt. Dies bedeutet, dass die Sekundärstruktur und Oligomerisierung des PrP eng mit einander verknüpft sind und den wesentlichen Charakter des Erregers ausmachen. Eine zusammenfassende Übersicht über die molekularen Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc} zeigt die Tabelle 1.2.

Die genaue dreidimensionale Struktur des PrP^{Sc} konnte bisher aufgrund dessen Unlöslichkeit und der amorphen Aggregationsform mit hoch auflösenden Methoden wie NMR oder Röntgenstrukturanalyse nicht bestimmt werden. Dennoch konnte aus der Elektronenbeugung an 2D-Kristallen von PrP 27-30 mit einer Auflösung von circa 12 Å eine dreifache Symmetrie gezeigt werden (Wille *et al.*, 2002). Zusammen mit Daten aus der Literatur konnte daraus ein Strukturmodell entwickelt werden, in dem die Aminosäuren 89 - 175 eine linkshändig β -helikale Konformation aus mehreren β -Faltblättern einnehmen (Abb. 1.5 B und C). Diese β -Helices formen Trimere, wie aus der Symmetrie der 2D-Kristalle abgeleitet werden kann. Durch eine Stapelung der Trimere kann es, dem Modell nach, auch zur Fibrillenbildung kommen (Abb. 1.5 D). Der jeweilige C-Terminus (176-227) ist weiterhin α -helikal und die Disulfidbrücke

Tab 1.2: Eigenschaften der zellulären und der krankheitsassoziierten Isoform von PrP

Eigenschaft	Zelluläres PrP^C	PrP^{Sc}
Infektiosität	nicht infektiös	infektiös
Proteinase K Sensitivität	sensitiv	resistenter C-Terminus
überwiegender Sekundärstrukturanteil	α -Helix	β -Faltblatt
Löslichkeit	in milden Detergentien löslich	unlöslich
Aggregationszustand	monomer/ membranassoziiert	aggregiert

bleibt intakt. Die genaue Orientierung der Zuckerseitenketten des PrP^{Sc} ist aus den 2D-Kristallen nicht zu erkennen. Vermutlich ragen sie aus den Fibrillen heraus (Govaerts *et al.*, 2004).

Die Einbeziehung des N-Terminus (23-88) in das Modell würde zu einer sterischen Behinderung der Fibrillenbildung führen, was lange Zeit gut zu der Beobachtung passte, dass Vollängen-PrP *in vivo* nicht in Fibrillen überführt werden konnte. Jedoch konnten Fibrillen *in vitro* aus Hamsterhirnen aufgereinigtem unverkürztem SHa PrP^C (Leffers *et al.*, 2005) und murinem rekPrP(23-231) dargestellt werden (Bocharova *et al.*, 2005). Offensichtlich lassen sich Bedingungen finden, bei denen diese sterische Behinderung minimiert werden kann. Zwar wurde für diese Fibrillen bisher keine Infektiosität gezeigt, das oben genannte Modell ist damit aber noch nicht widerlegt.

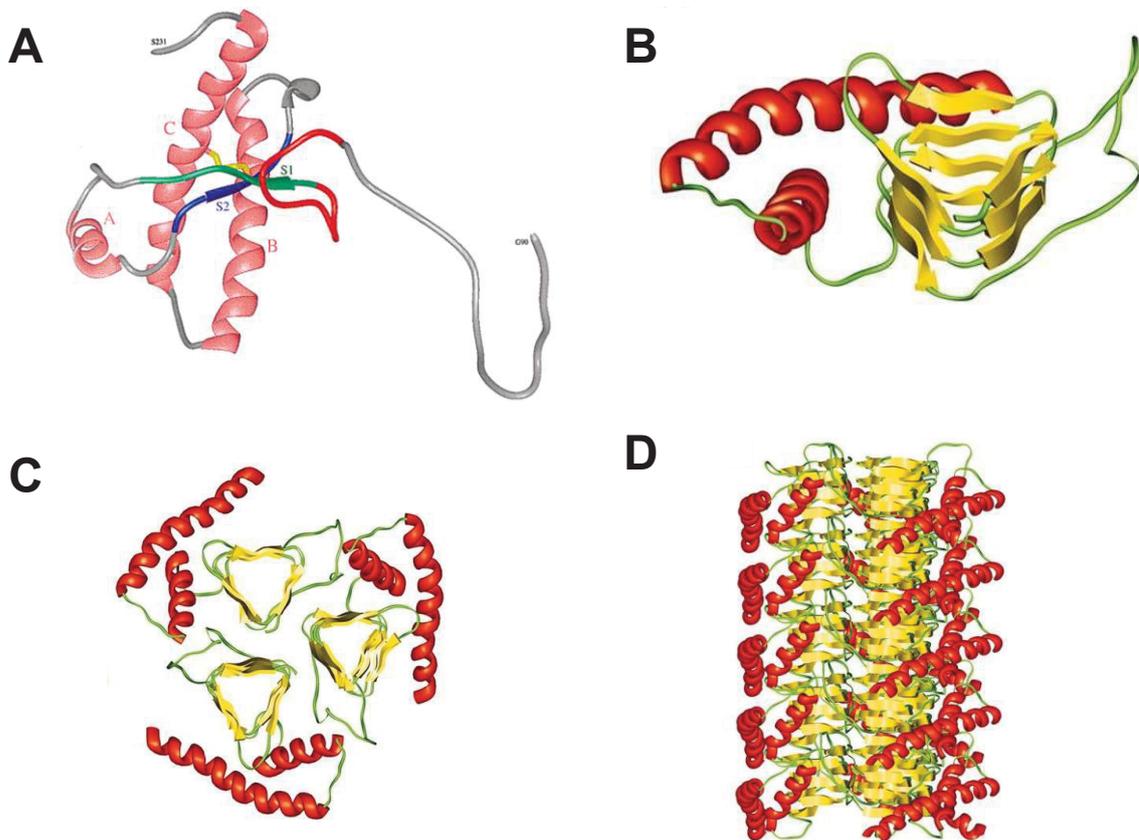


Abb. 1.5: Struktur von PrP(90-231) des Syrischen Goldhamsters und Modell von PrP^{Sc}

A NMR-Struktur von rekPrP(90-231) des Syrischen Goldhamsters (SHa rekPrP(90-231)) mit den 3 α -Helices und dem β -Faltblatt aus den zwei Strängen S1 und S2 (Liu *et al.*, 1999). **B** Strukturmodell von PrP 27-30, das aus den Daten der elektromikroskopischen Untersuchung von 2D-Kristallen von abgeleitet wurde. **C** PrP 27-30 Trimere die nebeneinander gelagert die 2D-Kristalle bilden oder aber, wie in **D** gezeigt, gestapelt Fibrillen bilden können (Govaerts *et al.*, 2004)

1.6 Replikation von PrP^{Sc}

Nach der Identifikation von PrP als Hauptbestandteil der Prionen entwickelte Stanley Prusiner seine Prion-Hypothese dahingehend weiter, dass die Prionen nicht aus irgendeinem oder mehreren Proteinen bestehen, sondern dass ausschließlich das Prion-Protein essentiell ist und die Pathogenität auf der Umfaltung von PrP^C in PrP^{Sc} beruht (Prusiner *et al.*, 1990). Demnach ist die Konformation des PrP^{Sc} der alleinige Informationsträger für die Prionerkrankung und nicht wie bei allen anderen Krankheitserregern eine spezifische Nukleinsäure. Die Replikation dieser Information und des Erregers erfolgt über die direkte Interaktion von PrP^{Sc} mit PrP^C. Dadurch zwingt das PrP^{Sc} dem PrP^C seine eigene Struktur auf und katalysiert somit die Umfaltung von PrP^C in die pathogene Isoform. Dass Proteine die Faltung von anderen Proteinen beeinflussen können, ist bereits von den Chaperonen bekannt. Das neu gebildete PrP^{Sc} ist dann wiederum in der Lage, weiteres PrP^C zu rekrutieren und umzufalten.

Bereits mit diesem sehr einfachen Modell lassen sich alle drei Ätiologien der Prionkrankheiten erklären. Der Replikationsmechanismus ist bei allen drei Formen derselbe, unterschiedlich ist nur die Herkunft des initialen PrP^{Sc}. Bei einer Infektion ist es ein exogener Erreger, der auf welche Weise auch immer in das ZNS eindringt und dort die Konversion des endogenen PrP^C auslöst. Bei den genetischen Formen der Prionkrankheiten liegen Mutationen im PrP-Gen (*Prnp*) vor, die die thermodynamische Stabilität der PrP^C-Konformation verringern und so zu einer Konversion in die PrP^{Sc}-Isoform führen (Cohen *et al.*, 1994; Huang *et al.*, 1994). Tatsächlich wurde ein derartig destabilisierender Effekt für mehrere Mutationen gezeigt, die eine Prionerkrankung auslösen. Einige andere Mutationen zeigen einen derartigen Effekt nicht, so dass es noch einen anderen Mechanismus als den des reinen PrP^C-Destabilisierung für die genetischen Formen der Prionkrankheiten geben muss (zur Übersicht: Kong *et al.*, 2004; Govaerts *et al.*, 2004b).

Die sporadischen Formen sind wahrscheinlich entweder auf eine aufgrund einer sehr selten auftretenden „spontane“ Umfaltung von PrP^C in PrP^{Sc} oder auf eine spontane somatische Mutation im PrP-Gen zurückzuführen, wodurch ein erster PrP^{Sc}-Keim gebildet wird. Hierfür spricht die weltweit relativ konstante Inzidenz für die sCJD. Dieses Modell wurde von Fred Cohen zum Heterodimer-Modell (Abb. 1.6) erweitert. Dabei erfolgt die Replikation des PrP^{Sc} über eine lineare Autokatalyse. PrP^C liegt mit einem geringen Anteil von PrP* im Gleichgewicht vor, welches eine leicht destabilisierte Struktur aufweist, die sich aber alleine nicht in PrP^{Sc} umfaltet. PrP^{Sc} kann jedoch dieses PrP* binden, wodurch ein Heterodimer entsteht. Das PrP* nimmt dann die Struktur des PrP^{Sc} an, so dass

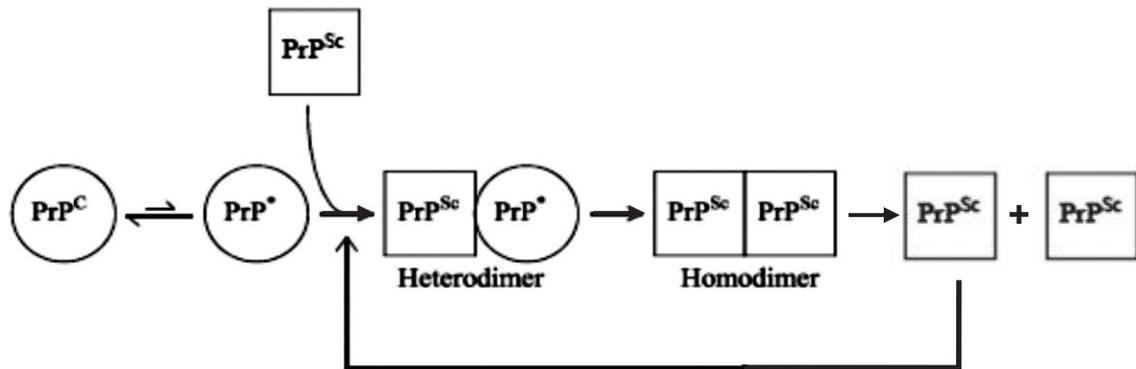


Abb. 1.6: Heterodimer-Modell der PrP^{Sc}-Replikation

PrP^{Sc} bindet an das destabilisierte PrP^{*} und bildet mit ihm ein Heterodimer. Das PrP^{*} faltet sich dadurch ebenfalls in ein PrP^{Sc} um, ein Homodimer entsteht. Dieses kann die Umfaltung weiterer PrP^{*} katalysieren. Dissoziiert das Homodimer kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung von PrP^{Sc}. (Verändert nach Cohen *et al.*, 1994)

nun ein Homodimer vorliegt, welches wieder dissoziieren und die Umfaltung weiterer PrP^{*} katalysieren kann (Prusiner *et al.*, 1990; Cohen *et al.*, 1994). Voraussetzung für dieses Modell ist, dass PrP^{Sc} thermodynamisch stabiler ist als PrP^C. Dies konnte bisher jedoch nicht eindeutig gezeigt werden.

Nach dem Heterodimer-Modell würde es durch die Autokatalyse zu einer exponentiellen Replikation von PrP^{Sc} kommen. Dies wird jedoch weder *in vivo* noch *in vitro* in dieser Weise beobachtet. Daher schlug Manfred Eigen ein Modell vor, nach dem nicht ein sondern mehrere PrP^{Sc}-Moleküle kooperativ die Umfaltung eines PrP^C bewirken. Dieses Modell liefert Replikationsraten, die gut mit den beobachteten übereinstimmen (Eigen, 1996).

Lansbury entwickelte ein Modell, das von bekannten Modellen der Kristallisation ausgeht. Er nimmt eine keiminduzierte Polymerisation an, bei der das Gleichgewicht von PrP^C und monomerem PrP^{Sc} auf der Seite des oligomeren PrP^{Sc} liegt. Das bedeutet, hier wäre oligomeres PrP^{Sc} die thermodynamisch stabilere Isoform, jedoch erst wenn sich ein Nukleationskeim von einer kritischen Größe gebildet hat. Das PrP^{Sc} wird dadurch stabilisiert und der Keim kann durch die schnellere Anlagerung weiterer PrP^C-Monomere wachsen, da durch die Anlagerung an den Keim die Umfaltung in PrP^{Sc} nun begünstigt ist (Abb. 1.7). Im Falle einer Infektion wird dieser Nukleationskeim von außen zugeführt, bei den anderen Formen bildet er sich aus endogenem PrP^C. Im weiteren Krankheitsverlauf kann das gebildete Aggregat dann in kleinere zerfallen, die wiederum als Keime dienen können und so zu einer Ausbreitung der Krankheit führen (Jarret & Lansbury, 1993; Come *et al.*, 1993; Caughey & Lansbury, 2003). Dieses Modell wurde in den letzten Jahren durch mehrere Arbeiten anderer Gruppen unterstützt. So zeigte sich, dass die Zugabe

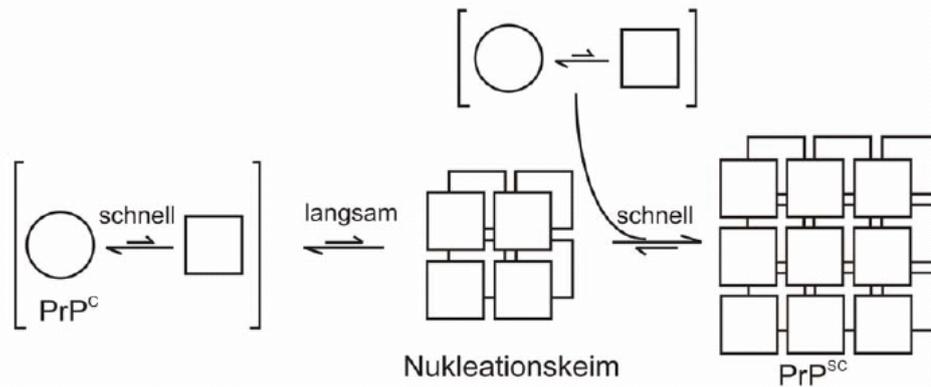


Abb. 1.7: Keiminduzierte PrP^{Sc}-Replikation

Erst durch die Bildung eines Nukleationskeims mit einer bestimmten kritischen Größe wird die als Monomer instabilere PrP^{Sc}-Isoform begünstigt. Liegt erst einmal ein solcher Keim vor, geht die weitere Anlagerung und Umwandlung in PrP^{Sc} deutlich schneller. Die gewachsenen Keime können auch teilweise wieder in kleinere zerfallen und so Tochterkeime bilden, die zu einer Ausbreitung der Krankheit führen. (Verändert nach Jarret & Lansbury, 1993)

von Nukleationskeimen, die einem Oligomer oder schon dem Polymer entsprechen, zu einer Konversion des in Hirnhomogenat gesunder Tiere enthaltenen PrP^C führt (Saborio *et al.*, 2001; Castilla *et al.*, 2005).

Was genau letztendlich die Pathogenität, also das Absterben der Neuronen, bei den Prionkrankheiten verursacht, ist bisher noch nicht geklärt. Da PrP^{0/0}-Mäuse gesund sind und keine Symptome einer Prionerkrankung aufzeigen (s. Kap. 1.4), scheint die Pathogenität von PrP^{Sc} nicht durch den Verlust der zellulären Funktion des PrP^C bedingt zu sein. Vielmehr scheint eine Neurotoxizität durch die Umfaltung des Prion-Proteins zu entstehen. Zusätzlich stellte sich heraus, dass PrP^{0/0}-Mäuse auch resistent gegenüber einer Infektion mit PrP^{Sc} sind und dass sie die Krankheit auch nicht weitergeben können (Büeler *et al.*, 1993). Das heißt, dass endogenes PrP^C sowohl für die Replikation des Erregers als auch für die Pathogenität essentiell ist. Daher ist es wahrscheinlich, dass es im Pathogenese-Mechanismus, wie von Prusiner postuliert (Prusiner *et al.*, 1990), zu einer Interaktion von PrP^C und PrP^{Sc} kommt. Auch die Sequenzspezifität bei der Konversion lässt diese Interaktion vermuten (Horiuchi *et al.*, 2000; Kocisko *et al.*, 1995).

Für die Pathogenese ist zusätzlich notwendig, dass das PrP^C auf der Zelloberfläche verankert ist. So zeigen Neuronen, die kein PrP^C exprimieren, keine pathologischen Veränderungen, wenn sie mit PrP^{Sc} in Kontakt kommen (Brandner *et al.*, 1996). Außerdem entwickeln transgene Mäuse, die PrP ohne GPI-Anker exprimieren, bei einer Infektion mit Scrapie anscheinend keine klinische Krankheit. Sie zeigen aber Vakuolisierung, eine Aktivierung der Astrozyten und zahlreiche PrP^{Sc}-Plaques, die im Gegensatz zu normalen Scrapie-infizierten Mäusen Thioflavin T positiv d.h. amyloid sind (Chesebro

et al., 2005; Trifilo *et al.*, 2006). Folglich ist der GPI-Anker nicht essentiell für die Replikation und Infektiosität von PrP^{Sc}. Für das endogene neuronale PrP^C ist er jedoch Voraussetzung für Pathogenität des PrP^{Sc}.

Unklar ist, wo und wann während der Umfaltung die eigentliche Infektiosität entsteht und wie ein infektiöses Partikel genau aufgebaut ist. Die Analyse von PrP^{Sc}-Fraktionen unterschiedlicher Größe ergab, dass Prionpartikel nach einer bestimmten Detergentienbehandlung für 300 - 600 kDa die höchste Konversionsaktivität und Infektiosität im Verhältnis zur Partikelzahl aufweisen. Weder die langen amyloiden Fibrillen noch die großen amorphen Aggregate sind die infektiösesten Spezies, sondern mittelgroße Partikel mit 14 - 28 PrP-Molekülen (Silveira *et al.*, 2005). Oligomere mit weniger als 6 PrP-Molekülen zeigen überhaupt keine Konversionsaktivität. Bereits vorher konnte gezeigt werden, dass die kleinsten krankheitsassoziierten Aggregate 600 kDa groß sind (Tzaban *et al.*, 2002) und Oligomere mit 4 - 6 PrP-Molekülen nicht infektiös sind (Riesner *et al.*, 1996). Auch für die Alzheimersche Erkrankung, ebenfalls eine neurodegenerative Erkrankung mit amyloiden Proteinablagerungen, wird diskutiert, dass eher die kleineren Protofibrillen oder Oligomere für die Pathogenität verantwortlich sind als die langen amyloiden Fibrillen (Caughey & Lansbury, 2003; Cleary *et al.*, 2005). Demnach wären amyloide PrP-Fibrillen selbst nicht pathogen, wohl aber infektiös. Das heißt, sie sind nicht direkt neurotoxisch, können aber endogenes PrP^C in eine pathogene Form umfalten.

Dem widerspricht auf den ersten Blick die Arbeit von Legname und Kollegen (2004), denen es erstmals gelang, verkürztes rekombinantes PrP(89-230) der Maus alleine, ohne die Zugabe eines weiteren Faktors, *in vitro* in eine infektiöse Form zu überführen. Das rekPrP(89-230) bildet bei hoher Konzentration unter teildeneraturierenden Bedingungen bei saurem pH Fibrillen aus, die für Thioflavin T, einen amyloid-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff, positiv sind. Die Inokulation dieser Fibrillen in entsprechend transgene Mäuse, die vor einem PrP^{0/0} Hintergrund PrP^C(89-230) überexprimieren, führte zu neurologischen Dysfunktionen. Die weitere Passage von Hirnhomogenat dieser erkrankten Mäuse in Wildtyp-Mäuse löst bei diesen eine Prionerkrankung aus. Die direkte Inokulation in Wildtyp-Mäuse löste hingegen keinerlei Krankheit aus. Diese „synthetischen Prionen“ weisen jedoch, gemessen an der PrP-Menge, nur eine geringe Infektiosität auf und zeigen deutlich verlängerte Inkubationszeiten. Bei der Passage synthetischer Prionen von transgenen Mäusen in Wildtyp-Mäuse entspricht die Inkubationszeit aber schon nahezu der der natürlichen Prionen. Folglich kam es während der Passage zu einer erheblichen Zunahme der Infektiosität (Legname *et al.*, 2004). Dieses Experi-

ment kommt dem endgültigen Beweis der Prion-Hypothese schon sehr nahe. Die PrP überexprimierenden Mäuse konnten aber unter Umständen spontan Symptome ähnlich einer Prionkrankheit entwickeln, diese Erkrankung erwies sich aber als nicht übertragbar. Dennoch wäre das finale Experiment die Infektion von Wildtyp-Mäusen mit synthetischen Prionen ohne vorherige Passage. Dies konnte inzwischen ebenfalls erreicht werden. Synthetische Prionen konnten aus rekombinantem PrP inkubiert in Gegenwart eines Phospholipids und RNA generiert werden, die sogar bei Wildtypmäusen eine Prionkrankheit auslösen konnten (Wang *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

Inwieweit die gebildeten Fibrillen die infektiöse PrP-Spezies darstellen, ist noch nicht endgültig geklärt. *De novo* Infektiosität wurde bisher nur in Proben mit Fibrillen gefunden, konnte bisher aber nicht isoliert werden. Die geringe Infektiosität wirft zudem die Frage auf, ob nicht nur eine Unterfraktion der synthetischen Prionen wirklich infektiös ist. Betrachtet man das Verhältnis von Fibrillenmenge und der Infektiosität ist es sehr wahrscheinlich, dass nicht alle gebildeten Fibrillen infektiös sind. Auch ist natürliches PrP^{Sc} amorph oder nur in Teilstrukturen fibrillär. Erst PrP 27-30 bildet spontan Fibrillen in Gegenwart von Detergentien (McKinley *et al.*, 1991; Leffers *et al.*, 2005). Prion Rods aus PrP 27-30 verlieren bei Behandlung mit TFIP (1,1,1-trifluoro-2-propanol) ihre fibrilläre Struktur, bleiben aber infektiös (Wille *et al.*, 1996).

Zusammengefasst ist die fibrilläre Morphologie für die Infektiosität zwar nicht zwingend erforderlich, dennoch lassen sich alle infektiösen Formen in Fibrillen überführen, ohne dass ihre Infektiosität verloren geht. Zudem treten Fibrillen bei der bisher einzigen Methode zur *de novo* Generierung von Infektiosität auf. Daher ist zu vermuten, dass während der Konversion die fibrilläre Morphologie zwar erst später nach der Infektiosität entsteht, aber aus den infektiösen Partikeln. Die Konversion von PrP in amyloide Fibrillen ist somit ein geeigneter Weg, um die Entstehung der Infektiosität *in vitro* zu untersuchen.

1.7 *In vitro* Konversion von rekPrP(90-231) mittels Natriumdodecylsulfat

In dem *In-vitro*-Konversionssystem, das in unserem Labor etabliert wurde, kann man ebenfalls rekombinantes Prion-Protein in amyloide Fibrillen überführen. Auch hier wird verkürztes rekPrP(90-231) verwendet, welches der Sequenz des PrP 27-30 des Syrischen Goldhamsters entspricht. Im Gegensatz zu dem *In-vitro*-Konversionssystem von Legname *et al.* (2004) wird der teildenaturierte Zustand des PrP nicht durch einen sauren pH und Harnstoff herbeigeführt,

sondern durch die Zugabe des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS, engl. Sodiumdodecylsulfate) bei physiologischen pH erreicht. Das SHa rekPrP(90-231) liegt bei 0,2 % SDS löslich als stabiles teildenaturiertes Monomer mit überwiegend α -helikaler Struktur vor. Durch das Verringern der SDS-Konzentration lassen sich verschiedene Eigenschaften des PrP^{Sc} wie β -Struktur und Unlöslichkeit sowie amyloide Fibrillen induzieren (Post *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 2001; Leffers *et al.*, 2005).

Durch das Verdünnen der SDS-Konzentration unter die kritische mizellare Konzentration auf 0,06 % bildet sich zunächst ein α -helikales Dimer (Abb. 1.8). Bei einer geringeren Konzentration von circa 0,04 % kommt es zu einem deutlichen Strukturübergang des PrP. Es ist nun überwiegend β -strukturiert und bildet Oligomere aus 12 - 16 PrP-Molekülen, ist aber immer noch löslich. Erst bei weiterer Verringerung der SDS-Konzentration entstehen große amorphe Aggregate, die ebenfalls β -faltblattreich aber unlöslich sind. Durch Inkubation von rekPrP(90-231) über mehrere Wochen bei 0,03 % SDS und einer Salzkonzentration von 250 mM bilden sich amyloide Fibrillen (Leffers *et al.*, 2005). Durch das NaCl wird wahrscheinlich ein Zwischenzustand PrP* beim Übergang vom Dimer zum Oligomer stabilisiert (Riesner *et al.*, 2006). Dies verhindert die schnelle amorphe Aggregation und ermöglicht die langsame Generierung der Fibrillen. Eine Infektiosität dieser Fibrillen konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden. Die Intermediate dieser Konversion sind stabil und konnten daher gut charakterisiert werden. Mit diesem Konversionssystem

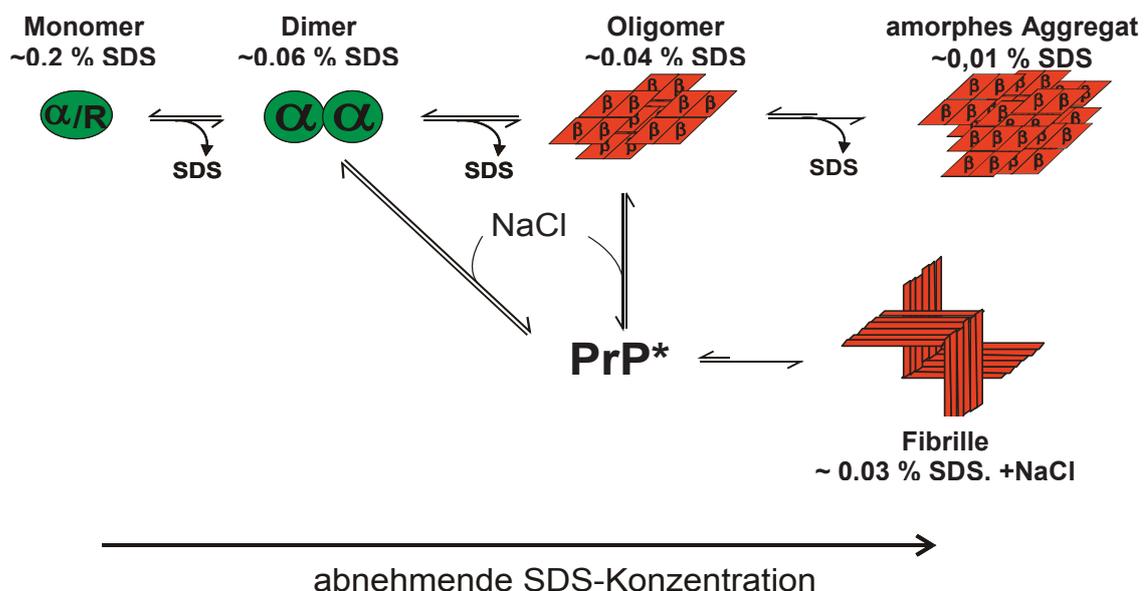


Abb. 1.8: Schema der *in vitro* Konversion von rekPrP(90-231)

Durch Verdünnen des SDS können α -Dimere und β -Oligomere als Intermediate der Konversion eingestellt werden. Bei sehr geringer SDS-Konzentration bildet PrP unlösliche amorphe Aggregate. Durch Inkubation von 5 - 7 Wochen bei 0,03 % SDS und 250 mM NaCl bilden sich über den Zwischenzustand PrP* amyloide Fibrillen aus.

lassen sich die einzelnen Intermediate stabilisieren und untersuchen. Die Übergänge zwischen ihnen können mit verschiedensten biophysikalischen Methoden verfolgt werden. Damit wäre ein System gegeben, mit dem der Einfluss möglicher Therapeutika auf die einzelnen Schritte der Konversion evaluiert werden kann.

1.8 Strategien zur Therapie von Prionkrankheiten

Da alle Prionkrankheiten zu 100 % tödlich verlaufen, muss ein Hauptziel der Prionforschung die Entwicklung einer wirksamen Therapie sein. Trotz vielerlei Therapiestrategien wurden bisher nur wenige Substanzen in klinischen Studien getestet. Meist zeigten sie, wenn überhaupt, nur geringe Effekte wie eine verlängerte Inkubationszeit bei infizierten Modelltieren. Nur bei chronisch infizierten neuronalen Zellkulturen konnte eine „Heilung“ erreicht werden (zur Übersicht: Prusiner *et al.*, 2004; Soto, 2006; Weissmann & Aguzzi, 2005; Trevitt & Collinge, 2006). Von einer Heilung einer Prionkrankheit in einem Organismus sind alle Ansätze aber noch recht weit entfernt. Die besten Ergebnisse werden zudem nur erreicht, wenn die Therapie in einem frühen Stadium der Krankheit beginnt. Im klinischen Stadium zeigt keine der Substanzen eindeutige positive Ergebnisse.

Zur Diagnose existiert bisher kein Test für Blut oder Cerebrospinalflüssigkeit (Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit), der eine gesicherte Diagnose am lebenden Patienten erlauben würde. Elektroenzephalogramme und Magnetresonanz-Imaging (MRI) sind zurzeit noch nicht spezifisch genug, so dass die Diagnose beim Menschen noch hauptsächlich anhand neuronaler und psychischer Symptome gefällt wird. Eine gesicherte Diagnose von Prionkrankheiten ist daher momentan erst in einem späten Stadium oder *post mortem* möglich, so dass eine Behandlung zu Beginn der Krankheit oder sogar bereits schon während Inkubationszeit bisher nicht zu realisieren ist. Allein für die erblichen Fälle gibt es bisher mit dem Gentest eine Art Frühdiagnose, so dass für diese Formen eine Prophylaxe möglich wäre. (zur Übersicht: Sturzenegger & Will 2007; Zerr 2007)

Allem Anschein nach ist eine Therapie erst bei klinischen Symptomen wegen des schnellen Verlaufs der Krankheiten bereits zu spät, da dann schon irreversible neuronale Schäden entstanden sind. Dies zeigt, dass eine frühe Diagnose nicht nur für eine erfolgreiche Therapie der Prionkrankheiten wünschenswert wäre, sondern auch um die potentiellen Therapeutika in der früher Phase testen zu können.

1.8.1 Empirische Ansätze

Als potentielle Therapeutika für die Behandlung von Prionkrankheiten wurden bereits verschiedene Stoffklassen untersucht, unter anderem polysulfatische Anionen (Kimberlin & Walker, 1986), Dextransulfate (Ehlers & Diringer, 1984), Kongorot (Ingrosso *et al.*, 1995), zyklische Tetrapyrrole (Priola *et al.*, 2000) und CpG Oligonukleotide (Sethi *et al.*, 2002). Sie führten zu einer Verlängerung der Inkubationszeit bei infizierten Hamstern und Mäusen, jedoch nur bei einer Behandlung bereits kurz nach der Infektion.

Amphotericin B (McKenzie *et al.*, 1994; Adjou *et al.*, 1999), Anthracycline (Tagliavini *et al.*, 1997), Pentosanpolyphosphate (Farquhar *et al.*, 1999; Doh-Ura *et al.*, 2004), Porphyrine (Priola *et al.*, 2000) und β -Faltblatt brechende Peptide (Soto *et al.*, 2000) zeigen sogar nur einen Effekt auf die Inkubationszeit, wenn sie bereits prophylaktisch verabreicht wurden oder mit dem Erreger vor der Inokulation kokubiert wurden.

Kongorot (Caughey & Race, 1992; Caspi *et al.*, 1998), verzweigte Polyamide (Supattapone *et al.*, 2001), Acridine und Phenotiazine (Korth *et al.*, 2001), Bis-Acridine (May *et al.*, 2003), CP-60 (Perrier *et al.*, 2000) und RNA-Aptamere (Proske *et al.*, 2002) konnten zwar chronisch Scrapie-infizierte Neuroblastomazellen (ScN2a) heilen, in Studien an Tieren oder CJD-Patienten die Krankheit jedoch nicht aufhalten (Prusiner *et al.*, 2004; Haik *et al.*, 2004; Nakajima *et al.*, 2004). Gerade bei den sporadischen Formen, die wahrscheinlich im Gehirn entstehen, oder wenn nach einer Infektion der Erreger bereits das Gehirn erreicht hat, sind große Polymere oder Antikörper womöglich als Therapeutika ungeeignet, da sie nicht in der Lage sind die Bluthirnschranke zu passieren.

1.8.2 Molekulare Ansätze

Da endogenes PrP^C notwendig für die Entwicklung einer Prionkrankheit ist und Mäuse ohne PrP offensichtlich gesund sind, scheint eine Möglichkeit einer Therapie die Blockade der PrP-Expression zu sein. Möglich wäre dies durch moderne Methoden wie RNAi oder Antisense-Oligonukleotide. Da diese Methoden für komplexe Organismen aber noch nicht ausgereift sind, wird dieser Ansatz zu Zeit nicht weiter verfolgt.

Ist PrP^{Sc} erst einmal entstanden, könnte man dessen Neurotoxizität blockieren oder dessen natürliche Degradation beschleunigen. Beides könnte durch die Bindung von Antikörpern realisiert werden. Diese könnten durch die Bindung von PrP^{Sc} dessen Abbau beschleunigen oder dessen toxische Interaktion mit den Neuronen blockieren. Die passive oder aktive Immunisierung führte zwar

zur Reduzierung der Prion-Replikation *in vitro* und *in vivo* (Enari *et al.*, 2001, Heppner *et al.*, 2001; Peretz *et al.*, 2001; Sigurdsson *et al.*, 2003), die Produktion von Antikörpern gestaltet sich jedoch schwierig, da PrP ein wirtseigenes Protein ist und PrP^{Sc}-spezifische Antikörper bisher nicht verfügbar sind. Zudem kann die Immunisierung mit Antikörpern auch zu einer Dimerisierung von PrP und damit zu ungewollten Entzündungsreaktion im Hirn führen (Solfrosi *et al.*, 2004). PrP^C-Dimere wurden auch ohne Antikörper in Modellmembranen beobachtet (Elfrink *et al.*, 2008). Dies unterstützt die prinzipielle Möglichkeit der Dimerisierung von PrP an der Zelloberfläche.

Aufgrund der ungewöhnlichen Stabilität von PrP^{Sc}, scheint auch eine Rekonversion der pathogenen Isoform wenig Erfolg versprechend, zumal auch die natürlichen zellulären Chaperone dies offenbar nicht bewerkstelligen können. Als attraktiverer Ansatz erscheint daher, die Umfaltung des PrP^C überhaupt zu verhindern. Dazu müsste entweder die Interaktion von PrP^{Sc} und PrP^C unterbunden werden, oder die PrP^C-Konformation so stabilisiert werden, dass eine Konversion durch die Interaktion mit PrP^{Sc} verhindert wird. So könnte zum Beispiel ein Ligand, der die potentielle Interaktionsstelle blockiert oder durch die Bindung die zelluläre Konformation stabilisiert, *in vitro* und *in vivo* die Konversion von PrP verhindern (Chabry *et al.*, 1998). Für das Tumorseprotein p53 und Transthyretin, deren Fehlfaltung Krebs bzw. die Systemische Amyloidose auslösen können, konnten bereits Liganden entwickelt werden, die die Struktur und Funktion dieser Proteine stabilisieren können (Foster *et al.*, 1999; Klambunde *et al.*, 2000). Auch gibt es bereits chemische Chaperone, die die native Konformation von Proteinen stabilisieren, und der Fehlfaltung von PrP vorbeugen können (Tatzelt *et al.*, 1996).

Obwohl die Konversion in die β -strukturierte Isoform des Prion-Proteins der bisher einzige essentielle Prozess in der Pathogenese ist, ist diese β -Isoform als Target für die Selektion von PrP-Liganden ungeeignet, da nicht alle β -Isoformen des PrP auch infektiös sind. Zudem gibt es offenbar mehrere infektiöse β -Isoformen, wie die Existenz verschiedener Stämme mit unterschiedlichen molekularen Eigenschaften nahe legt (Safar *et al.*, 1998). Die Entwicklung eines Liganden, der alle Formen bindet, erscheint daher mehr als unwahrscheinlich. Das Fehlen von Strukturinformationen über den Erreger lässt für einen mechanistischen Therapieansatz somit nur das zelluläre PrP als sinnvolles Target übrig.

1.9 Fragestellung

Kurze Peptide bieten sich für einen Therapieansatz, der das zelluläre PrP^C als Target hat, aus mehreren Gründen an: Kurze PrP-bindende Peptide lassen sich relativ leicht über Phage-Display identifizieren. Sie sind als Medikament günstiger herzustellen und leichter zu lagern als Antikörper (Ladner *et al.*, 2004). Zwar werden Peptide im Organismus schnell abgebaut und passieren nur schlecht die Blut-Hirn-Schranke, was für die Therapie einer Erkrankung des ZNS essentiell wäre, jedoch lassen sich beide Eigenschaften durch verschiedene Modifikationen beeinflussen (zur Übersicht: Adessi & Soto, 2002). Die potentielle Immunogenität von endogenen Peptiden ließe sich unter anderem durch eine Änderung der Chiralität bei der Selektion mittels Mirror-Phage-Displays ausschließen (Wiesehan & Willbold 2003). Andere Arbeitsgruppen konnten bereits zeigen, dass PrP-bindende Peptide *in vitro* in der Lage sind, die Bildung von PK-Resistenz zu inhibieren (Horiuchi *et al.*, 2001) und die Konversion des PrP zu verhindern (Soto *et al.*, 2000). *In vivo* zeigten sie jedoch kaum Effekte.

Die hier vorgestellte Arbeit war Teil eines Kooperationsprojektes. Es sollte geklärt werden, ob und wie mittels der Bindung von selektierten PrP-bindenden Peptiden die zelluläre Struktur des PrP effektiv stabilisiert werden kann und diese damit prinzipiell als Therapeutika für Prionkrankheiten in Frage kommen. Sollte das Konzept erfolgreich sein, könnte es vielleicht auch auf andere Krankheiten mit Proteinfehlfaltung wie Alzheimer, Parkinson oder Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) übertragen werden.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden dafür von der Arbeitsgruppe von Prof. Willbold im Institut für Neurowissenschaften und Biophysik im Forschungszentrum Jülich und der von Prof. Schachner am Zentrum für Molekulare Neurobiologie in Hamburg mittels Phage-Display PrP-bindende Peptide selektiert. Durch die große Diversität der von den Phagen präsentierten Peptide, kann man gleichzeitig 10^9 verschiedene Peptide untersuchen.

Ziel dieser Arbeit war es, systematisch den Einfluss der Bindung dieser Peptide auf die einzelnen Schritte der Konversion von PrP im SDS-basierten *In-vitro*-Konversionssystem zu untersuchen. Dieser Einfluss sollte anhand der Parameter Löslichkeit, Sekundärstruktur, Aggregationszustand und Morphologie charakterisiert werden. Die mögliche Prävention der Fibrillenbildung ist hierbei von besonderem Interesse, da sich ähnliche Fibrillen in einem anderen Konversionssystem als infektiös erwiesen haben (Legname *et al.*, 2004). Abschließend soll aus diesen *In-vitro*-Analysen geschlossen werden, inwieweit dieser neue mechanistische Therapieansatz über die Stabilisierung des

zellulären PrP Erfolg versprechend ist bzw. welche Eigenschaften der Peptide noch optimiert werden könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden bei den üblichen Herstellern für Laborchemikalien bezogen und entsprechen, wenn nicht anders angegeben mit dem Reinheitsgrad „pro analysi“. Zum Ansetzen von Lösungen wurde hochreines „Milli-Q-Wasser“, im Folgenden als $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion}}$ bezeichnet, verwendet. Dieses wurde von der Hausanlage mit nachgeschaltetem Wasser-aufarbeitungssystem (EPA Est. 41237-MA-1; Millipore GmbH, Neu Isenburg) gefiltert. Alle angesetzten Lösungen wurden durch $0,2 \mu\text{m}$ Membranfilter (RC58, Schleicher und Schuell, Dassel) sterilfiltriert.

2.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

NaPi (Natrium-Phosphat-Puffer)

100 mM Na_2HPO_4

100 mM NaH_2PO_4

wurden durch Mischen auf den pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Dieser wurde auf 10 mM verdünnt und wird im Folgenden als NaPi bezeichnet.

NaAc (Natrium-Acetat-Puffer)

1 mM Na-Acetat/Essigsäure pH 4,0

TBST (Tris Buffer Sodium Tween)

10 mM Tris/HCl pH 8,0

150 mM NaCl

0,01 % Tween 20

3xAuftragspuffer nach Laemmli

560 mM Tris/HCl pH 6,8

3 % 2-Mercaptoethanol

30 % Glycerin

6 % SDS

1 Spatelspitze Bromphenolblau auf 50 ml

2.3 Löslichkeitsbestimmung durch differentielle Ultrazentrifugation

Die Löslichkeit von Proteinen kann durch differentielle Ultrazentrifugation bestimmt werden. Die Proben mit einem Volumen von 20 µl wurden dafür 1 h bei 100.000 x g (TLA-45 Rotor, 42000 rpm) 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. Überstand und Pellet wurden in 3xAuftragspuffer mit 6 % SDS aufgenommen. Der relative Proteingehalt in Überstand und Pellet wurde durch Dot-Blot bestimmt.

2.4 Dot-Blot

Beim Dot-Blot Verfahren werden die Proteine direkt unter Vakuum auf eine Polyvinylfluorid- (PVDF-) Membran (Millipore GmbH, Neu Isenburg) mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen. Es wurde eine Apparatur mit 96 Probenlöchern (S & S Minifold I, Schleicher & Schuell, Dassel) verwendet. Die PVDF-Membran wurde zunächst mit Ethanol aktiviert und anschließend zusammen mit einem Chromatographiepapier (Whatman 3MM Chr) in TBST geschwenkt. Der Aufbau bestand aus der unteren Kammer, dem Chromatographiepapier, der Membran und der oberen 96-Lochplatte. In die Probenlöcher wurden zunächst 100 µl H₂O_{deion} vorgelegt, in die dann die Proben pipettiert wurden. Unter Vakuum wurde die Probenlösung durch die Membran gesogen, wobei es zur Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran kommt. Anschließend wurde einmalig mit H₂O_{deion} gespült, so dass keine Probe an den Wänden der Dot-Blot-Apparatur verblieb. Die Detektion erfolgte durch immunologischen Proteinnachweis (s. Kap. 2.5).

2.5 Immunologischer Proteinnachweis

Da der PrP-spezifische Erstantikörper 3F4 nur denaturiertes Protein erkennt, wurde die Membran nach dem DotBlot vor Durchführung des immunologischen Nachweises für 5 min in 1 % KOH geschwenkt. Die verbliebenen freien Bindeplätze der PVDF-Membran wurden dann durch Schwenken für 1 h in 5 % Milchpulver (Oxiod, Hampshire, England) abgesättigt. Dann wurde die Membran kurz mit TBST gewaschen und mit dem PrP-spezifischen Erstantikörper 3F4 (1:10000 in TBST) für 1 h bei Raumtemperatur oder optional

ü. N. bei 4 °C inkubiert. Der verwendete Erstantikörper 3F4 (Epitop 109-112) wurden von der Arbeitsgruppe S. B. Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBST gewaschen. Als Zweitantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper (Sheep anti mouse, Pierce Biotechnology, Inc.) verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h. Um einen zu starken Hintergrund zu vermeiden, wurde ungebundener Zweitantikörper durch mehrmaliges Waschen für 10 min mit TBST entfernt. Die Membran wurde dann mit dem ECL-PlusTM-Detektions-Reagenz (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB) für 1 min benetzt. Dieses Reagenz enthält Luminol, welches durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase und H₂O₂ in alkalischem Medium bei einer Chemolumineszenzreaktion oxidiert wird. Die dabei entstehende Lumineszenz wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms (HyperfilmTM ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) mit variierenden Expositionszeiten von 30 s bis 5 min detektiert.

2.6 Peptidselektion mittels Phage-Display

Die Sequenzen der untersuchten Peptide wurden von unseren Kooperationspartnern in den Arbeitsgruppen von Prof. Willbold (Forschungszentrum Jülich) und Prof. Schachner (Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg) per Phage-Display identifiziert. Benutzt wurde jeweils

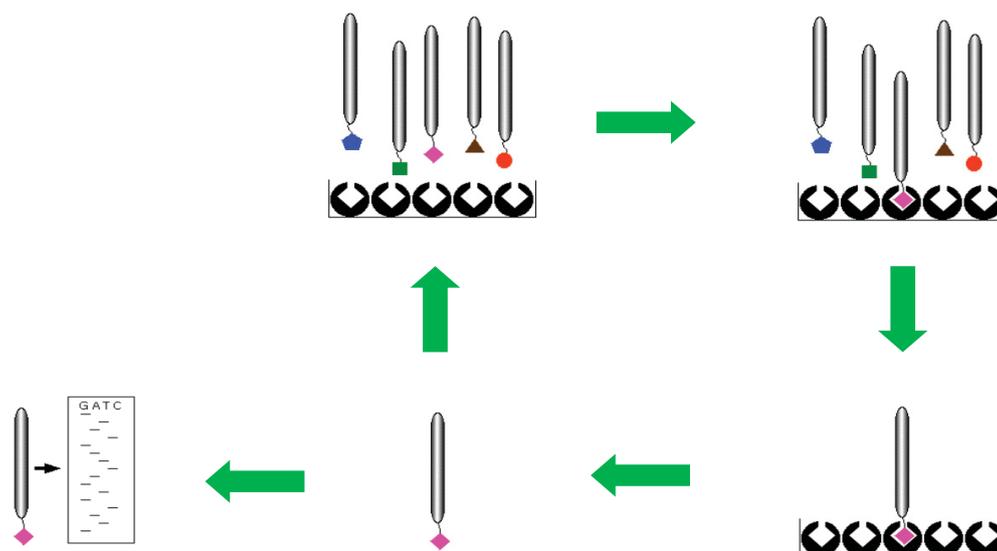


Abb. 2.1: Schema der Peptidselektion mittels Phage Display

Die Phagenbibliothek wird zu dem immobilisierten Target gegeben. Durch unterschiedlich stringentes Waschen werden die nicht oder unspezifisch gebundenen Phagen entfernt. Die gebundenen Phagen werden nach der Amplifikation in *E. coli* sequenziert, und so die an das Target gebundene Peptidsequenz ermittelt.

das Ph.D.-12 Phage Display Library Kit (New England Biolabs, Ipswich MA, USA). Die Bibliothek besteht aus M13-Bakteriophagen, die an den Pili ein zusätzliches Peptid mit 2×10^9 verschiedenen Sequenzen aus 12 Aminosäuren tragen. Die Peptide sind über den C-Terminus an die Pili gebunden, der N-Terminus dieser Peptide ist frei. Die Selektion erfolgte jeweils über drei Runden. Danach wurden die Phagen in *E.coli* amplifiziert. Die DNA-Sequenzen der Phagen wurden sequenziert und daraus die selektierten Peptidsequenzen ermittelt.

Als Target wurde von der Arbeitsgruppe von Professor Willbold in Jülich immobilisiertes rek SHaPrP(90-231) mit His-Tag benutzt. Die Selektion fand in PBST (10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, 0,1 % BSA, pH 7,4) statt.

Die Peptide aus der Arbeitsgruppe von Professor M. Schachner in Hamburg wurden gegen ein PrP-Fc Dimer aus *Pichia pastoris* selektiert, welches an Protein-A-Dynabeads (DynaBiotek, Invitrogen Corp.,) gebunden war. Selektionpuffer war hier HBSST-Puffer (10 mM HEPES, 0,4 mM Na_2HPO_4 , 0,4 mM MgSO_4 , 0,5 mM MgCl_2 , 0,4 mM KH_2PO_4 , 5 mM KCl, 1,2 mM CaCl_2 , 140 mM NaCl, 0,5 % Tween 20, pH 7,4).

Mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbant Assay) wurde jeweils die Affinität der Peptide abgeschätzt und die am stärksten bindenden Peptide synthetisiert.

Folgende Peptide wurden synthetisiert:

W1	H- HSPLDSSRHATY -Lys(FITC)
W2	H- VDMINDVQPLTP -Lys(FITC)
W3	H- VYSSTTRPLPSP -Lys(FITC)
W4	H- LKATTNSKLMMY -Lys(FITC)
W5	H- LKATTNSKLMMY -Lys(OG488)
W6	H- KMLYNAKMTSLT -Lys(OG488)
W7	H- VYSSTTRPLPSP -Lys(OG488)
S2	H- ATWSHHLSSAGLC -OH
S4	H- SHPWNAQRELSVC -OH
S5	H- WSITTYHDRAIVC -OH
S10	H- LHADTTHHRPWT -OH
S20	H- QWGWNMPLVEAQ -OH
S27	H- YPAPQPLVTKTSC -OH
S28	H- AETVESCLAKSHC -OH
S29	H- HPWNAQRELSV -OH
S30	H- LLADTTHHRPWTC -OH
S33	H- NFMESLPRLGMH -OH
S34	H- HWGNHSHKSHQPQC -OH
S42	H- TMGFTAPRFPHY -OH
S43	H- WAPPLFRSSLFY -OH

S44	H- TVPAKVNPLAARC -OH
S45	H- ISLNFPFHGSQPC -OH
S46	H- MWPPTTHSSPYHC -OH
S52	H- WGHKPSMAPMQS -OH
S52 scr	H- KSQWSPHGMAMPC -OH
S52 scr2	H- AMPSPGKSWQHM -OH
S55	H- HHQSSRLHAPPYC -OH
S56	H- IMPLTGGRLLASC -OH
S62	H- ASPPQSKWTKIP -OH
S68	H- GTPMFDSSPPVK -OH
S69	H- FGSYSQVPQTVA -OH
S71	H- EHMALTYPFRRPHC -OH
S73	H- TKNMLSLPVGPG -OH
S74	H- TLLPTTASPRSI -OH
S80	H- SSAWWSYCPPVAC -OH

W= selektiert in der Arbeitsgruppe Willbold (Jülich), synthetisiert von Jerini AG (Berlin, Deutschland)

S= selektiert in Arbeitsgruppe Schachner (Hamburg), synthetisiert von Schafer-N (Copenhagen, Dänemark)

Manchen Peptiden wurde C-Terminal ein Lysin oder Cystein angehängt, um es später eventuell einen Fluoreszenzmarker binden zu können. Die Peptide aus Jülich besaßen bereits einen solchen Fluoreszenzfarbstoff, entweder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) oder Oregon Green 488 (OG488).

2.7 Zircular-Dichroismus(CD)-Spektroskopie

Das Messprinzip der CD-Spektroskopie beruht auf der unterschiedlichen Absorption von zirkular polarisiertem Licht durch asymmetrische Moleküle. Gemessen wird die Differenz der Extinktionskoeffizienten für links- und rechtszirkular polarisiertes Licht im UV-Bereich ($\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R$). Diese Differenz wird meist in Form der Elliptizität Θ angegeben. Dabei besteht folgender Zusammenhang zwischen der Differenz der Extinktionskoeffizienten, der Konzentration c , der Schichtdicke d und der Elliptizität:

$$\Theta_{(\lambda)} = \ln 10 \frac{180}{2\pi} (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. 1}$$

Die Elliptizität kann somit sowohl positive als negative Werte annehmen, je nachdem ob links- oder rechtszirkular polarisiertes Licht stärker absorbiert wird. Eine Differenz entsteht nur bei optisch aktiven Substanzen, d.h. solchen deren elektrisches und magnetisches Übergangsdipolmoment nicht senkrecht aufein-

ander stehen. Dies ist unter anderem bei chiralen Molekülen der Fall. Der CD-Effekt der Proteine beruht auf der Asymmetrie der ausgebildeten Sekundärstrukturelemente wie α -Helix oder β -Faltblatt. Diese zeigen im fernen UV-Bereich (170 – 260 nm) unterschiedliche CD-Spektren auf (Abb. 2.2), so dass von dem CD-Spektrum eines Proteins auf dessen Sekundärstrukturanteile geschlossen werden kann. Zwar lassen sich die absoluten Anteile mit dieser Methode nur schwer bestimmen, da die Spektren auch von den Seitenketten und der Größe der Strukturelemente beeinflusst werden, relative Änderungen der Sekundärstruktur lassen sich jedoch sehr gut verfolgen.

Die Messungen erfolgten mit dem Spektralpharimeter J715 (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH, Großumstadt, Deutschland). Es wurden Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm (Hellma, Mülheim, Deutschland) verwendet. Das Probenvolumen betrug 100 μ l und die minimale Proteinkonzentration 100 ng/ μ l. Die Spektren wurden bei 25 °C und mit einer Auflösung von 1 nm aufgenommen. Die Responsezeit betrug 1 s. Es wurde pro Probe jeweils 10 Spektren akkumuliert und gemittelt um das Rauschen zu minimieren. Während der Messung wurde die Probenkammer mit Stickstoff gespült, um die Bildung von Ozon zu verhindern, welches das UV-Licht absorbieren würde und so zu verrauschten Spektren führen würde. Die gemessenen Spektren wurden jeweils um das entsprechende Pufferspektrum korrigiert.

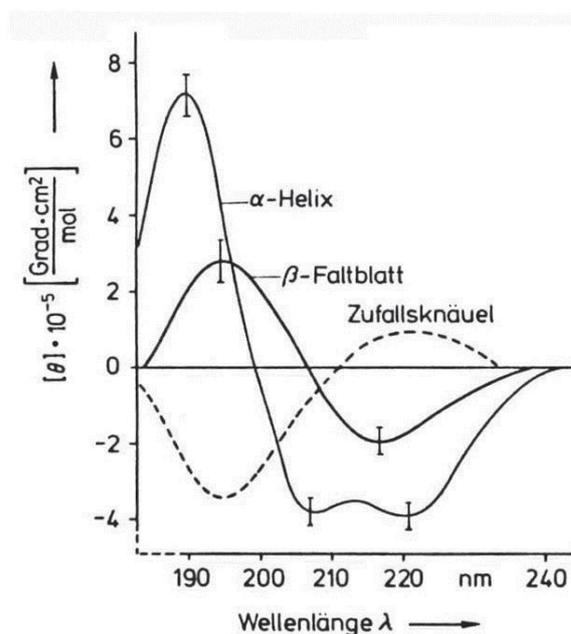


Abb. 2.2: CD-Spektren typischer Sekundärstrukturelemente von Proteinen
(nach Greenfield & Fasman, 1969)

2.8 Rekombinantes PrP

In dieser Arbeit wurde ausschließlich rekombinantes PrP(90-231) mit der Sequenz des Syrischen Goldhamsters *Mesocricetus auratus* verwendet, welches dem Sequenzbereich von PrP27-30 entspricht, und wurde in dieser Arbeit nur als PrP bezeichnet. Es wurde von der Arbeitsgruppe Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) in *E.coli* kloniert und als HPLC-aufgereinigtes Lyophilisat zur Verfügung gestellt (Mehlhorn *et al.*, 1996).

2.9 Fibrillogenese von rekombinantem PrP

Zur Fibrillogenese wurde rekombinantes PrP mit 0,03 % SDS und 250 mM NaCl in Natriumphosphatpuffer sieben Wochen lang bei 37 °C im Schüttler (650 rpm) inkubiert. Das Probenvolumen betrug 200 µl.

2.10 Thioflavin T Assay

Thioflavin T zeigt durch die Bindung an amyloide Proteinstrukturen charakteristische Änderungen seines Fluoreszenzspektrums auf. Diese sind eine batho- und hyperchrome Verschiebungen der Fluoreszenz des ThT/Amyloid-Komplexes gegenüber dem freien Farbstoff (LeVine, 2003; Krebs *et al.* 2004). Die zu untersuchenden Proben wurden mit 5 µM Thioflavin versetzt und dann in einer 96-Well-Platte die Fluoreszenz im Fluorimeter Tecan SAFIRE (Tecan GmbH, Crailsheim) aufgenommen.

Messparameter:

Exzitation:	445 nm
Emission:	460-660 nm
Intervall:	2 nm
Exzitationsbandbreite:	2,5 nm
Emissionsbandbreite:	2,5 nm
Gain (siehe Handbuch):	180
Blitzanzahl:	10
Integrationszeit:	40 µs
Schütteln:	60 s
Temperatur:	37 °C

2.11 Elektronenmikroskopie (EM)

Die in dieser Arbeit gezeigten elektronenmikroskopischen Bilder wurden mittels der Transmissions-Elektronenmikroskopie aufgenommen. Probenpräparation und Messung folgten weitgehend dem Protokoll von Stöhr (2007). Es wurde ein Philips-Tecnai (G-Serie)-Transmissionselektronenmikroskop verwendet. Da Proteine nahezu ausschließlich aus Atomen geringer Elektronendichte bestehen, würde der Elektronenstrahl eine Proteinprobe nahezu ungehindert durchdringen und somit kein Bild erzeugen. Daher wurden die Proben mit Schwermetallionen (hier Ammoniummolybdat) präpariert, die sich an die eigentlichen Proteinstrukturen anlagern. Die Proben wurden zunächst auf Nickel-Netze (200 Mesh, Nickelnetze mit Formvar und Kohle beschichtet, PLANO GmbH; Wetzlar) aufgebraucht, die vorher in einer Vakuumkammer 60 Sekunden einer Glimmentladung ausgesetzt wurden, um die Hydrophilität und damit die Benetzbarkeit der kolloidalen Kohleschicht zu erhöhen. Erst danach wurden 10 μl der Probe aufgetragen und 1 min zur Adsorption inkubiert. Dann wurde mit 0,1 M Ammoniumacetat und 0,01 M Ammoniumacetat gewaschen und die Probe mit dem Kontrastmittel versetzt. Nach wenigen Sekunden wurde die Flüssigkeit mit einem Papier abgesogen und die so präparierten Netze bis zur Messung gelagert.

2.12 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS)

Bei der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie wird die Fluoreszenz eines nur sehr kleinen Messvolumens einer Probe gemessen. Dazu wird ein Laserstrahl zur Fluoreszenzanregung in die Probe fokussiert und durch eine konfokale Abbildung nur die Fluoreszenz einer bestimmten Ebene detektiert. Dadurch liegt das Messvolumen ca. bei 1 fl und bei entsprechender Konzentration sind nur wenige fluoreszierende Partikel innerhalb dieses Messvolumens. Die Anzahl der Partikel im Messvolumen schwankt durch ihre Diffusion und verursachen so eine Fluktuation der detektierten Fluoreszenzintensität (Abb. 2.3 A). Aus diesen zeitlichen Fluktuationen kann mit der Autokorrelationsfunktion $G(\tau)$ (Gl. 2) die Diffusionszeiten der Partikel bestimmt werden und ggf. unterschiedlich schnell diffundierende Partikelspezies in einer Probe identifiziert werden (zur Übersicht: Rigler & Elson, 2001).

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

Da bei wird für jeden Messpunkt t die Abweichung der Fluoreszenz vom Mittelwert $\delta F(t)$ bestimmt und ebenso für den alle Zeitpunkte $t+\tau$. Beide werden multipliziert, über die Zeit gemittelt und auf $\langle F(t) \rangle^2$ normiert. Diese Kurve wird mit der theoretischen Funktion für die Diffusion eines Partikels durch das Messvolumen gefittet:

$$G(\tau) = \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}} \frac{1}{\sqrt{1 + \frac{\omega^2}{z^2} \cdot \frac{\tau}{\tau_D}}} \quad \text{Gl. 3}$$

Hierbei ist $\langle N \rangle$ die mittlere Anzahl der Partikel im Messvolumen, ω der Durchmesser und z die Höhe des zylindrischen Messvolumens (Fokus) ist. Da $\omega \ll z$ kann der letzte Term vernachlässigt werden. Wird $G(\tau)$ gegen τ aufgetragen kann für die Näherung $\tau = \tau_D$ auf halber Höhe der Funktion die Diffusionszeit τ_D bestimmt werden (Abb. 2.3 B). Diese gibt an, wie lange ein Partikel im Mittel braucht, um das Messvolumen zu passieren. Bei mehreren unterschiedlich schnell diffundierenden Partikelspezies zeigt $G(\tau)$ mehrere Wendepunkte und Gl. 3 ist um weitere τ erweitert. Diese Funktion wird nun an die gemessene Kurve gefittet, wodurch sich jeweils die Diffusionszeit der einzelnen Spezies ergeben.

Die Messungen erfolgten in einem Confocor I (Evotec/Zeiss) mit der Steuerungssoftware FCS Control 1.2. Es wurden jeweils 10 Messungen pro Probe durchgeführt, getrennt ausgewertet und die Ergebnisse gemittelt. Die Anzahl der verschiedenen Partikelspezies (Komponenten) wurde vorgegeben. Teilweise wurden auch die Diffusionszeiten der Komponenten vorgegeben, nachdem diese vorher bestimmt worden waren, falls die Auswertung ohne Angabe der Diffusionszeiten keine Ergebnisse lieferte.

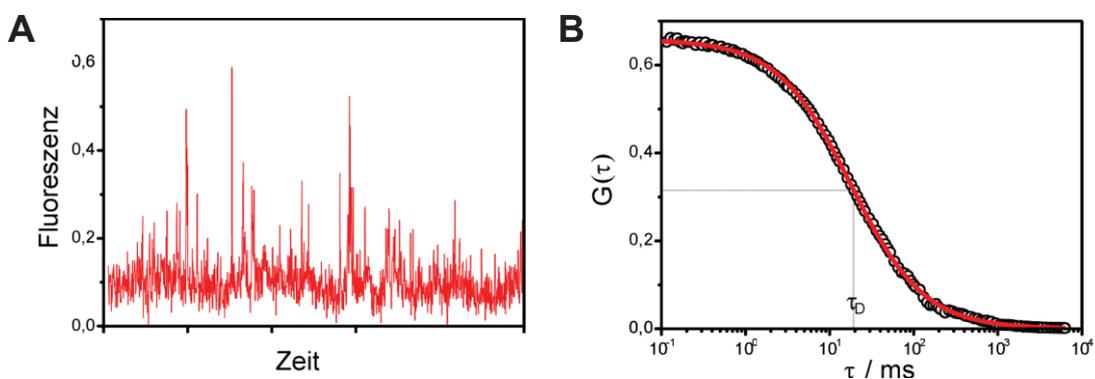


Abb. 2.3: Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

A Gemessene Fluoreszenzfluktuationen **B** Autokorrelationsfunktion

2.13 Chemischer Crosslink von Proteinen mit EDC

Durch einen chemischen Crosslink lassen sich Proteine innerhalb von Proteinkomplexen kovalent miteinander verknüpfen (zur Übersicht: Sinz, 2006). Der Crosslinker EDC (Pierce, Rockford, USA) (Abb. 2.4) verknüpft eine Carboxylgruppe mit einer Aminogruppe eines Aspartat- bzw. Glutamatrestes oder dem N-Terminus eines Proteins. Dabei bindet EDC zunächst an die Carboxylgruppe und bildet mit ihr einen O-Acylisoharnstoffester. Ist eine Aminogruppe in räumlicher Nähe, wird diese mit der zuvor gebundenen Carboxylgruppe zu einer Isopeptidbindung verknüpft und EDC dabei verändert abgespalten. EDC verknüpft somit die beiden Aminosäurereste nicht über einen Spacer sondern direkt.

EDC wurde als Feststoff eingefroren gelagert und vor Gebrauch in Puffer aufgenommen und dann verwendet (nach: Kaimann, 2002). Die Reaktion wurde mit 1 mM EDC in NaPi pH 7,2 durchgeführt, obwohl der optimale pH für diese Reaktion bei 4,5 – 5 liegt. Die Proben wurde 2 h bei 25 °C inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von Auftragspuffer und 5 min Inkubation bei 95 °C gestoppt. Die Reaktion ist zu diesem Zeitpunkt aber schon zum Erliegen gekommen, da das EDC in wässrigem Milieu kaum 2 h stabil bleibt.

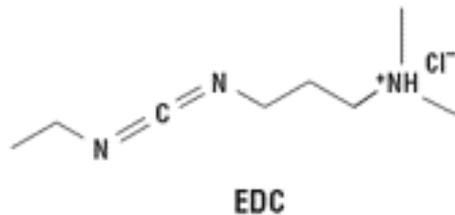


Abb. 2.4: Struktur von EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimidhydrochlorid)

2.14 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE erfolgte nach dem Prinzip der denaturierenden diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) und dem Protokoll von Sambrook. *et al.* (1989). Verwendet wurde eine Mini-Protean II Gelkammer mit 8 x 7,3 x 0,75 cm von Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland.

Zunächst wurde ein 12%iges Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und ein 4%iges Sammelgel darauf geschichtet. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Auftragspuffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese wurde in 1 x Laemmli-Puffer mit 0,1 % SDS erst für 15 min bei 100 V und 100 mA und dann für 30-45 min bei 200 V durchgeführt. Zur

Molekulargewichtsbestimmung wurde als Marker der Proteinstandard Rainbow-Molekulargewichtsmarker von Amersham Pharmacia Biotech aufgetragen:

Myosin	220 kDa
Phosphorylase	97 kDa
Rinderserumalbumin	66 kDa
Ovalbumin	45 kDa
Carboanhydrase	30 kDa
Trypsininhibitor	20,1 kDa
Lysozym	14,3 kDa

Gelelektrophorese-Puffer (1x Laemmli)

0,025 M	Tris pH 8,3
0,19 M	Glycin
0,1 %	SDS

Trenngel

380 mM	Tris/HCl pH 8,8
13 %	Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)
0,1 %	SDS
0,1 %	TEMED
0,1 %	APS

Sammelgel

124 mM	Tris/HCl pH 6,8
3 %	Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)
0,1 %	SDS
0,1 %	TEMED
0,1 %	APS

2.15 Silberfärbung von Proteingelen

Fixierung:	50 % Ethanol, 10 % Essigsäure	20 min
Waschen:	10 % Ethanol, 5 % Essigsäure	10 min
Oxidation:	0,05 % Natriumcarbonat	1 min
	0,15 % Kaliumhexacyanoferrat	
	0,3 % Natriumthiosulfat	
Waschen:	H ₂ O _{deion.}	3 x 5 min
Färben:	0,012 M Silbernitrat	20 min
Waschen:	H ₂ O _{deion.}	3 x 5 min

Entwickeln:	3 % Natriumcarbonat 0,02 % Formaldehyd	nach Bedarf
Stop:	1 % Essigsäure	10 min

3 Ergebnisse

3.1 Konzept von Bindung und Verschiebung der Konversion von PrP im SDS-basierten *In-vitro*-Konversionssystem durch Peptid-Liganden

Um die Wirkung der Peptide, die mit Phage Display selektiert wurden, auf das Prion-Protein (PrP) zu untersuchen, stand ein in unserem Institut entwickeltes SDS-basiertes *In-vitro*-Konversionssystem zur Verfügung (s. Kap. 1.7). In diesem System können mit Zirkulardichroismus(CD)-Spektroskopie und Ultrazentrifugation die Sekundärstruktur und die Löslichkeit des PrPs in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration analysiert werden. Bildet man bei der CD-Spektroskopie den Quotienten der Elliptizitäten Θ bei 218 nm und 207 nm, erhält man ein Maß für die Sekundärstruktur. Ein Quotient unter 1 entspricht der α -helikalen Struktur (Abb. 3.1). Ab einem Quotienten von 1,8 liegt das PrP überwiegend β -strukturiert vor. Über differentielle Ultrazentrifugation und anschließender Bestimmung der Verteilung zwischen Überstand und Pellet mittels Dot Blot kann die Löslichkeit des PrP bestimmt werden. Wie Abb. 3.1 nach Jansen *et al.* (2001) zeigt, ist das PrP bei 0,1 % SDS komplett löslich und α -helikal strukturiert. Wird die SDS-Konzentration verringert, kommt es zunächst zu einer Strukturänderung, und zwar zu vermehrt β -strukturierten Anteilen. Bei weiterer Verringerung der SDS-Konzentration wird das PrP zudem unlöslich. Da die beiden Übergänge bei unterschiedlichen SDS-Konzentrationen stattfinden, lassen sie sich getrennt beobachten. Peptide, die als Therapeutika in Frage kommen, sollten bei konstanten Bedingungen PrP löslicher halten und die α -helikale Struktur stabilisieren. Demnach sollte bei Anwesenheit des Peptids in diesem Konversionssystem weniger SDS gebraucht werden, um PrP löslich und α -helikal zu halten. In diesem Fall wären die beiden Übergänge in Abb. 3.1 nach links d.h. zu niedrigeren SDS-Konzentrationen verschoben.

Insgesamt wurden 34 Peptide, die über Phage Display als PrP-bindend identifiziert wurden, diesbezüglich untersucht. Hinzu kamen über 20 weitere Peptide, deren Sequenzen aus potentiellen Bindepartnern von PrP oder aus dem PrP selbst stammen. Insgesamt wurden somit etwas mehr als 60 Peptide in diesem Konversionssystem getestet.

Um die Wirkung der Peptide zu bestimmen, ist der Sekundärstrukturübergang der interessantere und aussagekräftigere von den beiden Übergängen des PrP, da er reproduzierbarer und streng reversibel ist. Da jedoch für die

CD-Spektroskopie pro Probe 20 µg PrP benötigt werden, würde man für die Untersuchung aller Peptide bei verschiedenen SDS-Konzentrationen mehrere Milligramm PrP benötigen, die zu Beginn dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen. Für die Löslichkeitsbestimmungen mittels differentieller Ultrazentrifugation werden hingegen nur je 200 ng PrP benötigt. Um alle vorhandenen Peptide testen zu können, wurde daher zunächst nur der Einfluss der Peptide auf die Löslichkeit von PrP untersucht. Nur mit den Peptiden, die hierbei einen deutlichen Effekt zeigten, wurde dann auch CD-spektroskopische Messungen durchgeführt und der Einfluss auf die Sekundärstruktur von PrP bestimmt.

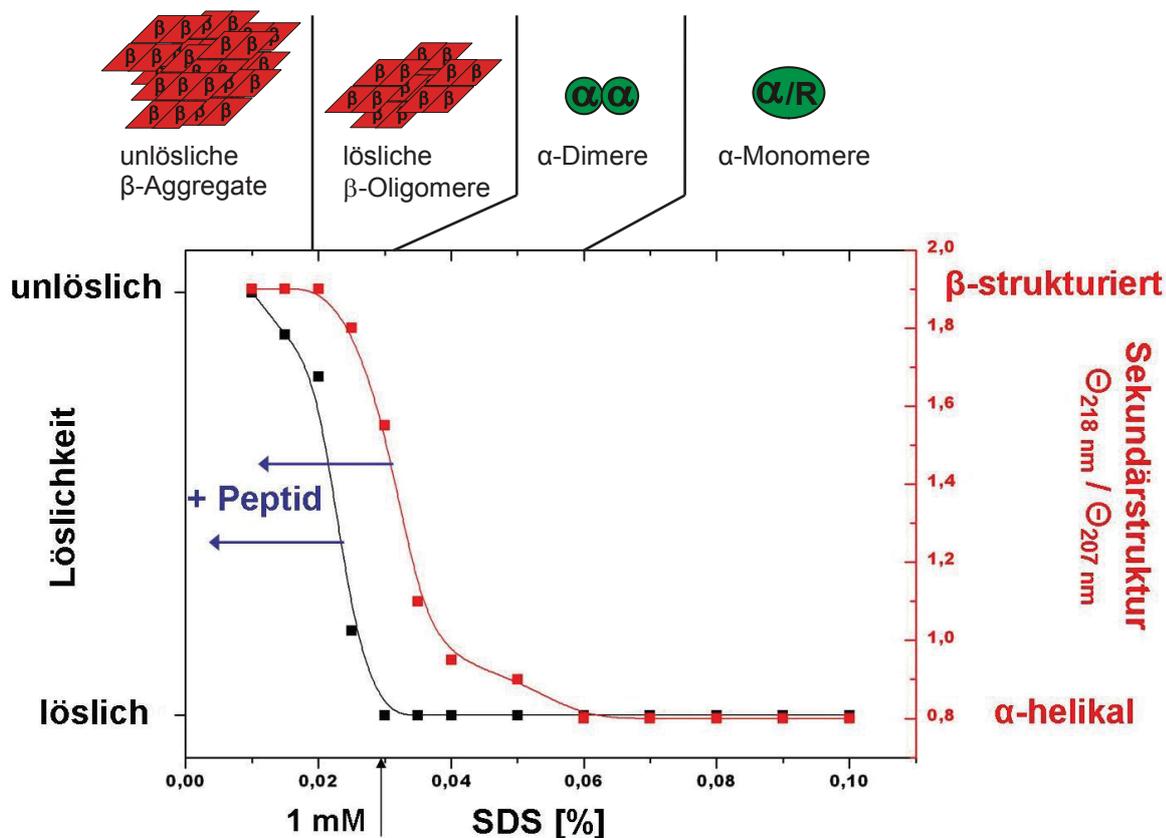


Abb. 3.1: Modell der Wirkung therapeutischer Peptide auf das PrP im SDS-basierten *In-vitro*-Konversionssystem. Senkt man abisgehend von 0,1 % die SDS-Konzentration kommt es unterhalb von 0,06 % SDS zu einer Konversion von der überwiegend α -helikalen Struktur zu einer β -Struktur. Unterhalb von 0,03 % SDS wird PrP zusätzlich unlöslich (Jansen *et al.*, 2001; Leffers *et al.*, 2004). Peptide, die die Konversion des PrP inhibieren, sollten beide Übergänge zu kleineren SDS-Konzentrationen, d.h. hier nach links, verschieben.

3.2 Einfluss der Peptide auf die Löslichkeit von PrP

Die Löslichkeit von PrP bei verschiedenen SDS-Konzentrationen wurde bestimmt, indem man ausgehend von einer Stammlösung mit 0,2 % SDS diese auf verschiedene Endkonzentrationen von SDS bei konstanten 10 ng/ μ l (0,62 μ M) PrP in Natriumphosphatpuffer verdünnte. Bei Proben mit Peptid war das entsprechende Peptid in dem zur Verdünnung verwendeten Puffer enthalten. Das bedeutet, die Verringerung der SDS-Konzentration und die Zugabe des Peptids erfolgten in ein und demselben Schritt. Der molare Überschuss des Peptids zum PrP betrug dabei mindestens 100:1. Die Ansätze wurden 24 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 100.000 g für 1 h zentrifugiert. Mittels Dot Blot wurde dann das PrP im Überstand und im Pellet immunologisch detektiert. Die Verteilung des PrPs zwischen Überstand und Pellet spiegelt die Löslichkeit des PrP bei verschiedenen SDS-Konzentrationen wider. So gibt es eine SDS-Konzentration, ab der das PrP komplett löslich, also im Überstand ist. Im Übergangsbereich findet sich PrP sowohl im Überstand als auch im Pellet. Unterhalb einer gewissen SDS-Konzentration ist PrP dann komplett unlöslich und ausschließlich im Pellet zu finden.

3.2.1 Einfluss des Peptids S52 auf die Löslichkeit von PrP

Von allen getesteten Peptiden (s. Kap. 2.6) zeigte nur das Peptid S52 (WGHKPSMAPMQS) einen reproduzierbaren die Löslichkeit erhöhenden Effekt auf PrP (Abb. 3.2 A). In der Probe ohne Peptid ist das PrP bei einer SDS-Konzentration von 0,035 % oder höher vollständig löslich. Im Bereich von 0,02 % bis 0,03 % SDS findet es sich sowohl im Überstand als auch im Pellet. Unterhalb von 0,02 % SDS ist PrP komplett unlöslich. Diese drei Bereiche können abhängig vom verwendeten PrP-Aliquot leicht verschoben sein. Daher wurden die Proben einer Konzentrationsreihe immer mit demselben PrP-Aliquot angesetzt und von jedem Aliquot immer auch Proben ohne Peptid angesetzt.

In der Reihe mit S52 sind alle drei Löslichkeitsbereiche von PrP im Vergleich zur Kontrolle deutlich zu kleineren SDS-Konzentrationen verschoben. Bei 0,025 % und 0,03 % SDS ist PrP in Anwesenheit von S52 noch komplett löslich, ohne S52 ist bereits ein Großteil im Pellet, also unlöslich. Im Bereich von 0,015 % bis 0,0175 % SDS ist das PrP mit S52 noch teilweise löslich, während es ohne S52 komplett unlöslich ist. Es konnte jedoch reproduzierbar keine SDS-Konzentration gefunden werden, bei der PrP allein komplett unlöslich und mit S52 komplett löslich ist. Dennoch zeigen diese Ergebnisse, dass das Peptid S52 die Löslichkeit des PrP im SDS-basierten *In-vitro*-Konversionssystem erhöht.

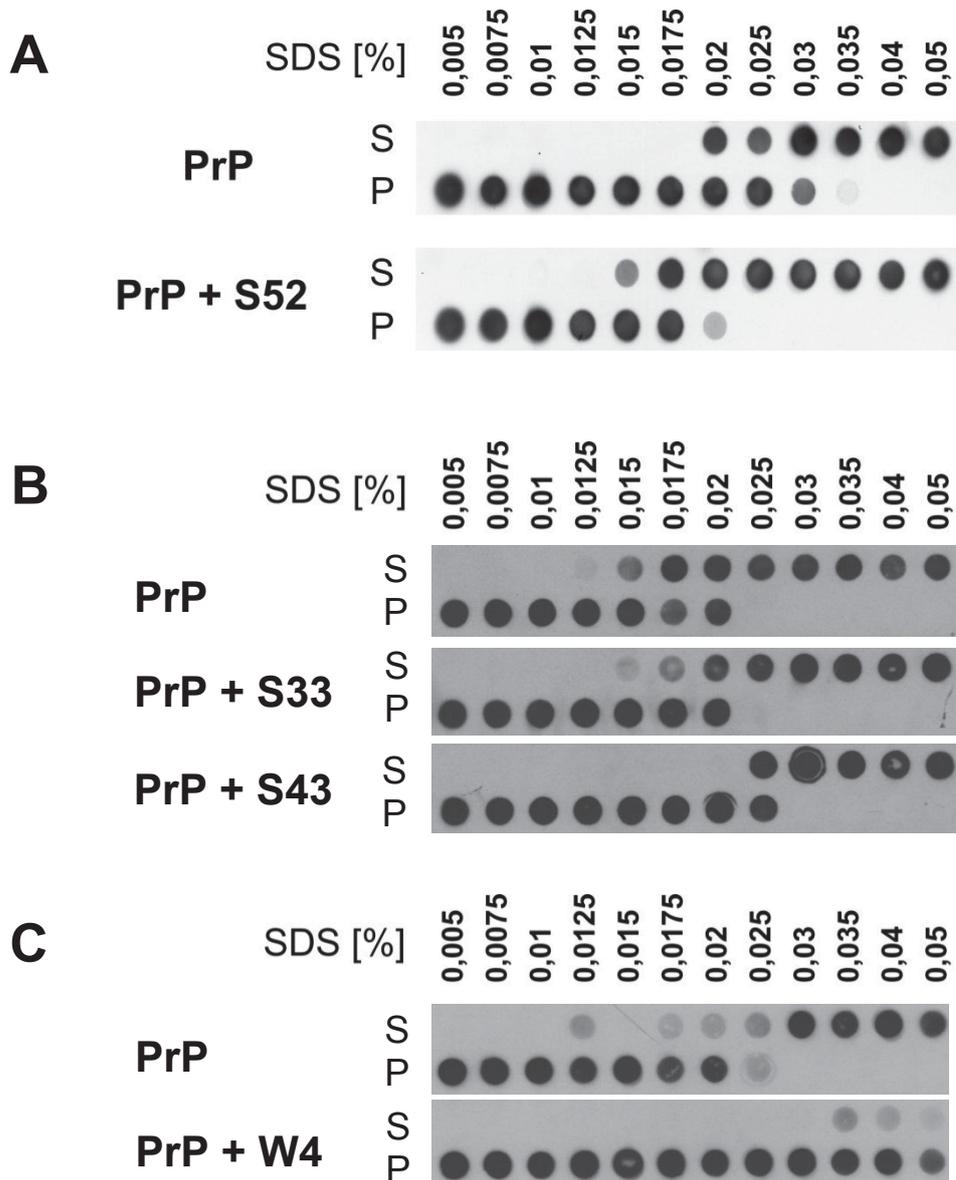


Abb. 3.2: Einfluss der selektierten Peptide auf die Löslichkeit von PrP

Die Proben mit und ohne Peptid wurden jeweils auf verschiedene SDS-Konzentrationen verdünnt und mittels differentieller Ultrazentrifugation Überstand (S) und Pellet (P) über Dot Blot analysiert. **A** Blot mit 150 μ M des Peptids S52 **B** Blot mit 150 μ M S33 und S43 **C** Blot mit 56 μ M W4

Als weitere Kontrollen sind hier exemplarisch noch drei weitere der selektierten Peptide abgebildet. Etwa ein Drittel aller getesteten Peptide zeigt wie das Peptid S33 in Abb. 3.2 B nahezu keinen Effekt auf die Löslichkeit des PrP. Ein weiteres Drittel der Peptide verschiebt den Löslichkeitsübergang zu höheren SDS-Konzentrationen, ähnlich wie das hier gezeigte S43, und verringert somit die Löslichkeit des PrPs. Dieser Effekt war für einen Teil der Peptide zu erwarten. 150 μ M Peptide, die durch eine positive Ladung mehr negativ geladenes SDS binden, verringern dadurch die freie SDS-Konzentration

(0,02 % = 2 mM) und induzieren so die Aggregation von PrP und verringern dadurch dessen Löslichkeit. Tatsächlich weisen viele dieser Peptide bei neutralem pH eine positive Ladung auf. Dieser Effekt wird noch in Kap. 4.3 ausführlicher behandelt.

Einige Peptide zeigten sogar eine sehr starke Verschiebung des Löslichkeitsübergangs (Abb. 3.2 C). So ist bei 56 μM des Peptids W4 (LKATTNSKLMMY) bereits bei 0,05 % SDS (1,7 mM) nahezu das gesamte PrP unlöslich. Die 56 μM W4 müssten hier demnach etwa 0,8 mM SDS binden um diesen Effekt hervorzurufen. Zwar ist W4 positiv geladen, doch dass es dadurch je 14 SDS-Moleküle bindet, kann man ausschließen. Vielmehr scheinen einige Peptide wie W4 die Konversion und Aggregation des PrP direkt induzieren zu können.

Insgesamt haben die meisten Peptide, die durch Phage-Display identifiziert wurden und demnach an PrP binden sollten, keinen messbaren Effekt auf dessen Löslichkeit oder verringern diese. Beides kann gut mit einer SDS-Bindung durch die Peptide und einer damit einhergehenden verringerten Konzentration von freiem SDS erklärt werden. Weiterhin ist davon auszugehen, dass auch S52 etwas SDS gebunden haben wird. Doch der dadurch verursachte negative Effekt auf die Löslichkeit des PrP wird durch die Bindung von S52 an PrP überkompensiert, so dass es im Blot insgesamt sogar eine positive Wirkung auf die Löslichkeit des PrPs zeigt.

Vergleicht man in Abb. 3.2 die jeweiligen Reihen ohne Peptid, so fällt auf, dass der Löslichkeitsübergang des PrP bei unterschiedlichen SDS-Konzentrationen liegt. In den drei gezeigten Blots wurde jeweils ein andere Charge PrP-Lyophilisat verwendet. Die leicht unterschiedlichen Löslichkeitsübergänge der einzelnen Chargen kann an einer etwas unterschiedlichen Menge der mit aufgereinigten Salze oder Detergentien liegen. Auch könnte es bei der Einstellung der SDS-Konzentration bei der Resuspendierung des Lyophilisats zu Ungenauigkeiten kommen. Denn da die Konzentrationsbestimmung des PrP nach der Resuspendierung des Lyophilisats mittels BCA-Tests nicht allzu genau ist, können die verschiedenen Chargen PrP leicht unterschiedliche

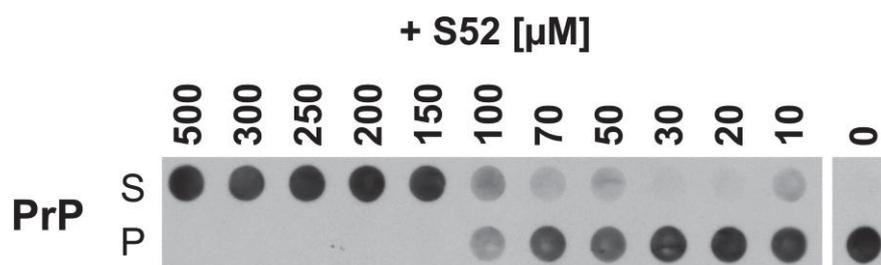


Abb. 3.3: Löslichkeit von PrP bei 0,02 % SDS und verschiedenen S52-Konzentrationen

Konzentrationen aufweisen und damit auch die mit ihnen angesetzten Proben. Die Konzentration von PrP hat aber einen starken Einfluss auf dessen Aggregationsverhalten und beeinflusst darüber hinaus auch noch die freie SDS-Konzentration. Der Effekt einzelner Peptide im Vergleich zur Kontrollreihe war jedoch bei verschiedenen PrP-Aliquots konstant.

Als Nächstes wurde bestimmt, welche Konzentration des Peptids S52 nötig ist, um einen Effekt beobachten zu können. Eine entsprechende Konzentrationsreihe ist in Abb. 3.3 dargestellt. S52-Konzentrationen bis 70 μM zeigen kaum einen Effekt. Erst bei 100 μM ist ein deutlicher Effekt auf die Löslichkeit des PrPs zu erkennen, der bei 150 μM S52 maximal ist. Konzentrationen von 200 bis 500 μM zeigen den gleichen Effekt. Weitere Versuche zeigten, dass bei S52-Konzentrationen ab 1 mM oder höher das PrP sogar wieder unlöslicher wird (Daten nicht gezeigt). Dies kann damit erklärt werden, dass mehr S52 auch mehr SDS bindet und so die freie SDS-Konzentration derart verringert, dass das PrP insgesamt unlöslicher wird. Über 1 mM S52 wird so viel SDS an das Peptid gebunden, dass PrP bei SDS-Konzentrationen unlöslich ist (Daten nicht gezeigt), bei denen es ohne S52 noch löslich ist. Da in Abb. 3.3 der Effekt bei 100 μM S52 halbmaximal ist, kann hierdurch, für den Fall dass diese auch der Halbsättigung entspricht, die Dissoziationskonstante von S52 und löslichem PrP bei 0,02 % SDS mit 100 μM abgeschätzt werden.

3.2.2 Abhängigkeit des Effekts des S52 von der Inkubationszeit

Hieran anschließend wurde untersucht, inwieweit dieser Effekt von der Inkubationszeit beeinflusst wird. Dazu wurde bei zwei SDS-Konzentrationen mit und ohne Peptid S52 die Inkubationszeit von 0 min bis 24 h variiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben ultrazentrifugiert und Überstand sowie das Pellet auf einen Dot Blot aufgetragen. Bei 0,02 % SDS ist das PrP bereits nach 5 min Inkubation teilweise unlöslich, nach 10 min sogar mehr als die Hälfte und nach 5 h ist fast alles unlöslich (Abb. 3.4 A). In Gegenwart von 150 μM S52 hingegen bleibt das PrP auch nach 24-stündiger Inkubation noch löslich und findet sich fast ausschließlich im Überstand. Die Verbesserung der Löslichkeit des PrP durch das Peptid ist somit über mehrere Stunden stabil. Leichte Signale in einigen Pellet-Fractionen kann man auf eine nicht vollständige Entfernung des Überstands zurückführen. Die zweite Zeitreihe hatte eine SDS-Konzentration von 0,015 %. Bei dieser Konzentration wird PrP sofort unlöslich (Abb. 3.4 B). Durch 150 μM S52 kann jedoch zumindest ein Teil des PrP mehrere Stunden lang löslich gehalten werden.

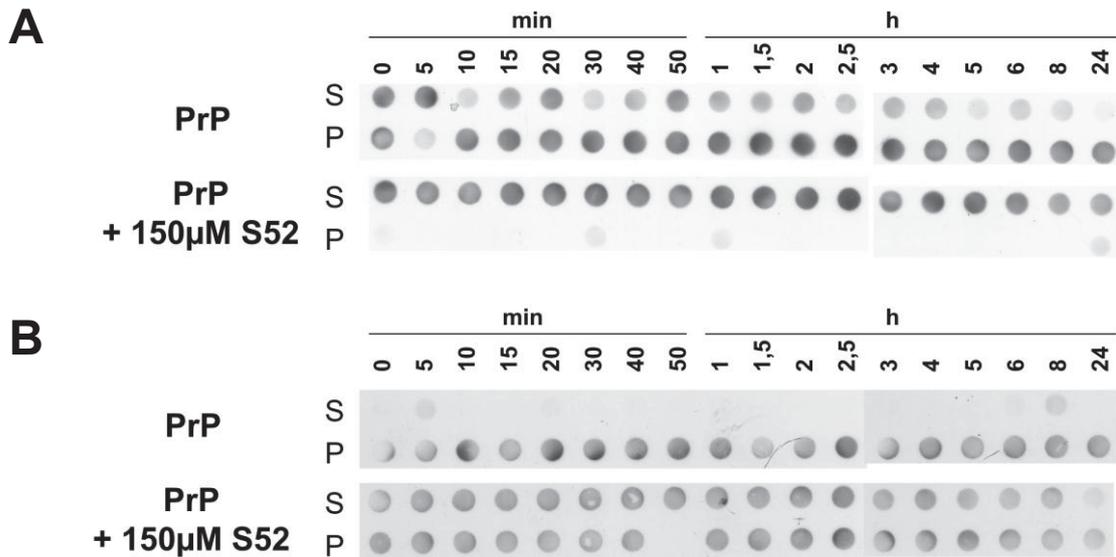


Abb. 3.4: Einfluss von S52 auf die Löslichkeit von PrP bei verschiedenen Inkubationszeiten. **A** Zeitreihe bei 0,02 % SDS **B** Zeitreihe bei 0,015 % SDS

Die beobachtete Unlöslichkeit des PrP bedeutet eine Aggregation, wie eine frühere Studie der Diffusionszeitmessung mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) zeigen konnte (Jansen *et al.*, 2001). So besitzt unlösliches PrP eine deutlich erhöhte Diffusionszeit, aufgrund einer starken Zunahme des Partikelgewichts durch Aggregation des PrP. Demzufolge ist S52 in der Lage, die Aggregation von PrP teilweise zu inhibieren. Wie gezeigt, ist die Inkubationszeit nach der Verdünnung des SDS kaum ausschlaggebend für den Effekt des S52. Ob mit oder ohne S52, die Aggregation, die die Unlöslichkeit des PrP verursacht, findet zum größten Teil sehr schnell statt. Bei längerer Inkubation ändert sich dann die Verteilung des PrPs zwischen Überstand und Pellet kaum noch.

3.2.3 Vergleich des Effekts von S52 und scrambled S52

Um zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt spezifisch auf die Sequenz des S52 zurückzuführen ist, wurde auch scrambled S52 (S52scr) synthetisiert und untersucht. S52scr besteht aus den gleichen Aminosäuren wie S52 jedoch mit einer anderen, zufälligen Reihenfolge. Analog zu dem Blot in Abb. 3.2 wurde auch für S52scr der Einfluss auf die Löslichkeit von PrP mittels differentieller Ultrazentrifugation bestimmt (Abb. 3.5). Der Blot zeigt, dass auch S52scr die Löslichkeit von PrP verbessert. S52scr hält wie S52 das PrP bei niedrigeren SDS-Konzentrationen als 0,04 % zunächst noch löslich, erst bei 0,025 % SDS wird es teilweise unlöslich. Der Übergang von teilweise löslichem PrP hin zu

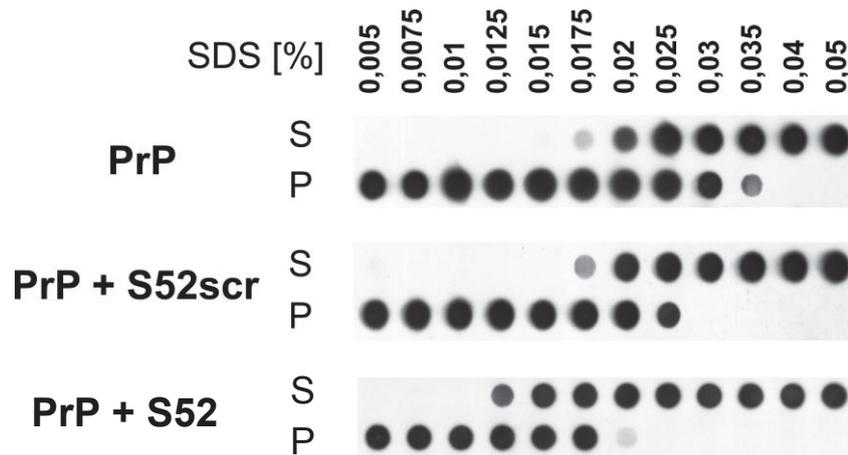


Abb. 3.5: Einfluss von 150 μ M S52scr auf die Löslichkeit von PrP

Die Proben mit und ohne Peptid wurden jeweils auf verschiedene SDS-Konzentrationen verdünnt und nach differentieller Ultrazentrifugation Überstand (S) und Pellet (P) über Dot Blot analysiert.

komplett unlöslichem wird hingegen nicht verändert. Warum das S52scr einen ähnlichen Effekt wie das S52 zeigt, ist nicht ganz klar. Eventuell könnte die Aminosäurezusammensetzung den pH-Wert des Puffers derart verändern, so dass das PrP löslicher wird, zumal PrP bei pH 4,5 auch ohne Detergentien löslich ist. Daher wurde der Einfluss von 150 μ M S52 auf den pH-Wert bestimmt. Die Messung zeigte eine Verringerung des pH von 7,4 auf 7,3 - 7,2 durch die Zugabe von 1,5 mM Peptid. Um auszuschließen, dass diese pH-Änderung für die veränderte Löslichkeit das PrP verantwortlich ist, wurde in einer zusätzlichen SDS-Reihe mit PrP bei pH 7,0 untersucht (Abb. 3.6).

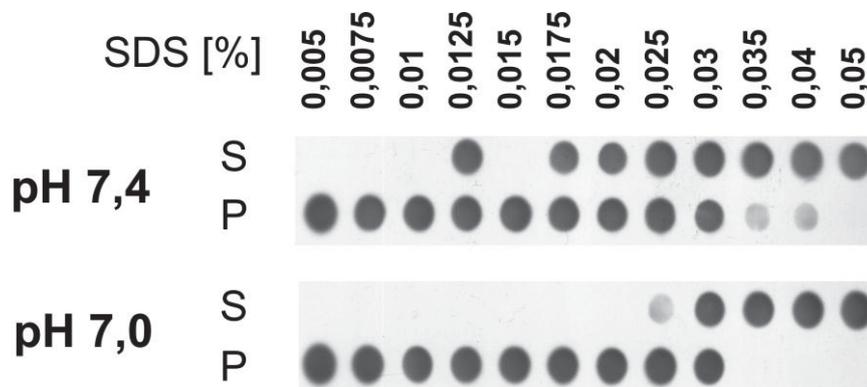


Abb. 3.6: Einfluss des pH-Wertes auf die Löslichkeit von PrP

Die Proben mit und ohne Peptid wurden jeweils auf verschiedene SDS-Konzentrationen verdünnt und nach differentieller Ultrazentrifugation Überstand (S) und Pellet (P) über Dot Blot analysiert.

Der erste Übergang von löslich zu teilweise unlöslich wurde nicht verschoben. Im Gegensatz zu pH 7,4 ist das PrP jedoch schon bei pH 7,0 und 0,025 % SDS nahezu vollständig unlöslich. Das PrP wird durch die Verringerung des pH-Wertes somit eher unlöslicher. Der Blot zeigt damit eindeutig, dass die verbesserte Löslichkeit von PrP bei 150 μ M S52 nicht mit der pH-Verringerung von 0,1 erklärt werden kann. Eine unspezifische Wirkung des S52 kann daher als unwahrscheinlich betrachtet werden. Dass S52scr ebenfalls einen ähnlichen Effekt wie S52 zeigt, könnte damit erklärt werden, dass die Aminosäure-seitengruppen des S52, die die Bindung an PrP vermitteln, auch im S52scr vorhanden sind. Zwar sind die Aminosäuren anders angeordnet, die Distanz der für die Bindung wichtigen Aminosäuren könnte aber ähnlich sein. Zudem haben kurze Peptide meist keine feste Sekundärstruktur und sind daher flexibel. Diese Flexibilität könnte zu einer ähnlichen räumlichen Anordnung der an der Bindung beteiligten Aminosäuren wie beim S52 ermöglichen. Dadurch könnte das S52scr ähnlich an PrP binden und somit auch einen ähnlichen Effekt verursachen.

Zusätzlich wurde noch ein weiteres scrambled Peptid (S52scr2), ebenfalls mit zufälliger Aminosäureanordnung, synthetisiert. Dieses zeigte annähernd den gleichen Effekt wie das hier gezeigte S52scr. Das bedeutet, dass man einen zufälligen Effekt von S52scr andererseits auch ausschließen kann.

3.2.4 Wirkung von S52 auf PrP-Aggregate

Da S52 in der Lage ist, die Löslichkeit von PrP zu erhöhen und die Bildung großer PrP-Aggregate zu verhindern, stellt sich die Frage, ob es auch bereits bestehende Aggregate wieder auflösen kann. Dazu wurden zwei SDS-Konzentrationsreihen mit PrP 24 h inkubiert. Dabei bilden sich bei den entsprechenden SDS-Konzentrationen PrP-Aggregate. Danach wurde je einer Reihe 150 μ M S52 oder Puffer hinzu gegeben und die Proben erneut für 24 h inkubiert. In beiden Fällen wurde die SDS-Konzentration konstant gehalten. Nach differentieller Ultrazentrifugation der Proben wurden diese wiederum auf einen Dot Blot aufgetragen und analysiert (Abb. 3.7). In der oberen Reihe sind die Proben aufgetragen, denen nach der ersten Inkubation nur Puffer hinzugefügt wurde, in der unteren Reihe sind die mit 150 μ M S52 versetzten gezeigt. Wird zweimal ohne S52 inkubiert, liegt der Übergangsbereich, in dem das PrP sowohl im Überstand als auch im Pellet zu finden ist, bei 0,025 bis 0,035 % SDS (Abb. 3.7 obere Reihe). Wird die zweite Inkubation in Gegenwart von 150 μ M S52 durchgeführt, verschiebt sich der Übergangsbereich zu niedrigeren SDS-Konzentrationen (Abb. 3.7 untere Reihe). Das bedeutet, dass das S52 bei

0,015 % und 0,0175 % SDS zuvor unlösliches PrP teilweise wieder löslich macht. Demnach wurde hier ein Teil der gebildeten PrP-Aggregate durch die Zugabe des S52 wieder aufgelöst. Bei 0,03 % hingegen bildet das PrP nur wenige Aggregate. Diese werden durch die nachträgliche Inkubation mit S52 sogar vollständig wieder aufgelöst.

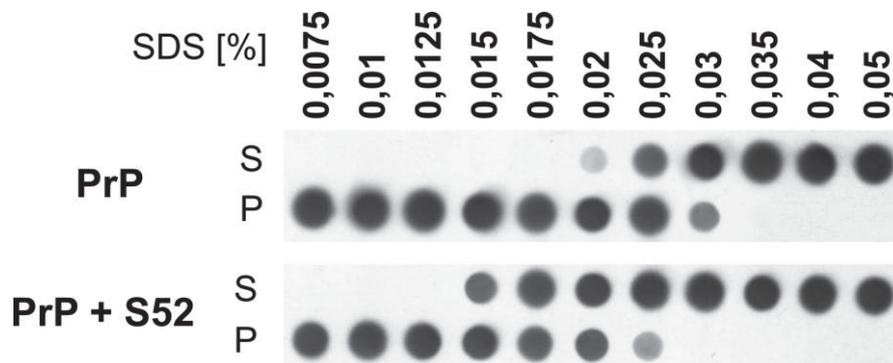


Abb. 3.7: Einfluss von S52 auf Aggregate von PrP

PrP wurde bei verschiedenen SDS-Konzentrationen inkubiert. Danach wurden entweder 150 μ M S52 oder nur Puffer zugefügt, die SDS-Konzentration aber konstant gehalten. Dann wurde erneut inkubiert und mittels differentieller Ultrazentrifugation die Löslichkeit des PrP bestimmt.

3.3 Einfluss der Peptide auf die Sekundärstruktur von PrP

In Kap. 3.1 wurde das Konzept der zwei Übergänge des PrP, dem der Löslichkeit und dem der Strukturänderung, vorgestellt. In Kap. 3.2 wurde der Übergang der Löslichkeit behandelt, im folgenden Kapitel wird nun der Einfluss von S52 auf den Strukturübergang gezeigt. Dieser ist der zentrale Schritt bei der Replikation des Erregers. Die Infektiosität des PrP^{Sc} geht immer mit einer Strukturänderung zu vermehrt β -Faltblatt einher.

3.3.1 Bestimmung geeigneter Konzentrationen von PrP und SDS für die CD-Spektroskopie

Um einen Effekt des S52 auf die Löslichkeit von PrP beobachten zu können, war wie bereits gezeigt, eine Konzentration von 100 - 150 μ M des Peptides notwendig. Die gleiche Peptidkonzentration wurde auch in den Proben für die CD-Spektroskopie eingesetzt, mittels derer die Sekundärstruktur des PrP untersucht wurde. Dies ergab aber insofern ein Problem, dass das Aminosäurerückgrat des Peptids ebenfalls in dem Wellenlängenbereich

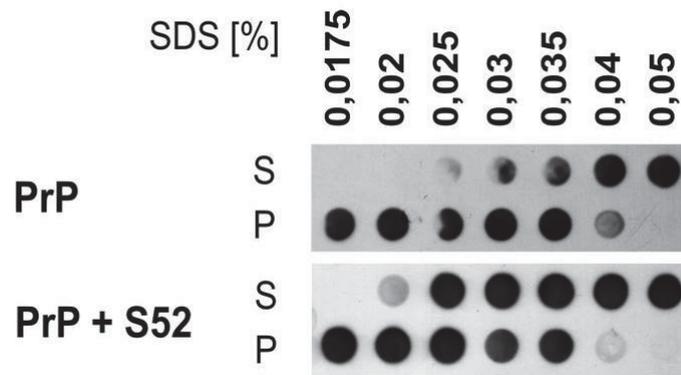


Abb. 3.8: Löslichkeitsübergang von 200 ng/µl PrP mit 150 µM S52

absorbiert, mit dem die Sekundärstruktur des PrP untersucht werden soll. Da die Aminosäuren des Peptids auch ein CD-Signal erzeugen, ist das gemessene CD-Spektrum eine Mischung aus den CD-Spektren des PrPs und des Peptids. Die 100 µM S52 enthalten 1,1 mM absorbierende Peptidbindungen und 10 ng/µl PrP(90-231) besitzen 0,087 mM Peptidbindungen (141 x 0,616 µM PrP). Bei den gleichen Konzentrationen wie bei den Löslichkeitsuntersuchungen würde das Peptid somit ein mehr als 10-mal stärkeres CD-Signal verursachen als das PrP. Eine Bestimmung der Sekundärstruktur des PrP wäre vor diesem hohen Peptidhintergrund kaum möglich. Um vor diesem Hintergrund ein ausreichendes starkes PrP-Spektrum zu erhalten, wurden 150 - 200 ng/µl PrP bei der CD-Spektroskopie eingesetzt. Durch die im Vergleich zu den Löslichkeitsbestimmungen 15-fache PrP-Konzentration verschieben sich jedoch die beiden Grenzen des Übergangsbereichs für die Löslichkeit von PrP zu höheren SDS-Konzentrationen (Abb. 3.8). Die SDS-Konzentration, ab der das PrP komplett löslich ist, liegt hier mit und ohne S52 bei 0,05 %. Der Übergangsbereich ist in beiden Reihen fast gleich. Mit 150 µM S52 liegt der Übergangsbereich bei 0,025 % bis 0,035 % SDS. Bei 10 ng/µl PrP und 150 µM S52 wie bei den Löslichkeitsuntersuchungen liegt dieser bei nur 0,015 % bis 0,02 % SDS (Abb. 3.2). Das PrP ist jedoch zwischen 0,02 % und 0,04 % SDS mit S52 in jedem Fall besser löslich als ohne. Das bedeutet, dass höher konzentrierte PrP aggregiert bereits bei höheren SDS-Konzentrationen und der SDS-Bereich, in dem das PrP bereits β -faltblattstrukturiert aber noch löslich ist, verschiebt sich durch die höhere PrP-Konzentration hin zu höheren SDS-Konzentrationen. Da sich mit der CD-Spektroskopie nur die löslichen Zustände des PrP untersuchen lassen, wurden im Folgenden meist SDS-Konzentrationen ab 0,04 % gewählt, da hier das PrP noch überwiegend löslich ist, aber ohne Peptid bereits ein β -Faltblattspektrum zeigt (Jansen *et al.*, 2001).

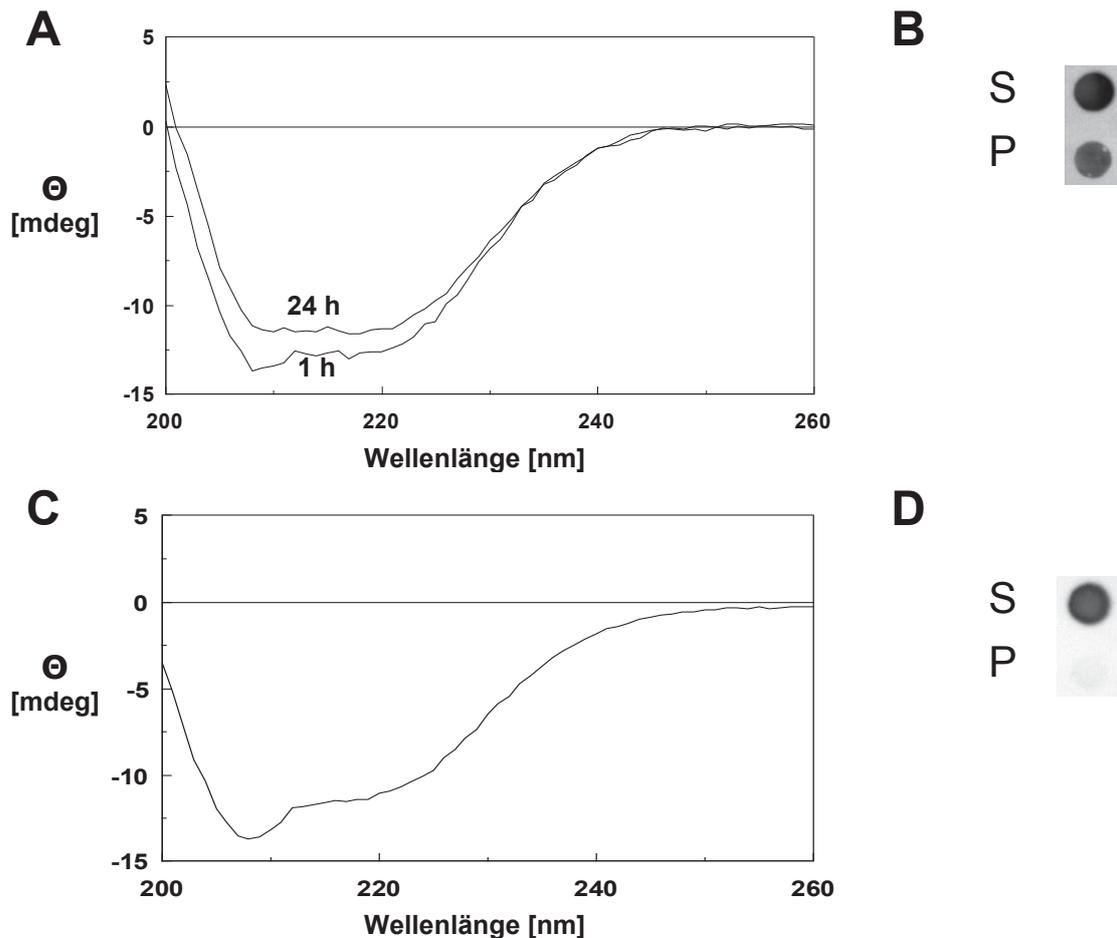


Abb. 3.9: CD-Spektren und Löslichkeit von PrP in 0,05 % und 0,08 % SDS

A CD-Spektrum von 150 ng/ μ l PrP 1 h und 24 h nach der Verdünnung des SDS von 0,2 % auf 0,05 %. **B** Löslichkeit des PrP in 0,05 % SDS nach 24 h. **C** CD-Spektrum von 150 ng/ μ l PrP in 0,08 % SDS nach 1 h. **D** Löslichkeit des in 0,08 % SDS PrP nach 24 h.

Wie zuvor bei den Löslichkeitsmessungen wurde auch bei den Proben für die CD-Spektroskopie das PrP ausgehend von einer Stammlösung mit 0,2 % SDS auf verschiedene SDS-Endkonzentrationen mit jeweils 150 ng/ μ l PrP verdünnt. Danach wurden die Proben sofort CD-spektroskopisch untersucht. Die Abbildung 3.9 C zeigt ein Spektrum bei 0,08 % SDS. Die Elliptizität Θ ist hier durchgehend negativ, d.h. es wird mehr rechtszirkular polarisiertes Licht als linkszirkular polarisiertes absorbiert. Hier und bei höheren SDS-Konzentrationen zeigt PrP ein α -helix-ähnliches bis teildenaturiertes Spektrum (vgl. Abb. 2.2). Die teilweise α -helikale Struktur zeigt sich an dem Minimum bei 208 nm. Das für α -Helices charakteristische zweite Minimum bei 222 nm ist unter diesen Bedingungen nur ansatzweise als Schulter ausgeprägt.

Da für eine spektroskopische Untersuchung die Proben möglichst löslich sein sollten, wurde als Nächstes mit 0,05 % eine SDS-Konzentration eingestellt, bei

der das PrP gerade noch löslich ist (s. Abb. 3.8). In Abb. 3.9 A ist die Elliptizität Θ von PrP bei 0,05 % SDS dargestellt. Das Spektrum nach 1 h Inkubation zeigt ein Minimum bei 208 nm und eines bei etwa 217 nm. α -Helices zeigen bei der CD-Spektroskopie Minima bei 207 nm und 222 nm, unstrukturierte Bereiche und Random Coil erzeugen ein Minimum bei 195 nm (Abb. 2.2). Am ehesten lässt sich das gemessene Spektrum daher als Mischung aus Resten von α -Helices, Zufallsknäuel und etwas β -Faltblatt interpretieren, wobei der Zufallsknäuelanteil durch die leichte, SDS-bedingte Teildenaturierung verursacht wird. Nach 24 h Inkubation bei 0,05 % SDS ist das Minimum bei 207 nm verschwunden bzw. nur noch als Schulter zu erkennen und es zeigt sich ein Minimum bei etwa 217 nm. Das bedeutet, bei 0,05 % SDS enthält das PrP auch nach einer Stunde noch α -helikale Anteile. Erst nach 24 h zeigt es ein β -faltblattstrukturiertes Spektrum ohne deutliche Anteile einer α -Helix. Zwar ist hier ein Teil des PrP bereits unlöslich (Abb. 3.9 B), ein eindeutiges β -Faltblattspektrum liegt aber noch nicht vor (Abb. 3.9 A), der Strukturübergang ist damit hier noch nicht vollständig vollzogen.

Eine genauere Bestimmung der Sekundärstrukturanteile durch diverse Auswertungssoftware ist bei diesen Pufferbedingungen leider nicht möglich gewesen, denn durch den Peptidhintergrund waren die gemessenen Spektren auch trotz mehrfacher Akkumulation immer noch zu stark durch den Peptidhintergrund verwaschen. Zudem liefern diese Programme nur verlässliche Ergebnisse, wenn auch der Spektralbereich von 185 - 200 nm mit aufgenommen wird. Durch die hohe Peptidkonzentration sind die gemessenen Proben in diesem Spektralbereich jedoch optisch nahezu dicht und machen so jegliche Messung der Elliptizität in diesem Bereich unmöglich.

Da der Strukturübergang bei 0,05 % SDS noch nicht vollständig ist, kann somit die potenzielle Inhibierung des Strukturübergangs durch S52 bei 0,05 % SDS nicht untersucht werden, wie zunächst anhand früherer Ergebnisse (Jansen *et al.*, 2001) und der Löslichkeitsbestimmungen (Abb. 3.8) vermutet werden konnte. Daher wurde alle weiteren Messungen bei der niedrigeren SDS-Konzentration von 0,04 % SDS durchgeführt, bei der das PrP zwar nicht mehr vollständig löslich ist, aber bereits ein deutliches β -Faltblattspektrum zeigt (Abb. 3.10 A und C).

3.3.2 Wirkung von S52 und S52scr auf die Struktur von PrP

Im CD-Spektrum von PrP ist direkt nach der Verdünnung des SDS von 0,2 % auf 0,04 %, im Gegensatz zu 0,05 % (Abb. 3.9 A), ein Minimum bei 207 nm nicht mehr vorhanden, wohl aber eines bei 217 nm (Abb. 3.10 B). PrP weist damit eine hauptsächlich β -faltblattreiche Sekundärstruktur auf, deren Strukturanteile sich auch bei längerer Inkubation kaum noch ändern. Wird das PrP hingegen mit 150 μ M S52 inkubiert, ist im Vergleich zur Probe mit PrP allein zunächst auch hier im Blot eine deutliche Löslichkeitszunahme zu erkennen (Abb. 3.10 A). Um den Einfluss des S52 auf die Struktur des PrP bestimmen zu können, muss von dem gemessenen Spektrum noch das Signal des freien S52 abgezogen werden. Ein solches Spektrum von 150 μ M S52 ist in Abb. 3.10 B gezeigt. S52 nimmt wie die meisten untersuchten Peptide in wässriger Lösung keine geordnete Struktur an und erscheint in der CD-Spektroskopie als Zufallsknäuel. Daraus und der hohen Signalamplitude wird ersichtlich, wie stark sich durch den Überschuss des Peptids das gemessene CD-Spektrum von PrP verändert. Um bei Proben mit PrP und Peptid die Struktur des PrP bestimmen zu können, wurde daher von den gemessenen CD-Spektren jeweils das Spektrum des freien Peptids, bestimmt durch eine Kontrollprobe, subtrahiert. Da bei einem Verhältnis von Peptids zu PrP von 16:1 nur ein sehr geringer Anteil der Peptide an das PrP binden kann, ist die Konzentration des freien Peptids im Vergleich zur Kontrolle nahezu konstant und die Änderung wurde vernachlässigt. Die zu erkennenden Anteile der Sekundärstrukturelemente in den sich daraus ergebenden Spektren können nun dem PrP zugeordnet werden und Änderungen auf eine Strukturänderung des PrP zurückgeführt werden. Zwar können die Peptide durch die Bindung an PrP ihre Struktur ebenfalls ändern, doch durch den Größenunterschied von PrP und dem Peptid (142 bzw. 12 Aminosäuren) fällt die Intensität der CD-Signaländerung der gebundenen Peptide neben der des PrP kaum ins Gewicht. Der Ansatz ohne Peptide wurde entsprechend nur um das reine Pufferspektrum korrigiert.

Bereits kurz nach der Verdünnung des SDS auf 0,04 % zeigt das PrP kein deutlich α -helikales Spektrum mehr (Abb. 3.10 C). Das Minimum bei 218 nm liegt bei einer eher für β -Faltblatt charakteristischen Wellenlänge. Eine leichte Schulter im Spektrum bei etwa 205 nm weist jedoch auf noch vorhandene Reste der α -Struktur hin. Nach einer Stunde hat sich diese Schulter weiter zurückgebildet, und ist nach 24 h gänzlich verschwunden. Das Spektrum nach 24 h zeigt nun ein annähernd symmetrisches Minimum bei 218 nm. Das PrP liegt nun in einer β -Isoform vor. Der Nulldurchgang des Spektrums verschiebt

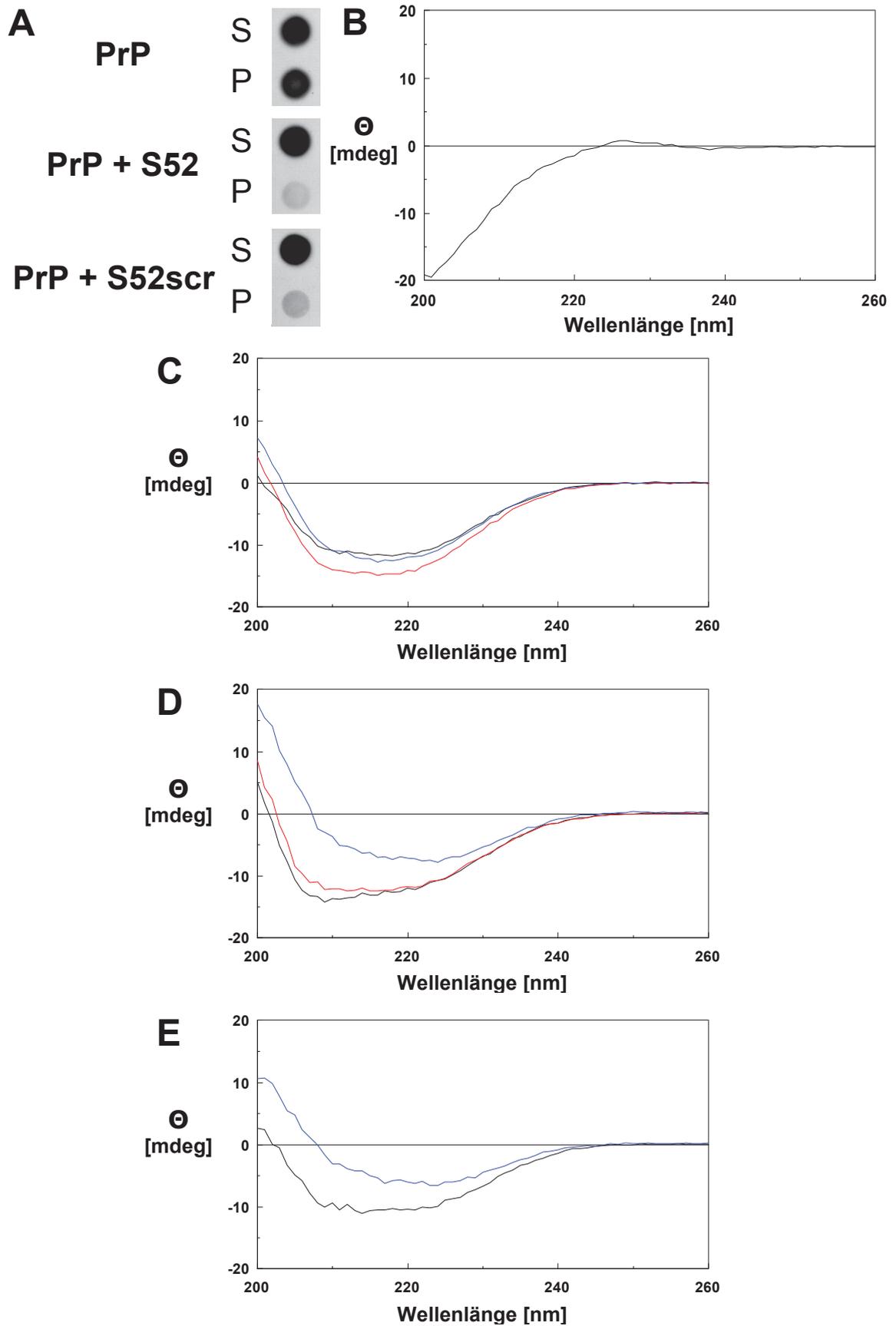


Abb. 3.10: Einfluss von S52 auf die Sekundärstruktur von PrP

A PrP-Immunoblot der Proben aus C, D und E nach 24 h. **B** 150 μ M S52. **C-E** CD-Spektren von PrP in 0,04 % SDS, schwarz jeweils nach 0 h, rot nach 1 h, blau nach 24 h. **C** 150 ng/ μ l PrP. **D** PrP mit 150 μ M S52. **E** PrP mit 150 μ M S52scr.

sich im Verlauf der Inkubation zu größeren Wellenlängen. Dies spricht ebenfalls für eine Zunahme des β -Faltblattanteils (vgl. Abb. 2.2).

Im Gegensatz zu der Messung von PrP ohne Peptid ist bei der Sofortmessung (0 h) mit S52 das Minimum bei 207 nm noch deutlich ausgeprägt (Abb. 3.10 D). Nach einer Stunde ist dieses Minimum zwar schwächer aber immer noch vorhanden. Nach 24 h jedoch liegt das Minimum bei 226 nm und der Nullpunkt des Spektrums hat sich deutlich nach rechts verschoben. Es kommt also auch hier zu einer Strukturänderung des PrP hin zu mehr β -Faltblattanteilen. Gleichzeitig kommt es zu einer Aggregation von PrP. Dies zeigt sich an dem Minimum bei den dafür charakteristischen 222 nm oder höher, sowie einer deutlichen Abnahme der negativen Elliptizität. Das PrP ist aber trotz dieser einsetzenden Aggregation immer noch gut löslich (Abb. 3.10 A). Das S52 ist demnach zwar nicht in der Lage, das PrP so zu stabilisieren, dass eine Konversion zur überwiegend β -faltblattstrukturierten Isoform verhindert wird, S52 kann diese Konversion jedoch zeitlich verzögern.

Einen ähnlichen Effekt wie S52 zeigt auch S52scr (Abb. 3.10 E). Auch hier sind bei der Sofortmessung nach 0 h noch Reste der α -helikalen Struktur zu erkennen, wenn auch etwas weniger. Nach 24 h ist das PrP hier ebenfalls β -strukturiert. Und wie schon bei den Löslichkeitsuntersuchungen zuvor gezeigt, bleibt das PrP mit S52scr über 24 h hinweg gut löslich und zeigt somit auch unter diesem Gesichtspunkt einen ähnlichen Effekt auf das PrP wie S52. Demnach kann von dem Effekt des S52 in den bisher gezeigten Versuchen nicht eindeutig auf eine spezifische Bindung des S52 an das PrP geschlossen werden. Anscheinend ist, wie das S52scr zeigt, neben der Reihenfolge allein die Aminosäurezusammensetzung des Peptids für einen Teil der Wirkung verantwortlich und für einen leichten Effekt ausreichend.

3.4 Fibrillogenese von PrP mit S52 und S52scr

Parallel zu dieser Arbeit wurde in unserem Labor das SDS-basierte *In-vitro*-Konversionssystem dahingehend weiterentwickelt, dass SHa rekPrP(90-231) auch in eine amyloide fibrilläre Form überführt werden kann (s. Kap. 1.7). Aufgrund der hohen Korrelation von fibrillärer Struktur und Infektiosität wurde im Folgenden der Einfluss des Peptids auf die Fibrillogenese von PrP untersucht. Sollte S52 in diesem *In-vitro*-Konversionssystem eine inhibitorische Wirkung auf die Fibrillogenese zeigen, können daran anschließend in Bio-Assays untersucht werden, ob S52 auch einen Effekt *in vivo* auf den Krankheitsverlauf experimentell infizierter Tiere hat. Da Bio-Assays sehr langwierig, teuer und aus

ethischen Gesichtspunkten auf ein Minimum zu reduzieren sind, kommen diese aber nur für Peptide in Frage, die aufgrund ihrer Ergebnisse *in vitro* für eine Therapie besonders aussichtsreich erscheinen.

Um die Fibrillogenese des SHa rekPrP(90-231) zu induzieren, werden im *In-vitro*-Konversionssystem Bedingungen gewählt, bei denen PrP zwar bereits β -strukturiert aber noch überwiegend löslich ist. Bei 100 ng/ μ l SHa rekPrP(90-231) und 250 mM NaCl ist dies bei 0,03 % SDS der Fall. Die entsprechenden Proben wurden sieben Wochen bei 37 °C inkubiert. Bei höheren PrP-Konzentrationen als 100 ng/ μ l ist die Fibrillogenese beschleunigt und es reichen kürzere Inkubationszeiten von bis zu einer Woche. Hierfür stand jedoch zu wenig rekPrP zur Verfügung, so dass die längere Inkubationszeit in Kauf genommen werden musste.

Angesetzt wurde jeweils eine Probe nur mit PrP und eine mit zusätzlich 150 μ M S52. Als weitere Kontrollen wurden parallel Pufferproben mit und ohne S52 inkubiert. Nach der siebenwöchigen Inkubation wurde den Proben je ein Aliquot von 4 μ l entnommen und für die differentielle Ultrazentrifugation auf 20 μ l mit Puffer aufgefüllt. Nach der Zentrifugation wurden Überstand und Pellet in Auftragspuffer denaturiert, der hier noch zusätzlich 3 M Harnstoff enthielt, um vorhandene Fibrillen besser lösen zu können. Der Dot Blot der Probe ohne Peptid zeigt das PrP nach sieben Wochen größtenteils im Pellet (Abb. 3.11 Proben 5+6). Wurde das PrP hingegen mit S52 oder S52scr inkubiert, lässt es sich nur im Überstand nachweisen (Abb. 3.11 Proben 1-4). Der positive Effekt beider Peptide auf die Löslichkeit von PrP ist somit bei diesen Bedingungen auch nach über sieben Wochen noch zu beobachten.

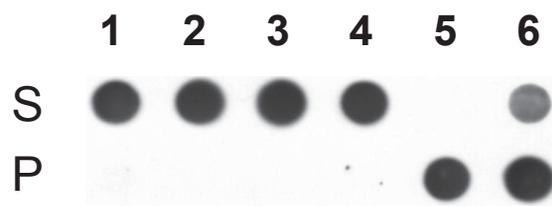


Abb. 3.11: Löslichkeit von PrP in 0,03 % SDS und 250 mM NaCl nach 7 Wochen.

Angesetzt wurden jeweils 2 parallele Ansätze: **1+2** PrP mit 150 μ M S52, **3+4** PrP mit 150 μ M S52scr, **5+6** PrP ohne Peptid.

3.4.1 Nachweis Amyloider Strukturen über Thioflavin T Fluoreszenz

Über die Fluoreszenz des Farbstoffs Thioflavin T (ThT) kann untersucht werden, ob ein Protein in amyloider Form vorliegt. ThT bindet an amyloide Strukturen und fluoresziert dadurch bei geeigneter Anregung, während ThT, das frei in Lösung oder an andere Strukturen, z.B. wie amorphes PrP, gebunden vorliegt, nur sehr wenig fluoresziert. Dieser deutliche Fluoreszenzunterschied weist somit spezifisch ein Vorhandensein amyloider Strukturen nach.

Fluoreszenzspektren von ThT mit PrP sind in Abb. 3.12 dargestellt. Wird es mit amorph aggregiertem PrP inkubiert, zeigt sich nur eine geringe Fluoreszenz (Abb. 3.12 schwarzes Spektrum) etwa auf dem Niveau von freiem ThT in Puffer (vgl. Abb. 3.13). Ob dies an einer mangelnden Bindung an amorphes PrP liegt, oder ob eine Bindung vorliegt, diese die Fluoreszenzeigenschaften aber nicht beeinflusst, ist nicht bekannt. Dies ist aber auch für die weitere Auswertung unerheblich. Bei der Bindung von ThT an amyloides PrP (Abb. 3.12 graues Spektrum) ist ein Anstieg der Fluoreszenz um etwa das Zehnfache zu beobachten. Die Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums bleibt dabei nahezu konstant. Mittels ThT kann somit sehr gut zwischen amorph aggregierten und amyloiden PrP unterscheiden werden.

Des Weiteren wurde zunächst untersucht, ob Peptide die Spektren direkt beeinflussen. Zwar sind die Peptide nicht amyloid aggregiert, dennoch sollte ausgeschlossen werden, dass die hohe Konzentration der Peptide die Fluoreszenz verändern. Das Spektrum von ThT mit S52 zeigt nur eine minimale Erhöhung der Fluoreszenz im Vergleich zu ThT in reinem Puffer (Abb. 3.13). Beide Proben haben im Maximum eine relative Fluoreszenz von ca. 2.500 - 3.000 relativen Einheiten. Amyloide Aggregate weisen bei den gleichen Messbedingungen eine Fluoreszenz von über 20.000 relative Einheiten auf. Damit ist die Fluoreszenzerhöhung durch das Peptid bei der Unterscheidung von amyloiden und nicht-amyloiden PrP-Aggregate vernachlässigbar klein. Dementsprechend wurden auch die Fibrillogeneseproben aus 3.4 fluoreszenzspektrometrisch untersucht. Je ein Aliquot jeder Probe wurde 1:10 verdünnt und mit 10 μ M ThT versetzt. Die Konzentration von SDS, NaCl und Peptid wurden dabei konstant gehalten.

Nach sieben Wochen Inkubation zeigt PrP ohne Peptid eine hohe ThT-Fluoreszenz (Abb. 3.14). Die Probe, die mit S52 inkubiert wurde, zeigt mit etwa 3.000 relativen Einheiten hingegen nur eine geringe Fluoreszenz etwa auf dem gleichen Niveau wie amorphes PrP oder Puffer. Wie auch bei den Löslichkeitsbestimmungen zeigt die Probe mit S52scr auch hier einen ähnlichen

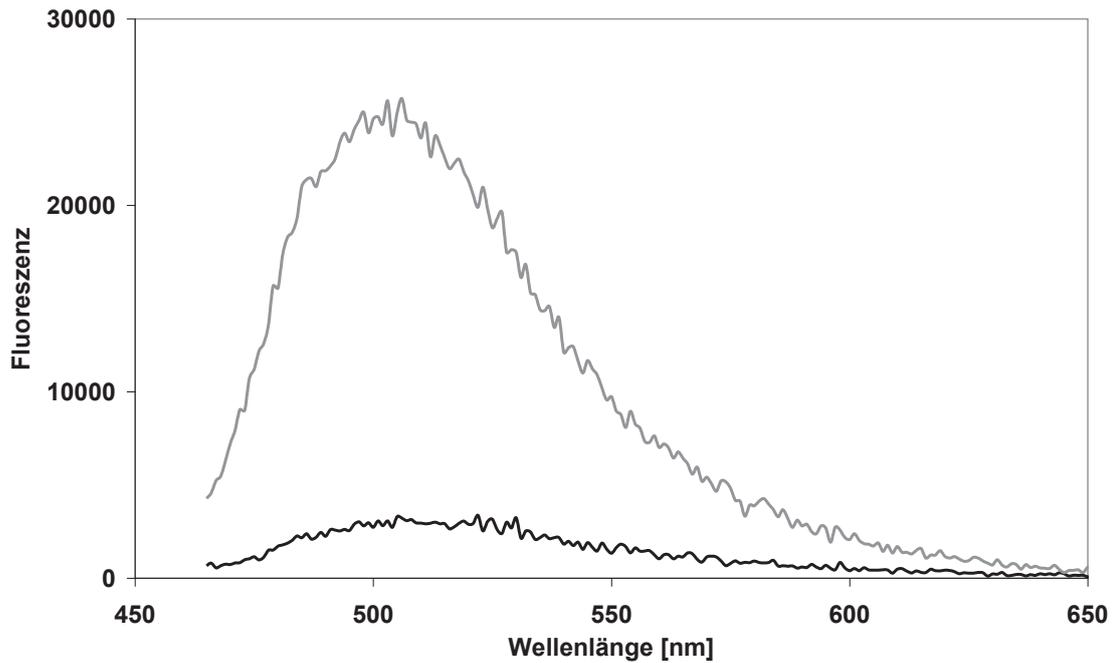


Abb. 3.12: Fluoreszenzspektren von ThT gebunden an unterschiedliche PrP-Strukturen. Die schwarze Linie zeigt die Fluoreszenz von ThT gebunden an amorph aggregiertes PrP, die graue Linie an PrP mit überwiegend fibrillärer und somit amyloider Struktur. Die Anregungswellenlänge lag jeweils bei 445 nm. (jeweils 10 Spektren gemittelt)

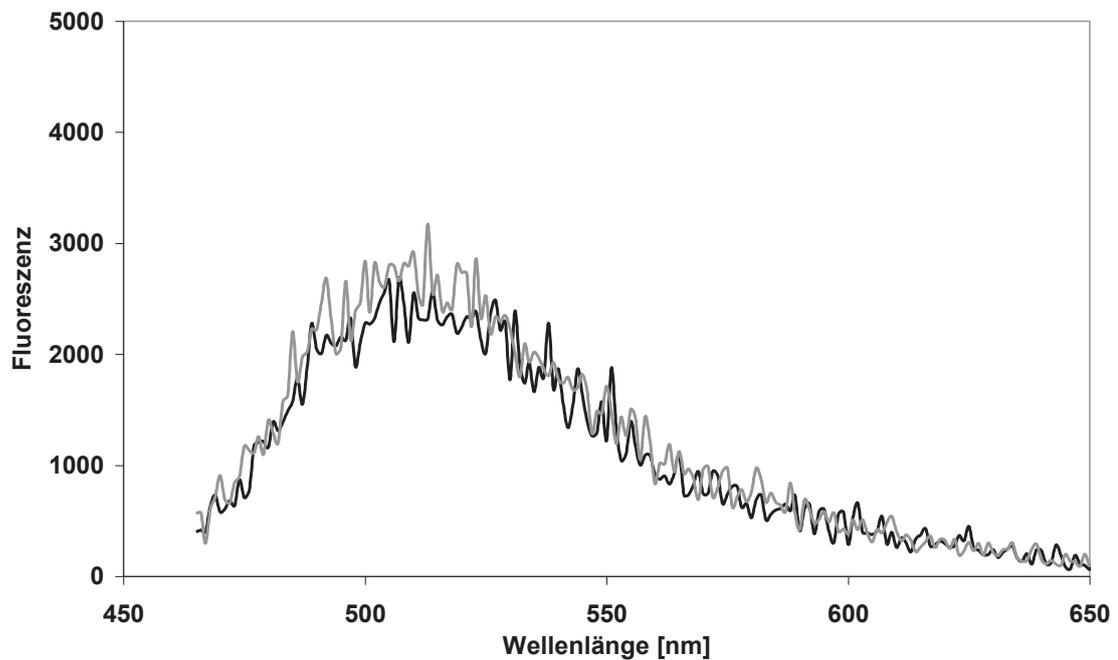


Abb. 3.13: Einfluss von freiem Peptid auf das Fluoreszenzspektrum von ThT

ThT in Puffer der Fibrillogenseansätze: 10 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,2 mit 0,03 % SDS, 250 mM NaCl (schwarze Linie) und gleicher Puffer mit 150 μ M S52 (graue Linie), jeweils 10 Spektren gemittelt

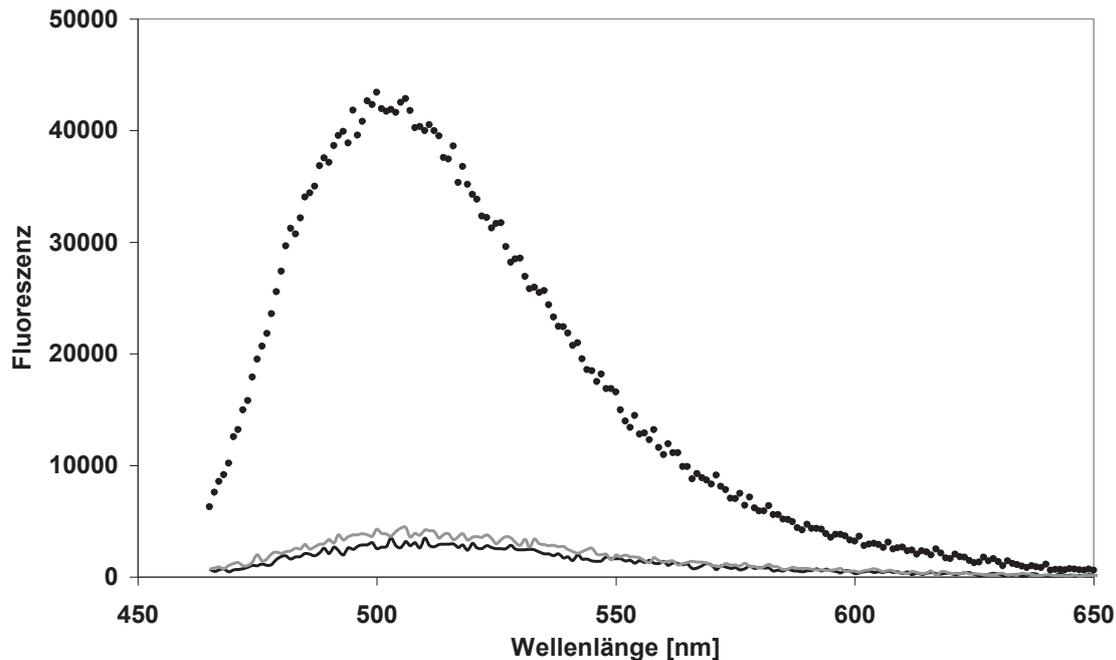


Abb. 3.14: ThT-Fluoreszenz von PrP mit S52 und S52scr

PrP nach 7 Wochen (schwarz gepunktete Linie), PrP inkubiert mit 150 μM S52 (schwarze Linie) und mit S52scr (graue Linie), jeweils 10 Spektren gemittelt

Effekt wie das S52. Beide Peptide halten PrP somit nicht nur über sieben Wochen lang hinweg löslich, sondern verhindern auch die Bildung amyloider Strukturen. Ohne S52 oder S52scr wird PrP jedoch unlöslich und bildet Amyloide.

3.4.2 Elektronenmikroskopie von PrP mit S52 und S52scr

Um die Ergebnisse der Fluoreszenzmessungen zu bestätigen, wurden die Proben noch elektronenmikroskopisch untersucht. Wird PrP ohne eines der Peptide inkubiert, erkennt man einzelne Fibrillen mit einem Durchmesser von etwa 10 nm (Abb. 3.15 B) und amorphe Aggregate, die teilweise mit kleineren Fibrillen assoziiert sind (Abb. 3.15 A). In den Präparationen der Proben mit S52 (Abb. 3.15 C) oder S52scr (Abb. 3.15 D) wurden ebenfalls amorphe Aggregate aber keine Fibrillen gefunden. Die Befunde der ThT-Fluoreszenz und der Elektronenmikroskopie stimmen somit überein.

Zudem kann ausgeschlossen werden, dass die geringere Fluoreszenz der Proben mit Peptid darauf beruht, dass die Peptide das ThT von den Fasern verdrängen bzw. diese so maskiert, dass ThT nicht binden kann. In diesem Fall würde es auch zu einer geringen ThT-Fluoreszenz kommen. Durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann dies jedoch ausgeschlossen

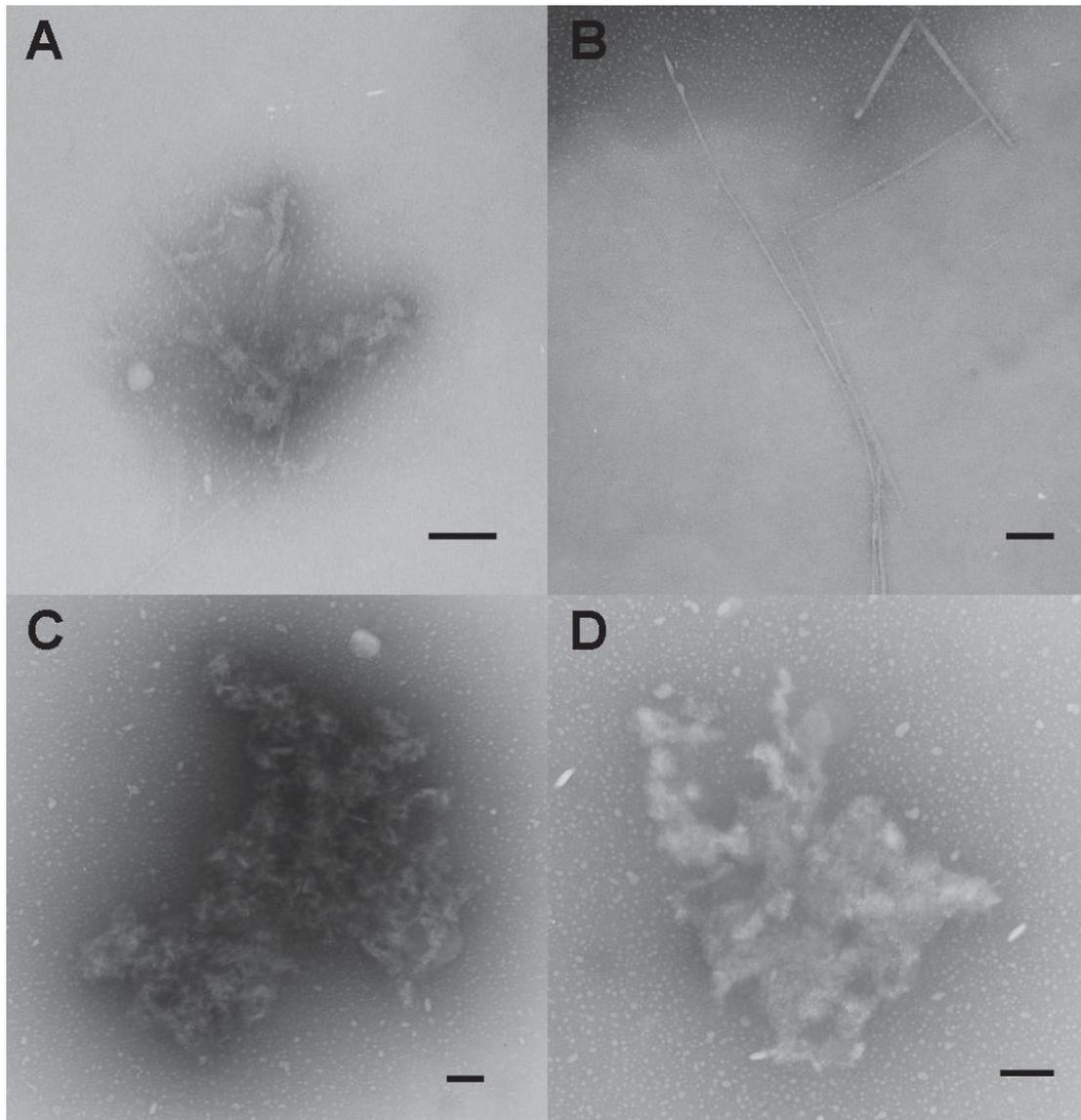


Abb. 3.15: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Fibrillogeneseansätze von PrP nach 7 Wochen. A+B PrP ohne Peptid inkubiert, **C** PrP inkubiert mit 150 μ M S52, **D** PrP inkubiert mit 150 μ M S52scr. Die Balken entsprechen jeweils 100 nm.

werden. Eine Degradation von PrP in den Proben mit Peptid durch eventuelle Verunreinigungen, und eine darauf beruhende verringerte Fluoreszenz, ist demnach auch nicht möglich. Die immunologische Detektion von PrP im Pellet bei den Löslichkeitsuntersuchungen (Abb. 3.11) und sprechen ebenfalls gegen eine solche Degradation. Auch wenn hier nur das Vorhandensein des Epitops des 3F4-Antikörpers (AS 109-112) nachgewiesen wurde und nicht die vollständige Sequenz des PrP, so läge das PrP im Fall der Degradation entweder als einzelne Aminosäuren und überhaupt nicht mehr nachweisbar vor oder wäre als kurze Peptidfragmente nicht im Pellet zu finden. Western Blots der gezeigten Proben ergaben keine Ergebnisse, vermutlich da die großen

Aggregate und Fibrillen nicht gut genug vom Auftragspuffer aufgelöst wurden und nicht in das Gel eingelaufen sind (Daten nicht gezeigt). Zum Zeitpunkt der elektronenmikroskopischen Versuche bestand keine Möglichkeit zum Immunogold-Labeling als Nachweis von PrP in den gefundenen Strukturen. Die Fibrillen und Aggregate erscheinen jedoch als ziemlich typisch für PrP.

3.4.3 Auflösung von PrP-Fibrillen durch S52

In Kap. 3.2.4 wurde bereits gezeigt, dass S52 zu einem gewissen Grad in der Lage ist, bestehende PrP-Aggregate wieder aufzulösen. Daher wurde nun untersucht, ob das S52 auch PrP-Fibrillen wieder auflösen kann. Dazu wurde ein Aliquot der Probe aus Abb. 3.15 A+B nachträglich mit 167 μM S52 sowie ein Kontrollaliquot mit dem gleichen Volumen Puffer versetzt und beide 24 Stunden inkubiert. Danach wurde den Proben ThT hinzugefügt und deren Fluoreszenz gemessen. Es zeigt sich eine um mehr als die Hälfte verringerte Fluoreszenz, wenn die Fibrillen 24 Stunden mit S52 inkubiert wurden (Abb. 3.16). Da bereits gezeigt wurde, dass das Peptid die Fluoreszenz oder die Bindung von ThT nicht beeinflusst, bedeutet dies, dass S52 bereits bestehende Fibrillen zumindest teilweise wieder auflösen kann. EM-Aufnahmen von diesen Proben, hätten letzte Zweifel beseitigt, waren jedoch aufgrund des zu geringen Probenvolumens nicht mehr möglich, bzw. sind bei der Reproduktion misslungen.

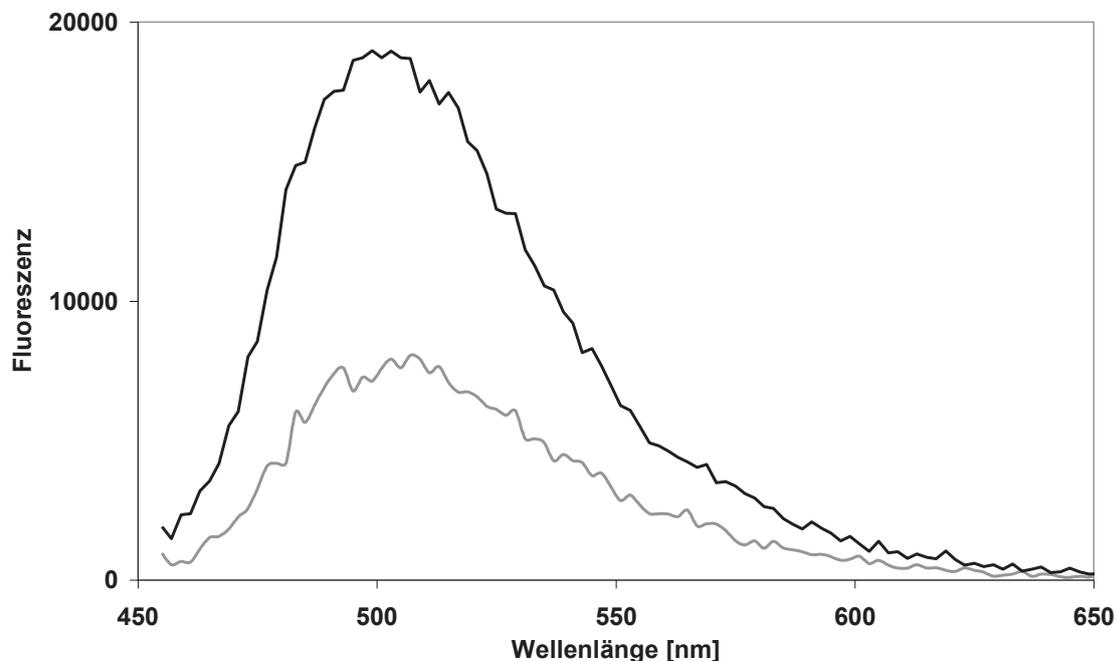


Abb. 3.16: ThT-Fluoreszenz von PrP-Fibrillen nach Zugabe von S52

PrP-Fibrillen mit Puffer (schwarze Linie), PrP-Fibrillen mit 167 μM S52 (graue Linie), beide Proben jeweils 24 h inkubiert und jeweils 10 Spektren gemittelt

3.5 Charakterisierung der Bindung von PrP und S52

Das Peptid S52 zeigt eine inhibitorische Wirkung auf die Konversion und Fibrillogenese von PrP. Da S52 durch Phage-Display selektiert wurde, ist davon auszugehen, dass dieser Effekt auf einer spezifischen Bindung von S52 an PrP beruht. Doch nahezu alle Effekte von S52 auf das PrP sind, zumindest in ähnlicher Form, auch mit S52scr zu beobachten. Daher stellt sich die Frage, inwieweit die Wirkung des S52 tatsächlich auf dessen Aminosäuresequenz beruht. Da PrP im sauren Milieu besser löslich ist, wäre auch denkbar, dass die Peptide über eine pH-Änderung der Lösung die erhöhte Löslichkeit des PrP bewirken. Ein solcher pH-Effekt kann aber ausgeschlossen werden, da je 150 μM der beiden Peptide den pH-Wert des verwendeten Natriumphosphatpuffers nicht messbar ändern. Selbst 1,5 mM S52 ändern den pH-Wert um weniger als 0,1 und selbst dies reicht nicht aus, einen Effekt auf das PrP zu verursachen (Kap. 3.2.3). Auch Verunreinigungen des S52, die den Effekt hätten auslösen können, können ausgeschlossen werden. Die verwendeten Peptide wurden im Laufe dieser Arbeit von unterschiedlichen Herstellern bezogen und waren jeweils nach HPLC und Massenspektrometrie hoch rein. Dabei zeigte alle Chargen die gleiche Wirkung auf das PrP, was einen derartigen artifiziellen Effekt unwahrscheinlich macht.

3.5.1 Crosslinking von PrP und S52

Um den Mechanismus des Effekts von S52 genauer zu charakterisieren, wurde die Bindung von S52 an PrP näher untersucht. Hierfür wurde S52 mittels des chemischen Crosslinkers EDC bei 0,05 % SDS kovalent an PrP gebunden. Bei dieser SDS-Konzentration liegt PrP als lösliche Monomere und Dimere vor. Die entstandenen Produkte wurden dann mit einer denaturierenden SDS-PAGE analysiert. Ohne EDC liegt PrP im Gel nahezu ausschließlich als Monomer bei ca. 16 kDa vor (Abb. 3.17 Spur 1+2). Zudem zeigt sich eine weitere PrP-Bande bei etwa 14 kDa, die bei rekombinantem PrP häufig vorkommt und dessen Zusammensetzung nicht eindeutig geklärt ist. Da dieses PrP aber vom Antikörper 3F4 erkannt wird, kann es zumindest nicht N-terminal verkürzt sein. Andere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der C-Terminus allerdings ebenfalls nicht degradiert ist. Eine dritte dünnere Gelbande zeigt sich bei 32 kDa und besteht wahrscheinlich aus bereits vorhandenen PrP-Dimeren, die offensichtlich auch ohne Crosslinker kovalent verknüpft sind. Auch in Gegenwart von S52 ist diese Dimerbande zu sehen (Spur 2). Das Peptid S52 mit 12 Aminosäuren und etwa 2 kDa läuft in diesem Gelsystem in der Lauffront und ist nicht als Bande

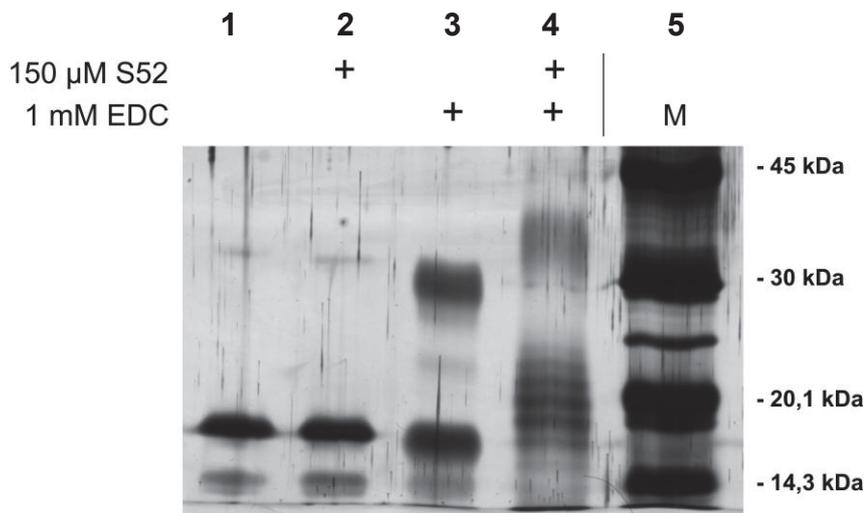


Abb. 3.17: Silbergefärbtes SDS-Gel von PrP mit S52 bei 0,05 % SDS

PrP inkubiert mit und ohne den Crosslinker EDC und/oder dem Peptid S52. M = Längenmarker.

erkennbar. Ohne Crosslinker ist die nicht-kovalente Bindung von S52 an PrP im denaturierenden Gel erwartungsgemäß nicht zu sehen.

Ist im Reaktionsansatz PrP und der Crosslinker EDC enthalten, nimmt die PrP-Dimerbande deutlich an Intensität zu (Spur 3). Die PrP-Moleküle werden durch den Crosslinker intermolekular verknüpft und somit zusätzliche Dimere gebildet. Etwa ein Drittel bis die Hälfte des PrP liegt hier in Form von Dimeren vor. Da diese Bande im Gel deutlich verbreitert ist, lässt sich vermuten, dass es sich hierbei nicht um eine einzige Spezies von Dimeren handelt, sondern um mehrere verschiedene. Diese können durchaus jeweils aus zwei PrP-Molekülen bestehen, durch verschiedene Verknüpfungsstellen und damit andere sterische Eigenschaften im Gel aber etwas unterschiedlich schnell laufen, so dass sie zusammen eine verbreiterte Gelbande ergeben. Der Ursprung und die Struktur der ohne EDC auftretenden Dimere in Spur 1 und 2 ist nicht bekannt. Sie zeigen jedoch eine geringere Mobilität als die durch das EDC erzeugten kovalenten Dimere.

Bei Zugabe des EDC verbreitert sich auch die Bande der PrP-Monomere (Spur 3). Wie bei den verknüpften Dimeren, wird die Bande nach unten hin breiter, das heißt die Mobilität eines Teils der PrP-Monomere ist erhöht. Werden die PrP-Moleküle durch das EDC intramolekular verknüpft, sind diese im denaturierten Zustand nicht mehr linear sondern etwas kompakter, wodurch es zu einer Erhöhung ihrer Mobilität im Gel kommen kommt.

Wird PrP zusammen mit EDC und S52 inkubiert, ist im Gel bei 16 kDa nur noch wenig freies monomeres PrP zu sehen (Spur 4). Die PrP-Monomere laufen durch die Bindung von einem oder mehreren S52 langsamer und bilden

mehrere Banden, je nach dem wo und wie viele S52 gebunden haben. Da hier offensichtlich mehrere S52 an ein PrP binden können, kann S52 demnach nicht nur an einer bestimmten Stelle an das PrP binden, sondern muss an mehreren unterschiedlichen Stellen gebunden sein. Damit ist anscheinend die Bindung des S52 nicht so spezifisch, wie es durch die Selektion beim Phage-Display zu erwarten gewesen war.

In Spur 4 ist auch eine Bindung von S52 an die unter diesen Bedingungen vorliegenden PrP-Dimere zu beobachten. Dimere mit und ohne S52, die durch EDC an die nicht verknüpft wurden, laufen in dem denaturierenden Gel als Monomere. Die Dimere laufen hier deutlich langsamer als ohne S52. Die Verzögerung im Gel lässt vermuten, dass auch hier meist mehrere S52 pro Dimer gebunden haben. Da schon an monomeres PrP mehrere S52 binden können, lässt sich beim Dimer ebenfalls davon ausgehen. Jedoch sind für die PrP-S52 Komplexe mit unterschiedlich vielen S52 in diesem Molekulargewichtsbereich kaum noch diskrete Banden auszumachen, da der Unterschied durch die Bindung eines S52 zu gering ist, um hier noch ausreichend aufgelöst zu werden. Zudem dürften die verschieden verknüpften Komplexe derart heterogen sein, dass sie keine diskreten oder dominierenden Banden bilden.

Insgesamt stellt sich durch die Ergebnisse des Crosslinkings nach wie vor die Frage, wie spezifisch die Bindung von S52 an PrP ist. Durch die hohe Peptidkonzentration könnten vielleicht bei der relativ schnell ablaufenden chemischen Reaktion des Crosslinkings auch kurzzeitig und unspezifisch gebundene Peptidmoleküle mit dem PrP verknüpft werden. Zwar sind in Spur 4 mit S52 und EDC nur noch wenig freie PrP-Monomere zu sehen, doch die spezifische Bindung nur eines S52 pro PrP lässt sich im Gel kaum erkennen. Vielmehr zeigen sich mehrere PrP-Banden für Monomere und Dimere, von denen mehrere etwa gleich stark sind. Diese repräsentieren vermutlich PrP mit unterschiedlich vielen kovalent gebundenen S52. Demnach hätten die meisten PrP-Moleküle mehr als ein S52 gebunden. Neben der Bindung mehrerer S52 an ein PrP an unterschiedlichen Stellen, wäre es auch denkbar, dass S52-Oligomere an das PrP binden. So zeigten andere Versuche mit S52 allein, dass der Crosslinker EDC wahrscheinlich auch S52-Moleküle miteinander verknüpfen kann (Daten nicht gezeigt).

Letztlich bleibt somit offen, ob überhaupt eine der im Gel sichtbaren Banden eine spezifische Bindung repräsentiert. Und da die potentielle Bindestelle des S52 am PrP nicht bekannt ist, kann nicht geklärt werden, ob diese potenzielle spezifische Bindung mittels dieses Crosslinkers überhaupt nachweisbar ist. So könnte die für die Verknüpfung durch EDC notwendigen Aminosäurereste von

S52 und PrP bei der spezifischen Bindung z.B. nicht in ausreichender Nähe sein.

3.5.2 Analyse der S52-Bindung an PrP mittels FCS

Bei der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) wird ein Laserstrahl in eine Lösung mit Fluorophoren fokussiert und die emittierte Fluoreszenzstrahlung mit einem konfokalen Lichtmikroskop detektiert. Durch eine Lochblende im Strahlengang erreicht dabei nur Licht aus der Schärfenebene des Mikroskops den Detektor. Liegt der Laserfokus in dieser Ebene, wird nur die Fluoreszenz aus einem sehr kleinen Volumenelement, in dem sich Laserstrahl und Schärfenebene schneiden, gemessen. In den folgenden Experimenten ist dieses Volumenelement etwa 0,66 fl groß. Im Idealfall ist während einer Messung nur ein Fluorophor im Fokus. Sind durchschnittlich mehrere im Fokus, kommt es durch diffusionsbedingte Schwankungen der Anzahl fluoreszierender Partikel im Fokus zu Schwankungen der Fluoreszenz. Aus diesen lässt sich durch das statistische Verfahren der Autokorrelation die Aufenthaltsdauer eines einzelnen Fluorophors im Fokus ermitteln. Aus dieser Aufenthaltsdauer oder Diffusionszeit lässt sich auf den Diffusionskoeffizienten und die Größe der fluoreszierenden Partikel schließen.

In Abb. 3.18 sind exemplarische jeweils die Autokorrelationskurven von 5 nM S52-OG488 in Natriumphosphatpuffer mit 0,04 % SDS (rot) und S52-OG488 in 0,04 % SDS mit zusätzlich 31 μ M PrP (schwarz) gezeigt. Der Bereich von τ unterhalb etwa 0,01 repräsentiert den Triplettanteil des Farbstoffs. Der sich links daran anschließende Teil beinhaltet bei den schwarzen Kurven zwei Übergänge für zwei Komponenten, bei den roten Kurven drei Übergänge für drei Komponenten. Diese Übergänge sind hier aber optisch nicht ersichtlich, erst der mathematische Fit der Korrelationsfunktion $G(\tau)$ liefert diese. Da die Kurven sich rein optisch bei ein, zwei oder drei Komponenten nicht unterscheiden, wurde im Folgenden auf deren Darstellung verzichtet.

Misst man mit dieser Methode fluoreszenzmarkiertes S52, so kann anhand der Diffusionszeiten unterschieden werden, ob dieses frei in Lösung oder gebunden an ein größeres und daher deutlich langsamer diffundierendes PrP vorliegt. Zunächst wurde hierfür die Diffusionszeit von S52 bestimmt, welches mit dem Fluoreszenzfarbstoff OregonGreen 488 (OG488) markiertem wurde. Um einen Effekt des Fluoreszenzfarbstoffes auf die Bindung an PrP möglichst gering zu halten wurde dem S52 C-terminal die Aminosäuren GGC als flexibler Spacer eingefügt, wobei die Cysteinseitenkette den Fluoreszenzfarbstoff OG488 trägt. Die Diffusionszeit dieses S52-OG488 liegt in Natriumphosphatpuffer und RT bei

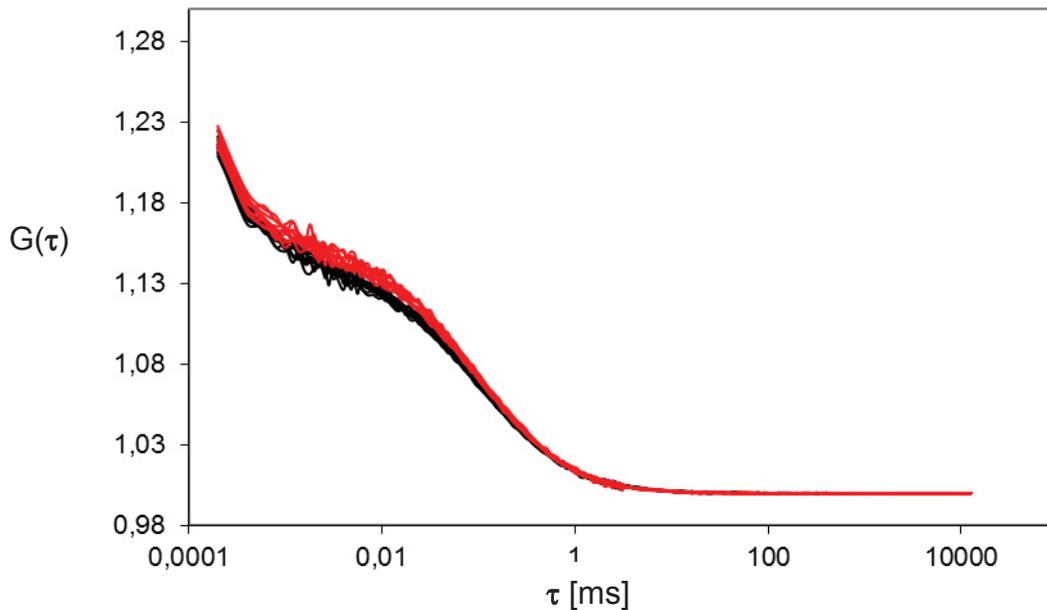


Abb. 3.18: Exemplarische Autokorrelationskurven für 2 und 3 Komponenten

Schwarz: 2 Komponenten: 5 nM S52-OG488 in Natriumphosphatpuffer mit 0,04 % SDS.

Rot: 3 Komponenten: S52-OG488 in 0,04 % SDS mit zusätzlich 31 μM PrP.

(jeweils 10 Einzelmessungen)

90 - 110 μs . Enthält der Puffer 0,1 % SDS oder mehr, ergibt die Korrelation eine Diffusionszeit von 190-210 μs . Da unter diesen Pufferbedingungen 0,1 % SDS über der kritischen mizellaren Konzentration (CMC) liegt, ist zu vermuten, dass die Erhöhung der Diffusionszeit durch eine Bindung von S52-OG488 an SDS-Mizellen zustande kommt. Die gleichen Messungen wurden auch als ein System mit zwei Komponenten ausgewertet, wobei sich Diffusionszeiten von 60 - 100 μs für die kleinere Komponente und 160 - 250 μs für die größere ergaben. Die kleinere Komponente dürfte in diesem Fall das freie S52-OG488 darstellen, die größere Komponente hingegen S52-OG488, welches an kleine SDS-Mizellen gebunden hat. Da die SDS-Mizellen in diesem System neben dem PrP eine zusätzliche Komponente darstellen, an die S52-OG488 binden kann und somit die Auswertung erschwert, wurden die weiteren Messungen unterhalb von 0,06 % SDS durchgeführt. Hier sollten bei der vorliegenden Salzkonzentration von 10 mM keine SDS-Mizellen vorhanden sein und PrP noch löslich in monomerer bzw. dimerer Form vorliegen. Anderenfalls wären für das S52-OG488 drei verschiedene Diffusionszeiten (frei, gebunden an Mizellen, gebunden am PrP) zu erwarten. Die Korrelation bzw. Auswertung eines Zweikomponentensystems ist jedoch deutlich einfacher als eines mit dreien, so dass eine dritte Komponente vermieden werden sollte.

$$\tau_D = \frac{\omega_1^2}{4 \cdot D} \quad D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r} \quad r = \sqrt[3]{\frac{M_r / N_A}{4 \cdot \pi \cdot \rho}}$$

daraus folgt: $\tau_D \sim D^{-1}$ $D \sim r^{-1}$ $r \sim \sqrt[3]{M_r}$
 und somit: $\tau_D \sim \sqrt[3]{M_r}$

Abb. 3.19: Herleitung von $\tau_D \sim \sqrt[3]{M_r}$ aus der Diffusionszeit τ_D , der Diffusionskonstante D und dem Radius des gemessenen Moleküls r

ω_1 = Molekülradius, Partikel k = Boltzmannkonstante, T = absolute Temperatur, η = Viskosität der Lösung, N_A = Avogadro-Zahl, ρ = mittlere Dichte des Moleküls, M_r = Molekulargewicht

Daran anschließend wurde die Diffusionszeit von PrP anhand von OG488-markiertem PrP bestimmt. Diese betrug je nach Messung 300 - 420 μ s und stimmt gut mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe überein (Pitschke, 1999). Die Diffusionszeit des PrP ist somit etwa drei bis viermal so lang, wie die des S52-OG488. Die Diffusionszeit des Komplexes von PrP und S52-OG488 sollte ebenfalls in diesem Bereich liegen. Die Diffusionszeit τ_D ist proportional zu dritten Wurzel des Molekulargewichts M_r (Abb. 3.19). Daher sollte der Unterschied zwischen dem 26,2 kDa großen PrP und dem nur um die 1,4 kDa des S52-OG488 größeren Komplex in der FCS keinen messbaren Unterschied zeigen bzw. vernachlässigbar klein sein.

Nachdem die Diffusionszeiten von PrP und S52-OG488 bekannt waren, wurden PrP und S52-OG488 zusammen gemessen. Hierbei wurden SDS-Konzentrationen von 0,025 % bis 0,05 % untersucht und jeweils 5 nM S52-OG488 und 31 μ M PrP eingesetzt. Eine höhere Konzentration des markierten Peptids konnte nicht eingesetzt werden, da diese eine zu hohe Fluoreszenz verursacht hätte, die vom Fluoreszenzspektrometer nicht mehr quantitativ hätte erfasst werden können. Einen Effekt des S52-OG488 in dieser Konzentration auf die Konversion von PrP ist nach den bisherigen Versuchen nicht zu erwarten gewesen und wurde hier auch nicht weiter untersucht, sondern lediglich die Bindung des S52-OG488 an PrP. Aufgrund der geringen Peptidkonzentration und der zu erwartenden nicht allzu starken Bindung musste, um möglichst viele Komplexe zu erhalten, das PrP in einem hohen Überschuss von 31 μ M (500 ng/ μ l) eingesetzt werden. In diesen Proben konnte jedoch bei 0,02 % bis 0,06 % SDS keine Bindung des S52-OG488 an PrP nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Geht man davon aus, dass bei dieser Methode ein Verhältnis von 9 zu 1 für freies S52-OG488 zu Komplex noch gut detektierbar ist, so lagen hier weniger als 0,5 nM Komplexe vor bzw. sind weniger als 0,5 nM des S52-OG488 an PrP gebunden. Aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt sich für die Bindung von S52-OG488 und PrP aus diesen Ergebnissen unter

diesen Bedingungen eine Dissoziationskonstante K_D von größer als 310 μM . Dies widerspricht der aus Abb. 3.3 abgeschätzten K_D von 100 μM für 0,02 % SDS. Wahrscheinlich entspricht die Gleichverteilung von PrP zwischen Überstand und Pellet nicht wie angenommen der Halbsättigung der Bindung. Die Ergebnisse zeigt, die Bindung des S52-OG488 an das PrP unter diesen Bedingungen wenn überhaupt nur sehr schwach ist, was aber mit den relativ hohen in den Löslichkeitsuntersuchungen benötigten S52-OG488-Konzentrationen im Einklang steht.

Nachdem auf diese Weise keine Bindung von S52-OG488 an PrP nachgewiesen werden konnte, wurden die Messungen unter den Bedingungen der Fibrillogenese mit 250 mM NaCl wiederholt. Da S52-OG488 einen deutlichen Effekt auf die Fibrillogenese von PrP zeigte, ist hier von einer stärkeren Interaktion der beiden auszugehen. Zunächst wurde wieder die Diffusionszeit des S52-OG488 bestimmt. Bei diesen Messungen zeigte sich jedoch, dass S52-OG488 hier in zwei unterschiedlichen schnell diffundierenden Zuständen in der Lösung vorkommt. Bei der Auswertung ergab ein Zwei-Komponenten-System die besten Fits der Korrelationskurven. Ein Ein-Komponenten-System hingegen war mit den gemessenen Kurven deutlich schlechter in Übereinstimmung zu bringen. Die Messungen zeigten eine Komponente mit einer Diffusionszeit von etwa 70 μs und eine mit etwa 200 μs (Tab. 3.1) und somit ähnlich Werte wie in Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % SDS ohne NaCl ermittelt wurden. Auch in dem hier verwendeten Natriumphosphatpuffer ist durch die 250 mM NaCl die CMC von SDS überschritten, so dass ähnliche Diffusionszeiten zu erwarten waren. Die Komponente mit der höheren Diffusionszeit τ_2 kann wiederum als an SDS-Mizellen gebundenes S52-OG488

Tabelle 3.1: Diffusionszeiten von S52-OG488 bei 250 mM NaCl

τ_1, τ_2 = unterschiedliche Diffusionszeiten von S52-OG488, SD = Standardabweichung,
n = Anzahl der Messungen

SDS [%]	τ_1 [μs] (SD)	Anteil [%] (SD)	τ_2 [μs] (SD)	Anteil [%] (SD)	n
0,03	71 (19)	47 (17)	190 (59)	53 (17)	34
0,04	77 (38)	56 (18)	252 (84)	44 (18)	31
0,05	67 (20)	52 (18)	190 (85)	48 (18)	27
0,06	76 (15)	53 (20)	234 (67)	47 (20)	18

Tabelle 3.2: Diffusionszeiten von S52-OG488 bei 250 mM NaCl mit 6,2 μ M PrP

τ_1, τ_2, τ_3 = unterschiedliche Diffusionszeiten von S52-OG488, SD = Standardabweichung,
n = Anzahl der Messungen

SDS [%]	τ_1 [μ s] (SD)	Anteil [%] (SD)	τ_2 [μ s] (SD)	Anteil [%] (SD)	τ_3 [μ s] (SD)	Anteil [%] (SD)	n
0,03	70 (7)	57 (17)	176 (15)	26 (15)	367 (187)	17 (9)	21
0,04	100 (20)	55 (22)	240 (100)	45 (22)	-	-	8
0,05	60	52 (7)	175	37 (9)	334 (110)	11 (6)	17
0,06	88 (18)	69 (15)	-	-	389 (169)	31 (17)	29

gedeutet werden. Warum aber die kleinere Komponente hier eine kürzere Diffusionszeit aufweist als die 90-110 μ s bei Bedingungen ohne NaCl, konnte nicht geklärt werden. Da es sich hierbei aber nur um Kontrollen bzw. Kalibrierungen für die weiteren Versuche handelt, wurde dieses Phänomen aber nicht weiter verfolgt.

Die Messungen der Proben mit PrP wurden als Zwei- und Drei-Komponentensystem ausgewertet. Die Messungen bei 0,03 % und 0,05 % SDS zeigen zusätzlich zu den zwei Komponenten der Kontrollen noch eine dritte im Bereich von 300 - 400 μ s, welches der Diffusionszeit des PrP entspricht (Tab 3.2). Diese Komponente hat einen Anteil an den fluoreszierenden Partikeln von etwa 10 %. Demnach ist jedes zehnte S52-OG488 an ein PrP gebunden, und ergibt unter diesen Pufferbedingungen rechnerisch eine K_D von 55 μ M. Die Messungen und Auswertungen sind jedoch mit so großen Standardabweichungen behaftet, so dass mehr als qualitative Aussagen nicht sinnvoll sind. Es lässt sich aber festhalten, dass bei 0,03 % und 0,05 % SDS S52 an PrP bindet.

Die Messungen bei 0,04 % und 0,06 % SDS hingegen konnten nicht als Drei-Komponentensystem gefittet werden bzw. keine dritte Komponente gefunden werden, so dass hier nur die Ergebnisse des Fits für zwei Komponenten dargestellt sind. Während bei 0,04 % SDS keine dritte Komponente im Bereich für PrP gefunden werden konnte, ergaben sich bei 0,06 % SDS zwar ebenfalls nur zwei Diffusionszeiten, die größere zeigt jedoch im Vergleich zur Kontrolle ohne PrP einen deutlichen Anstieg. Diese ähnelt daher der dritten Komponente der beiden anderen Proben. Dies spricht dafür, dass auch hier S52-OG488 an PrP gebunden hat.

Die FCS-Messungen konnten somit nicht für alle SDS-Konzentrationen eine Bindung von S52-OG488 an PrP nachweisen. Für 0,03 %, 0,05 % und 0,04 % SDS spricht jedoch vieles dafür. Die Standardabweichungen für τ_3 sind zwar relativ groß und lassen dadurch die ermittelten Werte zweifelhaft erscheinen. Doch bei keiner Kontrolle aller im Laufe dieser Arbeit durchgeführten Messungen, ließ der sich eine dritte Komponente oder eine mit einer Diffusionszeit in der Größe des PrP fitten. Auch bei intensiver Variation der Auswertungsparameter war dies der Fall. Nur in Proben mit PrP und fluoreszenzmarkiertem S52 konnte diese festgestellt werden, wenn auch nicht in allen Ansätzen. Daher belegen die hier gezeigten Ergebnisse durchaus eine Bindung von S52-OG488 an PrP. Zwar ist das S52-OG488 drei Aminosäuren länger als das S52 und trägt zusätzlich eine Fluoreszenzfarbstoff, das Design von S52-OG488 lässt aber darauf schließen, dass die beobachtete Bindung an PrP auch auf das unmarkierte S52 übertragbar ist.

3.5.3 Abschätzung der Dissoziationskonstante für S52 und PrP-Monomere durch Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

Mittel der FCS können auch nicht kovalent gebundene Komplexe gemessen werden, vorausgesetzt die Lebensdauer der Komplexe ist deutlich größer als die Diffusionszeit durch das Volumenelement. Durch die Bestimmung der Komplexkonzentration kann die Bindekonstante bzw. die Dissoziationskonstante K_D bestimmt werden.

Die Messungen mit 5 nM S52-OG488 und 31 μ M PrP ergaben eine Diffusionszeit von ca. 350 μ s für die S52-PrP-Komplexe mit einem Anteil von etwa 10 % an dem gesamten S52-OG488, d.h. 0,5 nM Komplexe. Häufig zeigte sich bei den Einzelmessungen der Proben eine sehr breite Streuung der Diffusionszeiten und der prozentualen Anteile, so dass daraus letztendlich relativ hohe Standardabweichungen resultierten. Oft kam es zu Standardabweichungen, die größer waren als die ermittelten Komplexanteile des S52-OG488. Solche Ergebnisse wurden prinzipiell nicht als Bindung gewertet. Ein weiteres Problem bei der Auswertung war, dass schon S52-OG488 in Puffer mit SDS allein bereits zwei Diffusionszeiten aufweist. Während S52-OG488 in Natriumphosphatpuffer ohne SDS eine Diffusionszeit von 120 μ s zeigt, weist es mit SDS eine größere und eine kleinere auf. Die größere mit etwa 190 - 250 μ s könnte durch die Bindung an kleine SDS-Mizellen erklärt werden. Die kritische mizellare Konzentration (CMC) wurde in Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, liegt aber laut Literatur bei 250 mM NaCl bei etwa 0,03 % SDS bzw. etwas

etwas darunter (Umlong & Ismail, 2007; Newbery, 1979; Dutkeiwiecz & Jakubowska, 2002) und ist hier damit in allen Proben überschritten. Hierbei sind sogar noch nicht die zusätzlichen etwa 15 mM Na⁺ des Natriumphosphatpuffers berücksichtigt, ebenso wenig wie, dass durch den Laser die Temperatur der Lösung deutlich über 25 °C gelegen haben dürfte. Beides verringert eher die CMC, so dass die tatsächliche CMC sogar noch niedriger gewesen sein dürfte. In den Proben mit PrP (6,2 µM) könnte jedoch durch dessen Bindung von SDS, die freie SDS-Konzentration soweit verringert worden sein, dass sie wiederum unterhalb der CMC gelegen haben könnte, so dass hier keine SDS-Mizellen existierten. Zumindes bei der Probe mit 0,03 % SDS wäre dies durchaus denkbar. Da aber bei allen Proben (Tab. 3.2) die gleichen Diffusionszeiten wie in den Kontrollen (Tab. 3.1) gemessen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass dies nicht der Fall war und auch bei 0,03 % SDS die CMC überschritten war.

Die kürzere Diffusionszeit von ca. 70 µs ist schwerer erklärbar, da nicht ersichtlich ist, wie S52-OG488 durch das Vorhandensein von SDS schneller diffundieren könnte. Eine Viskositätsänderung kann diese große Änderung der Diffusionszeit nicht bewirken. Die gemessene Diffusionszeit von 70 µs liegt im Bereich von freien Farbstoffmolekülen mit einem Molekulargewicht von ca. 500 Dalton, welche bei Kalibrierungsmessungen Diffusionszeiten von 60 - 80 µs ergaben. Da die gemessenen Diffusionszeiten von freien Farbstoffmolekülen aber ebenfalls durchgängig über den berechneten Werten lagen (Daten nicht gezeigt), kommen beide Diffusionszeiten von S52-OG488, 70 µs mit SDS und 120 µs ohne SDS, für monomeres S52 in Betracht. Die 70 µs sind aber auch nahe an der theoretischen Diffusionszeit für S52-OG488 von 53 µs, welche aus dem Molekulargewicht des fluoreszenzmarkierten S52-OG488 (1920 Dalton) für ein annähernd globuläres Molekül grob genähert wurde. Aufgrund der vermutlich länglichen Struktur des S52-OG488 ist aber mit einer längeren Diffusionszeit als diesen 53 µs zu rechnen.

Es stellt sich daher die Frage, ob SDS die Diffusionszeit von S52-OG488 eher verringern oder erhöhen kann. Möglich wäre eine Veränderung der Struktur des S52-OG488. Doch mit SDS dürfte diese eher größer und weniger kompakt sein und somit zu längeren Diffusionszeiten führen anstatt zu einer kürzeren. Andererseits wäre auch denkbar, dass S52-OG488 ohne SDS nicht als Monomer sondern als Oligomer vorliegt, welche mit SDS nicht mehr stabil sind. Da sich mit SDS die Diffusionszeit von S52-OG488 aber fast halbiert, müssten die S52-OG488-Partikel etwa um den Faktor 8 kleiner geworden sein und somit im S52-OG488-Oligomer etwa acht S52-OG488-Moleküle vorhanden gewesen sein. Eine derartigen Oligomerisierung mit einer relativ diskreten Anzahl von

S52-OG488 pro Oligomer, wie sie dann durch die Korrelationsfunktion nahegelegt wird, erscheint jedoch unwahrscheinlich. Andererseits zeigte auch das Crosslinking von S52 ohne SDS einige Oligomere, jedoch mit unterschiedlich vielen S52-Molekülen. Hierbei ist jedoch nicht klar, ob beim Crosslinking tatsächlich alle S52 eines Oligomers miteinander verknüpft werden konnten, so dass deren Größe im Crosslinker-Gel nicht denen in Lösung entsprochen haben muss.

Es lässt sich daher nicht abschließend klären, welche der gemessenen Diffusionszeiten das monomere S52-OG488 darstellt. Die Aufspaltung der Diffusionszeit von S52-OG488 in Gegenwart von SDS von 120 μs nach 70 und 250 μs bleibt somit ungeklärt. Das Phänomen war aber dauerhaft reproduzierbar, so dass diese Werte als Kalibrierung für Bindestudien mit PrP dienen konnten. Das Vorhandensein von zwei S52-OG488-Diffusionszeiten verhinderte die weitere Auswertung nicht. Es musste jedoch in Proben mit PrP und SDS nun drei Komponenten wieder gefunden werden, um den Komplexanteil zu bestimmen. Da die Auswertungssoftware bis zu drei Komponenten in die Korrelationskurven fitten konnte, blieb für die gesuchten PrP-S52-OG488-Komplexe nur aber noch eine freie fitbare Komponente übrig. Dadurch war es nicht möglich, eventuell unterschiedliche Komplexe, z.B. mit PrP-Dimeren, zusätzlich zu identifizieren.

Bei den FCS-Messungen mit PrP konnte bei 0,03 % und 0,05 % SDS eine Bindung von S52-OG488 an PrP festgestellt werden. Die beiden Diffusionszeiten τ_1 und τ_2 der Kontrollen sind hier vorhanden sowie eine zusätzliche Komponente mit der Diffusionszeit τ_3 des PrP von 300 - 400 μs . Bei 0,04 % SDS hingegen konnte keine dritte Diffusionszeit identifiziert werden. Generell waren die Messungen bei 0,04 % oft schwer auswertbar, weswegen hier nur acht verwendet werden konnten. Häufig wurden bei diesen Proben nur schwache Korrelationen in den Fluoreszenzfluktuationen gefunden, bzw. die Einzelmessungen lieferten stark unterschiedliche Ergebnisse. Dies deutet darauf hin, dass die Diffusionszeiten des S52-OG488 hier offenbar sehr heterogen sind. 0,04 % SDS ist genau im Übergangsbereich der Konversion von PrP. Das PrP liegt hier teilweise als unlösliche Aggregate vor (vgl. Abb. 3.8). Da ein Großteil aber noch löslich ist, sind auch noch Monomere, Dimere und lösliche Oligomere vorhanden. Möglicherweise sind dadurch die Diffusionszeiten der PrP-Partikel derart heterogen, dass sie nicht korrelieren und die Proben nur die Diffusionszeiten des S52-OG488 aus den Kontrollen zeigen. Bei 0,03 % SDS wären dementsprechend keine Oligomere mehr vorhanden und die PrP-Aggregate bereits so groß, dass ihre Diffusion zu

langsam ist, um als Komplex mit S52-OG488 beobachtet zu werden. Hier würden nur noch die Komplexe von S52-OG488 mit eventuell noch vorhandenen PrP-Monomeren detektiert, so dass sich, wie beobachtet, mit 0,03 % SDS drei Komponenten ergeben. Daher ist bei 0,03 % SDS gut eine Bindung zu erkennen.

Bei 0,06 % wurden ebenfalls nur zwei Komponenten gefunden. Hier wurde zwar die größere Diffusionszeit τ_2 der Kontrolle nicht wiedergefunden, wohl aber die des PrP, was für eine Bindung des S52-OG488 spricht. Die genaue Ursache für das Ausbleiben der längeren Diffusionszeit der Kontrolle konnte nicht festgestellt werden. Sollte die größere Diffusionszeit der Kontrollen aber tatsächlich S52-OG488-Oligomere darstellen, wäre denkbar, dass diese bei 0,06 % SDS durch dieses aufgelöst werden. Dafür spricht die relative Zunahme der kleineren Komponente von 53 % auf 69 %. Der Anteil des an PrP gebundenen S52-OG488 liegt mit 31 % deutlich höher als bei den anderen SDS-Konzentrationen. Dies kann man darauf zurückführen, dass hier nun mehr monomeres PrP vorliegt und somit auch mehr Komplexe mit den Monomeren gebildet werden.

Durch die höhere SDS-Konzentration, kompetiert zwar mehr SDS mit S52-OG488 um die Bindung an PrP als bei geringerer Konzentration. Offenbar liegt hier aber so viel mehr monomeres PrP vor, dass diese mögliche Konkurrenz des SDS mehr als kompensiert wird.

Aus den Anteilen der PrP-S52-OG488-Komplexe lassen sich die Dissoziationskonstanten K_D berechnen (Tab. 3.3). Die zugrundeliegenden Komplexkonzentrationen weisen jedoch eine Standardabweichung von relativen 50 % auf, so dass diese bestimmten K_D -Werte nur die Größenordnung im mikromolaren Bereich zeigen. Die K_D -Werte passen gut den aus Abb. 3.3 bestimmten K_D von 100 μM bei 0,02 % SDS, obwohl diese für Bedingungen ohne NaCl und für unmarkiertes S52 gilt. Die zusätzlichen Aminosäuren des S52-OG488 und der Farbstoff scheinen daher die Bindung an PrP nicht

Tabelle 3.3: Bindekonstanten von S52-OG488 an PrP in Natriumphosphatpuffer mit 250 mM NaCl bei verschiedenen SDS-Konzentrationen

SDS	K_D [μM]
0,03 %	30
0,05 %	50
0,06 %	14

besonders zu beeinflussen. S52-OG488 scheint zudem in Gegenwart von 250 mM NaCl etwas besser zu binden als ohne NaCl. Dies ist wäre durchaus plausibel, da S52 in Gegenwart von 140 mM NaCl gegen PrP selektiert wurde.

3.5.4 PrP-Isoformspezifität der S52-Bindung

S52 bindet nach den Ergebnissen aus der FCS in Natriumphosphatpuffer bei 0,03 %, 0,05 % und 0,06 % SDS an PrP. Bei 0,05 % SDS ist PrP noch gut löslich, teilweise kommt es aufgrund der hohen PrP-Konzentration aber schon zu einem Strukturwechsel zu mehr β -Faltblattanteilen (vgl. Abb. 3.9 A). Bei 0,03 % ist PrP nur noch teilweise löslich und die Struktur besteht überwiegend aus β -Faltblatt. Dass S52 zudem Aggregate und Fibrillen zumindest teilweise wieder auflösen kann, lässt vermuten, dass es an die β -faltblattreiche Isoform des PrP binden könnte. Da bei den SDS-Konzentrationen die Konversion noch nicht vollständig und somit auch noch die native Isoform des PrP vorhanden war, kann jedoch nicht eindeutig auf eine Bindung an die β -faltblattreiche Isoform geschlossen werden.

Daher wurde noch mittels CD-Spektroskopie untersucht, welche Isoform des PrP in den Selektionspuffern des Phage Display vorgelegen hat. Diese waren PBST-Puffer pH 7,4 mit 0,1 % Tween, BSA und u.a. NaCl bzw. HBSST-Puffer pH 7,4 mit 0,5 % Tween, NaCl und K^+ , Mg^{2+} und Ca^+ (für Genaueres s. Kap. 2.6). Bei den CD-Messungen enthielten die Phage-Display-Puffer im Gegensatz zum Phage Display kein BSA, wie in Kap. 2.6 beschrieben, da das CD-Signal des BSA das des PrP überdeckt hätte. Beide beim Phage Display und CD-Spektroskopie verwendeten Selektionspuffer enthielten hohe Konzentrationen von Salzen insbesondere 140 mM Chloridionen, die ein erhöhtes Rauschen des CD-Signals verursachen und so eine Auswertung der Spektren erheblich erschweren. So zeigen die Spektren des PrP in dem Phage-Display-Puffer, der bei der Selektion von der Arbeitsgruppe von Prof. D. Willbold in Jülich verwendet wurde, ein starkes Rauschen (Abb. 3.20 A). Dies ist hier besonders störend, da bei diesen Messungen nur 10 ng/ μ l PrP bei einer optischen Weglänge von 1 cm eingesetzt werden konnten. Das Rauschen, das durch die lange Wegstrecke im Puffer verursacht wird, konnte auch durch die vermehrte Akkumulation von Einzelspektren nicht weiter verringert werden. Für Küvetten mit einer kürzeren Weglänge wäre ein deutlich größeres Probenvolumen mit höherer PrP-Konzentration notwendig gewesen. Die dafür erforderlichen Menge PrP stand jedoch nicht zur Verfügung.

Anhand der ermittelten Spektren lässt sich daher nur ansatzweise auf die Sekundärstruktur des PrP schließen. Das Minimum bei 211 nm in der Messung

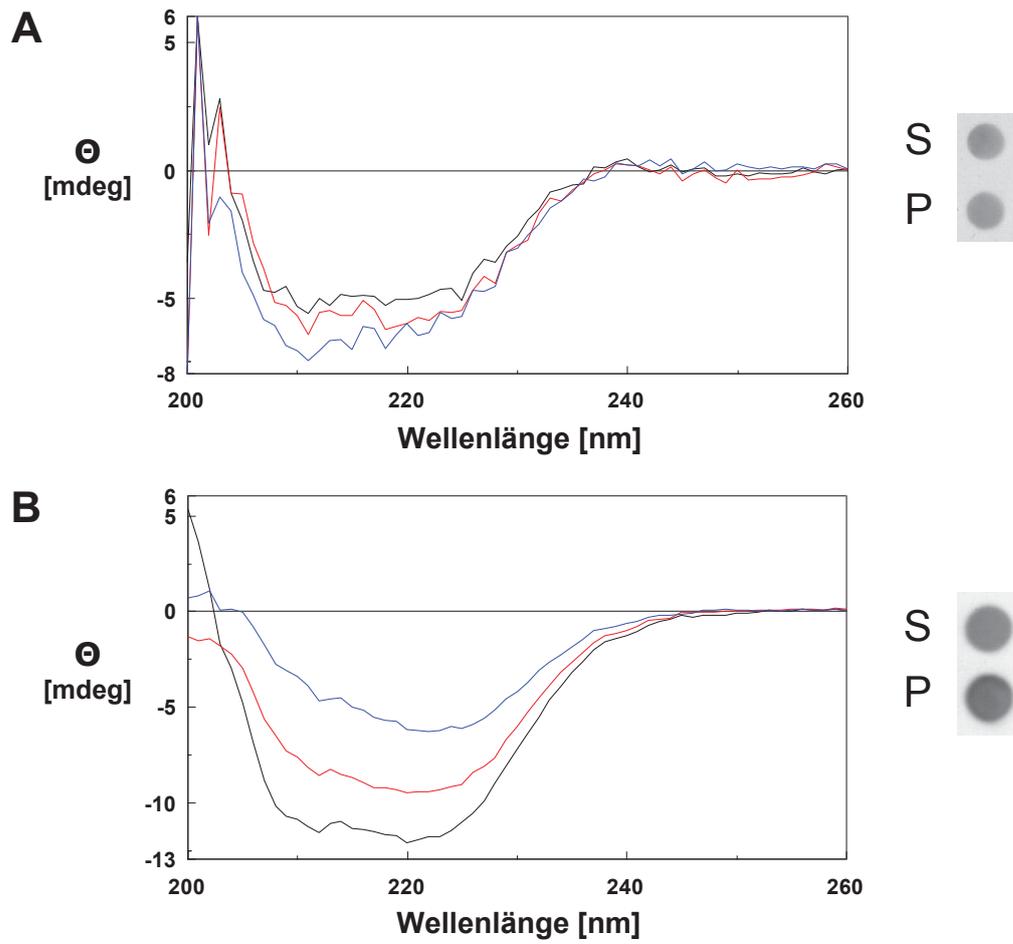


Abb. 3.20: CD-Spektren von PrP in den Selektionspuffern der Phage-Displays

Schwarze Spektren: nach 0 h, rot: nach 1 h, blau: nach 24 h. Die Dot Blots zeigen die Löslichkeit (nach 1 h Zentrifugation 100.000 g, S=Überstand, P=Pellet) des PrP nach 24 h. **A** in Selektionspuffer der Arbeitsgruppe Willbold. **B** in Selektionspuffer der Arbeitsgruppe Schachner.

nach 24 h könnte man jedoch als Strukturübergang von α -helikal (α -Helix: Minimum bei 207 nm) zu β -Faltblatt (Minimum bei 215 nm) interpretieren. Eine genaue Bestimmung der Sekundärstruktur von PrP ist hier insgesamt nicht möglich. Es lässt sich aber abschließend folgern, dass das PrP hier wahrscheinlich nur noch zum Teil in der α -helikalen Isoform vorlag.

Der Phage-Display-Puffer, der aus der Arbeitsgruppe von Prof. M. Schachner in Hamburg zur Selektion verwendet wurde, aus der auch das S52 stammte, zeigte in der CD-Spektroskopie weniger Hintergrundsignal und somit bessere PrP-Spektren (Abb. 3.20 B). Das PrP zeigt sofort nach der Zugabe in den Puffer ein β -faltblattstrukturiertes Spektrum mit Anteilen eines leicht aggregierten Proteins. Das kleine Minimum bei 212 nm ist eher als ein Messartefakt anzusehen. Die β -Struktur tritt nach 1 h und 24 h noch deutlicher hervor. Das

einzelne Minimum bei 222 nm und die starke Signalabnahme lassen auf eine Aggregation oder sogar Sedimentation des PrP schließen. Auch der Löslichkeitsbestimmung (Abb. 3.20 B) zeigt, dass das PrP hier nur noch etwa zur Hälfte löslich ist.

Um die Sekundärstrukturanteile des PrP genauer zu bestimmen, wurden die Spektren auch mittels spezieller Software analysiert. Die Auswertung mit dieser Software, die die Sekundärstrukturanteile aus den beiden Spektren berechnet, ergab aber keine eindeutigen Ergebnisse. Die meisten dieser Programme wie z.B. CDNN (Johnson, 1990) und Varselect (Greenfield, 1996) benötigen Spektren mit Wellenlängen ab 190 nm und derartige Messungen waren hier wegen der optischen Dichte der Puffer in dem Bereich unter 200 nm nicht möglich. Da sich die Spektren auch durch weitere Akkumulationen nicht verbessern ließen, reichte deren Qualität nicht aus, um mit der Software überzeugende Ergebnisse zu erhalten.

Da das PrP im Gegensatz zur CD-Messung während der Selektion nicht frei in Lösung vorlag, sondern an Mikrotiterplatten immobilisiert, könnte das PrP bei der Selektion anders strukturiert gewesen sein als hier. Folglich sind die Schlussfolgerungen aus den CD-Messungen nur bedingt auf das immobilisierte PrP übertragbar. Eine CD-Messung direkt an der Oberfläche ist jedoch nicht möglich. Man kann aber davon ausgehen, dass sich ein Großteil des PrP bei geringer SDS-Konzentration ebenso entfaltet, auch wenn es an der Oberfläche immobilisiert ist. Da freies PrP eine Strukturänderung vollzieht, sollte dies auch das immobilisierte PrP machen. Letzteres wird wahrscheinlich aufgrund der räumlichen Nähe eher noch mit anderen PrP-Molekülen interagieren, was die Konversion eher begünstigt oder beschleunigt. Nur eine Aggregation des immobilisierten PrP bei der Selektion kann ausgeschlossen werden, es sei denn, diese Aggregate hätten sich bereits vor der Immobilisierung gebildet.

Ausgehend vom Spektrum des PrPs im Selektionspuffer aus Hamburg lässt sich folgern, dass das aus der Selektion in Hamburg stammende Peptid S52 wahrscheinlich nicht an die α -Isoform bindet, sondern an eine β -Isoform des PrP. Alles in allem kann bei beiden Selektionsansätzen nicht davon ausgegangen werden, dass jeweils nur eine Isoform des PrP vorlag und dass alle selektierten Peptide nur an eine bestimmte Form des PrP binden können.

4 Diskussion

4.1 Peptid-Selektion mittels Phage Display

Ziel dieser Arbeit war es, die von den Kooperationspartnern in Jülich und Hamburg durch Phage Display identifizierten Peptide bezüglich ihrer Wirksamkeit im SDS-basierten *In-vitro*-Konversionssystem zu testen und so festzustellen, ob sie als Therapeutikum für Prionkrankheiten in Frage kommen. Ursprünglich war geplant, α -helikales PrP als Target für die Selektion einzusetzen. Die Bestimmung der Sekundärstruktur des beim Phage Display immobilisierten PrP war jedoch nicht möglich. Auch die nachträgliche Bestimmung der Sekundärstrukturanteile von freiem PrP in den entsprechenden Selektionspuffern durch CD-Spektroskopie lieferte keine eindeutigen Ergebnisse. Die Messungen zeigen aber, dass das PrP wahrscheinlich nicht mehr komplett in seiner α -helikalen Isoform vorgelegen hat (Kap. 3.5.4). S52 könnte somit an α -helikales PrP oder auch an ein relativ frühes Intermediat des Konversionsprozesses binden. In der Tat wäre es sogar von Vorteil, wenn S52 nicht an die α -helikale Isoform sondern ein frühes β -Intermediat bindet, da es so die zelluläre Funktion des PrP nicht beeinträchtigen kann. Und die Bindung an ein Intermediat wäre auch günstig für die Reversion von der pathologischen Isoform.

S52 wurde, wie die meisten anderen getesteten Peptide, in Jülich gegen rekombinantes PrP selektiert. Dadurch ist gewährleistet, dass das Peptid direkt an das Protein bindet und nicht an eine Modifizierung wie den GPI-Anker oder die Glykosylierungen von eukaryotischem PrP. Gerade die unterschiedlichen Glykosylierungen der einzelnen PrP-Moleküle wären bei der Selektion von Nachteil, da so auch Peptide identifiziert werden können, die nur an die Glykosylierungen binden. Als Folge könnten die so selektierten Peptide nur PrP-Moleküle mit ähnlicher Glykosylierung binden, jedoch nicht die unglykosylierte Form des natürlichen PrP. Ebenfalls störend wäre, dass diese Peptide vielleicht sogar andere Proteine binden könnten, die keine Sequenzähnlichkeit zu PrP hätten sondern nur eine ähnliche Glykosylierung besäßen. Die Interaktion mit anderen Targets könnte zu Nebenwirkungen führen, aber auch die freie Konzentration der therapeutischen Peptide *in vivo* deutlich senken.

4.2 Bindung von S52 an PrP-Monomer und Dimere

Nachdem die Sekundärstruktur des PrP in den verwendeten Selektionspuffern nicht genau bestimmt werden konnte, und somit auch nicht, an welche Isoform des PrP es *a priori* bindet, wurde mittels Crosslinking untersucht, ob S52 an die Monomere oder Dimere des PrP bindet. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen des Crosslinkings liegt PrP ohne Peptid im anschließenden SDS-PAGE etwa zur Hälfte als verknüpftes Dimer und zur Hälfte als Monomer vor. Dies entspricht früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe (Kaimann *et al.*, 2008). Der Crosslinker EDC bindet hierbei zunächst an eine Carboxylgruppe von Aspartat oder Glutamat. Diese wird dadurch aktiviert, das Zwischenprodukt ist jedoch sehr instabil. Befindet sich eine Aminogruppe in der räumlichen Nähe, wird diese mit der aktivierten Carboxylgruppe zu einer Amidbindung verknüpft und das verbrauchte EDC wird freigesetzt. Ist keine Aminogruppe in der Nähe, zerfällt das Zwischenprodukt wieder. Das EDC wird wieder abgespalten und die Carboxylgruppe des Proteins bleibt unverändert. Sind beide Gruppen nahe genug, verknüpft EDC Amino- und Carboxylgruppe direkt miteinander ohne einen Spacer einzufügen. So werden hauptsächlich Gruppen verknüpft, die bereits vorher Teil einer nicht-kovalenten Bindung oder zumindest in unmittelbarer Nähe waren. Daher kann geschlossen werden, dass miteinander verknüpftes PrP und S52 bereits vorher nicht-kovalent aneinander gebunden waren.

Im denaturierenden Gel (Abb. 3.14) ist auch ohne Crosslinker eine leichte Dimerbande zu erkennen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass deren PrP-Moleküle kovalent aneinander gebunden sind. Dieses Phänomen ist bereits vorher für das SDS-Konversionssystem beschrieben worden (Jansen *et al.*, 2001). Auch andere Arbeitsgruppen fanden kovalente PrP-Dimere in aufgereinigtem ShaPrP^C aus murinen Neuroblastomazellen (Priola *et al.*, 1995). Die Herkunft dieser offenbar kovalent verknüpften Dimere ist bisher nicht geklärt, so dass offen bleibt, ob diese tatsächlich *in vivo* existieren oder es sich bei diesen um ein Artefakt der Aufreinigung handelt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei 0,05 % SDS das S52 mehrfach sowohl an PrP-Monomere als auch an die EDC-verknüpften PrP-Dimere bindet. Die im Gel detektierten Monomere und Dimere spiegeln aber nicht genau die Situation vorher in Lösung wider. Die Bindung von S52 an nicht-kovalente PrP-Dimere ist im denaturierenden SDS-PAGE nicht zu sehen, bzw. diese erscheinen hier ebenfalls als Monomere. So ist es durchaus möglich, dass diese nativ nicht als Mono- oder Dimere vorlagen, sondern Teile höherer nicht-kovalenter Aggregate waren. Unsere Arbeitsgruppe konnte aber

bereits zeigen, dass dies bei 0,05 % SDS nicht der Fall ist (Jansen *et al.*, 2001). Die gezeigte Mehrfachbindung von S52 an PrP-Monomere und Dimere kann zwar nicht genau erklärt werden, es zeigt jedoch, dass S52 an die α -Isoform von PrP bindet, da beide unter diesen Bedingungen α -helikal strukturiert sind (Kaimann, 2006). Die Sekundärstrukturelemente des Monomers, dessen genaue Struktur aus NMR-Untersuchungen bekannt ist (Liu *et al.*, 1999), und die des Dimers sind diesem Modell nach identisch (Kaimann *et al.*, 2008). Die Dimere werden entweder durch Domain-Swapping gebildet, indem der N-Terminus im Dimer jeweils zum anderen PrP-Molekül herübergeklappt ist (Kaimann, 2006), oder dadurch, dass sich der N-Terminus (90-124) jeweils an die globuläre Domäne (125-231) des gleichen PrP-Moleküls anlagert (Kaimann *et al.*, 2008). Auch andere Arbeitsgruppen postulieren eine ähnliches PrP-Dimer durch Domain-Swapping (Hafner-Bratkovic *et al.*, 2010). In beiden Modellen ist der N-Terminus nicht flexibel, sondern hat eine genauer definierte Struktur als im Monomer, was durch molekular-dynamische Untersuchungen unterstützt wird. Damit haben Monomer und Dimer auch annähernd die gleiche molekulare Oberfläche. Dies erklärt, warum S52 beide gleich gut binden kann. Die Bindung an größere und β -strukturierte PrP-Oligomere oder Aggregate konnte mit den zur Verfügung stehenden Methoden in diesem System nicht untersucht werden, da hierfür die Auflösung des Gelsystems und des FCS ungeeignet sind. Die Aggregate haben keine einheitliche Größe und erzeugen somit bei der FCS keine einheitliche Diffusionszeit. Zwar könnten einzelne Aggregate mit vielen gebundenen S52-OG488 als stark fluoreszierende Partikel erkannt werden, diese konnten jedoch nur vereinzelt und nicht reproduzierbar detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ob S52 auch an β -faltblattstrukturiertes PrP binden kann, bleibt hiernach somit offen.

Die bei den Crosslinks verknüpften Dimere bei 0,05 % SDS ohne NaCl sind vermutlich Intermediate im Konversionsprozess von monomerem PrP hin zu amorphen Aggregaten, nicht aber der Fibrillogenese. Diese Dimere weisen jedoch eine große Ähnlichkeit zu den intermediären Dimeren der Fibrillogenese auf (Kaimann, 2006, Stöhr *et al.*, 2008). Eine Bindung von S52 an die Dimere der Fibrillogenese wurde im Rahmen dieser Arbeit zwar nicht untersucht, es kann aber aufgrund der Ähnlichkeit beider Dimere vermutet werden, dass S52 diese ebenfalls binden kann und auf diese Weise die Fibrillogenese von PrP inhibiert (Kap. 3.4). Ein möglicher Mechanismus, wie S52 durch seine Bindung die Konversion von PrP inhibieren könnte, wird in 4.4 diskutiert.

Zusammengefasst ist das Crosslinking kein endgültiger Nachweis einer Bindung von S52 an PrP. Besonders die Mehrfachbindung ließe auch eine unspezifische Bindung als Schlussfolgerung zu. So zeigt 150 μM S52 allein teilweise eine Oligomerisierung, wenn es mit dem Crosslinker EDC inkubiert wird. Ob nun die S52-Oligomere an PrP binden oder mehrere S52-Monomere, ist daher nicht geklärt. Auch andere der im Laufe dieser Arbeit untersuchten Peptide werden bei 150 μM durch EDC teilweise miteinander verknüpft. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hohe Peptidkonzentration zu vermehrt unspezifischen Bindungen untereinander und an PrP führt, die dann durch den Crosslinker fixiert werden. Eine Kontrolle hierfür wären es, weitere Proteine mit S52 und dem Crosslinker EDC zu inkubieren. Träten hierbei gleich viele Verknüpfungen auf, wären die Bindungen an PrP als unspezifisch anzusehen. Andererseits zeigt in dem gleichen Crosslinking-System S52scr allein eine deutlich geringere Oligomerisierung als S52 und auch eine geringere Bindung an PrP (Daten nicht gezeigt), obwohl im S52scr die gleichen Aminosäuren als potentiellen Verknüpfungsstellen wie im S52 vorliegen. Dieser Unterschied spricht daher eher für eine spezifische Bindung von S52 an PrP.

4.3 S52 inhibiert die Konversion von PrP

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass S52 die Konversion von PrP verhindern kann. S52 verzögert die Umfaltung der Sekundärstruktur von der überwiegend α -helikalen Isoform zu einer mit vermehrt β -Faltblatt. S52 verringert die Bildung unlöslicher PrP-Aggregate und kann sogar bereits gebildete Aggregate teilweise wieder auflösen. Ob diese Aggregation und Strukturänderung ein Zwischenschritt bei der Bildung von infektiösen Prionen aus nativem PrP ist, konnte für das SDS-basierte *In-vitro*-Konversionssystem bisher aber nicht gezeigt werden.

Auf die Fibrillogenese von PrP zeigt S52 einen noch deutlicheren Effekt als auf die amorphe Aggregation. Messungen der ThT-Fluoreszenz und elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass S52 die Bildung von PrP-Fibrillen komplett verhindern kann. Über die ThT-Fluoreszenz konnte auch gezeigt werden, dass S52 vorhandene Fibrillen zu einem Teil wieder auflösen kann. Da zu diesen Proben aber keine EM-Aufnahmen vorliegen, kann man hier nicht unterscheiden, ob die Fibrillen verkürzt oder einzelne Fibrillen ganz aufgelöst wurden. Möglich wäre hier, dass S52 an die Fibrillen bindet, einzelne PrP-Monomere umfaltet und dadurch von den Fibrillen wieder ablöst. Oder die

Fibrillen stehen in einem Gleichgewicht mit den PrP-Monomeren und S52 verhindert durch Bindung an Fibrillen oder PrP-Monomere die Anlagerung neuer PrP-Monomere, nicht aber die Umfaltung der Monomere. Um dies zu klären, müsste aber noch untersucht werden, ob die Fibrillen tatsächlich in einem Gleichgewicht vorliegen und ob dieses schnell genug ist, um eine Reduktion der ThT-Fluoreszenz um etwa die Hälfte durch Inkubation mit S52 innerhalb von 24 Stunden (Abb. 3.16) erklären zu können.

Die PrP-Fibrillen sind näher mit Infektiosität assoziiert als amorphe Aggregate. Vor allem die Inhibition der Fibrillogenese von PrP durch S52 lässt deshalb auf einen möglichen therapeutischen Effekt auch *in vivo* hoffen. Zwar konnte für die hier gezeigten Fibrillen aus dem SDS-basierten *In-vitro*-Konversionssystem bisher noch keine Infektiosität nachgewiesen werden, das *In-vitro*-Konversionssystem wird in dieser Richtung aber noch weiterentwickelt. Und morphologisch sind die hier gezeigten Fibrillen den infektiösen synthetischen Fibrillen zumindest sehr ähnlich (Legname *et al.*, 2004) bzw. ähneln größtenteils mehr den infektiösen Fibrillen als den nicht infektiösen (vgl. Piro *et al.*, 2011). Die langen Inkubationszeiten nach der Inokulation von diesen synthetischen infektiösen Fibrillenfraktionen lassen zwar Zweifel daran aufkommen, ob gerade die darin zahlreich vorhandenen Fibrillen die Infektiosität tragen, das Auftreten dieser Fibrillen ist aber zumindest stark mit der Infektiosität verbunden. Die Fibrillen aus dem SDS-basierten *In-vitro*-Konversionssystem können daher ebenfalls als Indiz dafür genommen werden, dass hier die Art der Konversion von PrP der bei der Generierung von Infektiosität stark ähnelt.

Der Einfluss von S52 auf die Bildung von infektiösen Prionen wurde nicht untersucht, da das Protokoll zu deren Herstellung erst gegen Ende dieser Arbeit etabliert wurde. Die Assoziation von Fibrillen und Infektiosität, sowie die Ähnlichkeit der Fibrillen des SDS-basierten *In-vitro*-Konversionssystem mit den Fibrillen synthetischer Prionen legen aber nahe, dass S52 auch die Bildung von Infektiosität verhindern kann.

So vielversprechend die Inhibierung der PrP-Fibrillogenese auch erscheint, so besteht dennoch die Möglichkeit, dass es sich hier nur um einen unspezifischen Effekt handelt. Im Laufe dieser Arbeit kam es öfter vor, dass identische Fibrillogeneseansätze nicht zu Fibrillen führten. Die Fibrillogenese scheint daher leicht zu stören sein. Entweder könnten leichte Abweichungen der Pufferbedingungen oder minimale Verunreinigungen die Konversion von der Fibrillogenese hin zur amorphen Aggregation verschieben. Auch S52 könnte die Pufferbedingungen leicht verändern, so dass eine Fibrillogenese von PrP

verhindert wird. Ein Effekt von S52 über eine pH-Änderung ist unwahrscheinlich, dazu erscheint diese mit weniger als 0,1 bei 1 mM S52 zu gering (s. Kap. 3.5). Durch die Bindung von SDS an S52 könnte die freie SDS-Konzentration aber so weit verringert werden, dass dadurch die amorphe Aggregation des PrP gegenüber der Fibrillogenese begünstigt wird. Die Folge wäre auch eine Inhibition der Fibrillogenese, jedoch nur unspezifisch und nur unter diesen speziellen Pufferbedingungen.

Aus Untersuchungen der Bedingungen der SDS-PAGE ist bekannt, dass bei den 2 % SDS des Auftragspuffers (Kap. 2.2) ein Molekül SDS pro drei Aminosäuren eines Proteins bindet. Bei 150 μM S52 mit 12 Aminosäuren würde dies eine Verringerung der freien SDS-Konzentration um 600 μM bzw. 0,0175 % bedeuten und könnte dadurch eine schnelle amorphe Aggregation verursachen. Da im Konversionssystem die SDS-Konzentration aber um den Faktor 10 bis 100 unter der der SDS-PAGE liegen, ist das Bindungsverhältnis von 1:3 quantitativ aber so nicht übertragbar.

Ein anderer Hinweis, dass eine Wechselwirkung von S52 und SDS die Löslichkeit von PrP durchaus beeinflussen kann, lieferten Versuche mit höheren S52-Konzentrationen. Bei den Löslichkeitsbestimmungen war mit 500 μM S52 kaum noch ein die Löslichkeit erhöhender Effekt des S52 zu erkennen. Bei 1 mM S52 war PrP bei SDS-Konzentrationen, bei denen es ohne S52 noch komplett löslich ist, sogar teilweise im Pellet zu finden. S52 scheint daher tatsächlich mit dem PrP um SDS zu kompetieren und so die freie SDS-Konzentration zu verringern. Bei 1 mM führte dies dazu, dass die ansonsten löslichkeitserhöhende Wirkung des S52 nicht nur kompensiert und sogar in einen gegenteiligen Effekt umgewandelt wird.

Dies zeigt, dass S52 durch die Bindung von SDS auch einen die Löslichkeit verringernde Wirkung entfalten kann und über diesen SDS-Effekt die Fibrillogenese verhindern könnte. Durch die Absenkung der freien SDS-Konzentration, würde PrP schneller und dadurch amorph aggregieren und so eine Fibrillogenese verhindert. Diese Inhibition wäre aber nicht auf die Bedingungen *in vivo* übertragbar, sondern lediglich ein Artefakt im SDS-basierten *In-vitro*-Konversionssystem. In den Proben, bei denen S52 die Fibrillogenese verhindert hat, konnte jedoch eine verbesserte Löslichkeit von PrP gezeigt werden. Dies spricht gegen eine Begünstigung der amorphen Aggregation, schließt aber eine Aggregation von PrP hin zu vermehrt kleinen löslicheren Aggregaten allein nicht endgültig aus. Die zeitliche Verzögerung der Umfaltung von PrP zu vermehrt β -Faltblattanteilen durch S52 (Kap. 3.3.2) zeigt aber, dass S52 hier nicht über eine Verringerung der SDS-Konzentration und Beschleunigung der Aggregation wirken kann. S52 beschleunigt die

Aggregation nicht und verhindert so die langsamere Bildung von Fibrillen, sondern verzögert diese. Ein unspezifischer Effekt über die Veränderung der SDS-Konzentration erscheint daher äußerst unwahrscheinlich.

Um diesen möglichen Mechanismus aber endgültig ausschließen zu können, wäre ein PrP-Konversionssystem nötig, das keine die Löslichkeit erhöhende Zusätze benötigt. Dies ist aber beim verwendeten PrP 90-231 des Syrischen Goldhamsters nicht beschrieben, da es nur schlecht löslich ist und sehr leicht aggregiert. In Frage kämen noch PrP anderer Spezies, wie zum Beispiel der Maus, die *per se* besser löslich sind. Doch selbst bei diesem werden noch Zusätze wie Guanidiniumhydrochlorid oder 0,1 % Triton X-100 benötigt (Wang *et al.*, 2011).

4.4 Möglicher Mechanismus der Inhibierung der Konversion von PrP durch S52

Vergleicht man die einzelnen Ergebnisse von Zirkulardichroismus-Spektroskopie, Löslichkeitsbestimmungen und Fibrillogenese, lassen sich einige Schlüsse auf die Wirkmechanismus von S52 ziehen. Die Zirkulardichroismus-Spektroskopie zeigte nur eine Verzögerung der Strukturänderungen des PrP von der α -helikalen Isoform zu β -Faltblatt durch das S52 von wenigen Stunden. Diese kurze Verzögerung kann somit nicht für die deutlich länger anhaltende Verbesserung der Löslichkeit von PrP oder die Inhibierung der Fibrillogenese verantwortlich sein. Da die α -helikale Isoform des PrP durch S52 nur relativ kurz stabilisiert wird, kann die Stabilisierung der α -Struktur und Inhibierung der Aggregation nicht durch die Bindung von S52 an dieselben Sekundärstrukturelemente und einer daraus resultierenden Stabilisierung erklärt werden.

4.4.1 Modell der molekularen Klammer

Denkbar wäre aber eine Bindung von S52 über zwei oder mehrere α -Helix-Strukturelemente des PrP. S52 würde so als molekulare Klammer wirken (Abb. 4.1), ähnlich der Einfügung einer zusätzlichen Disulfidbrücke, durch die die Konversion verhindert werden kann (Hafner-Bratkovic *et al.*, 2010). Die Sekundärstrukturelemente könnten sich dann zwar einzeln umfalten, die Lage relativ zueinander könnte sich bei gebundenem S52 aber nicht ändern und die Tertiärstruktur würde weitestgehend erhalten bleiben. Geht man davon aus, dass sich bei der Konversion β -Faltblatt bildet und dieses aber aus mindestens

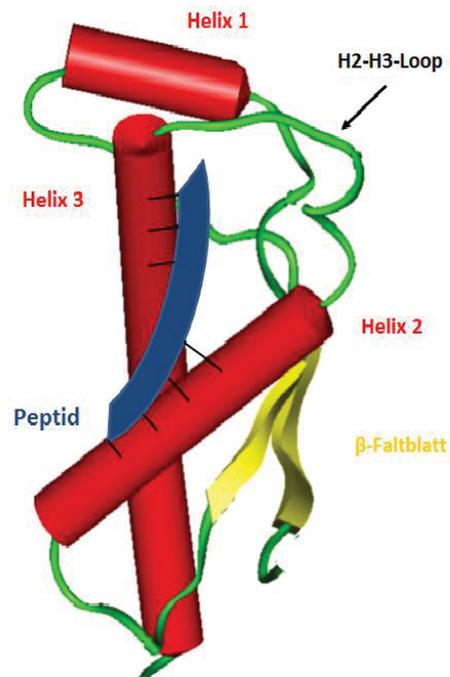


Abb. 4.1: Modell-Mechanismus einer molekularen Klammer

Das Peptid bindet an zwei α -Helix-Sekundärstrukturelemente des PrP und stabilisiert so deren Lage zueinander, so dass eine Umfaltung inhibiert wird. (verändert nach: Kaimann 2006)

zwei parallelen oder antiparallelen Strängen besteht, müssen hierfür aber einige der Subdomänen des PrP die Lage zueinander verändert haben (Kaimann 2006, Hafner-Bratkovic *et al.*, 2010). Dies widerspricht der Wirkung von S52 als molekulare Klammer und diese kann daher als äußerst unwahrscheinlich bezeichnet werden.

4.4.2 Modell der Loop-Stabilisierung

Eine andere Möglichkeit ist, dass durch die Bindung von S52 eine bestimmte Region des PrP stabilisiert wird, die für die Konversion zu Fibrillen besonders wichtig ist. Hierfür käme der Bereich der Aminosäuren 90-145 in Frage, der die zentrale hydrophobe Region (graue Aminosäuren, Abb. 4.2) bis zur Helix 1 umfasst und für die Konversion von zentraler Bedeutung zu sein scheint (Bennion *et al.*, 2004; Hafner-Bratkovic *et al.*, 2010). Diese Region wurde auch schon als mögliche Interaktionsstelle von PrP^C und PrP^{Sc} diskutiert (Kaneko *et al.*, 1997), spielt eine große Rolle bei der Speziesbarriere und enthält den Polymorphismus an Aminosäure 129, der die Anfälligkeit für Prionkrankheiten beeinflusst. Denaturierung von PrP mit Guanidiniumhydrochlorid zeigt, dass die Region 81-137 direkt mit Infektiosität assoziiert ist (Shindoh *et al.*, 2009). Auch

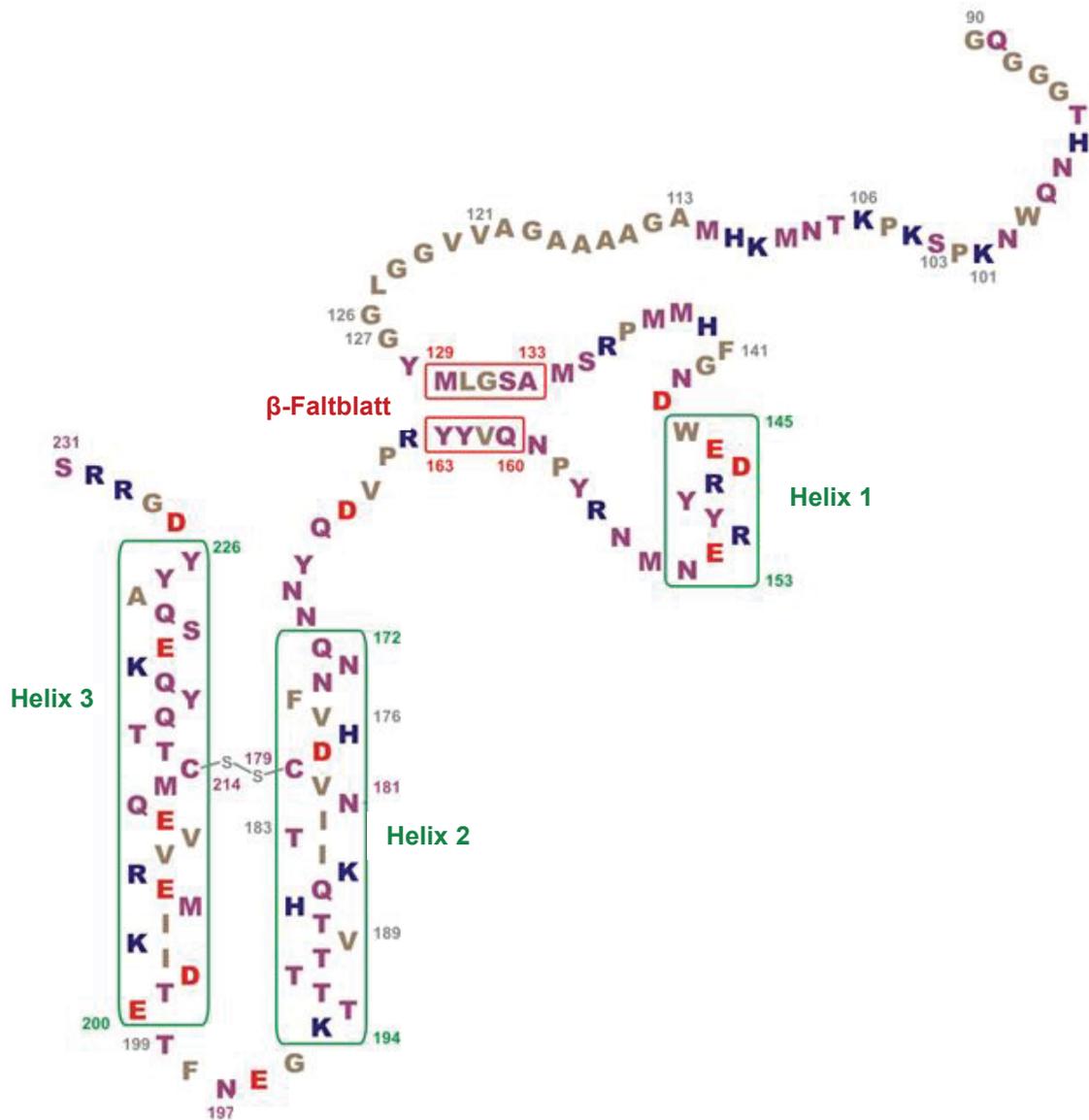


Abb. 4.2: Schema von PrP(90-231)

Roter Kasten: β -Faltblatt, grüne Kästen: α -Helices; Aminosäuren: grau = hydrophob, violett = polar, blau = basisch, rot = sauer.

neuere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die polybasische Region 100-109 zwar nicht für die Funktion als Konversionskeim, wohl aber für die Infektiosität von PrP^{Sc} *in vivo* nahezu essentiell ist (Miller *et al.*, 2011). Mittels HSQC-NMR konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 106-141 nicht im Kern der amyloiden Fibrillen liegen, sondern frei zugänglich sind (Tycko *et al.*, 2010). Diese Region ist zudem noch flexibel und dient als Aggregationspromotor (Kumar *et al.*, 2010). Antikörper oder Fab-Fragmente gegen diese Region verhindern die Replikation von PrP^{Sc} in neuronalen Zellkulturen (Peretz *et al.*, 2001). Dies alles weist auf eine zentrale Rolle der Aminosäuren 90-145 im pathogenen Konversionsprozess von PrP hin.

Es ist daher denkbar, dass S52 an die Region 90-145 bindet, die Interaktion der PrP-Moleküle untereinander und damit die Bildung größerer Aggregate verhindert. Dies würde erklären, warum sich mit S52 zwar die Sekundärstruktur des PrP ändert, es aber trotzdem besser löslicher bleibt. Durch die Blockierung der PrP-PrP-Interaktionsstellen, können sich keine geordneten Fibrillen bilden oder wachsen, da diese nicht mehr als Template für die PrP-Monomere fungieren können. Infolge dessen bildet PrP mehr Oligomere oder kleinerer Aggregate ohne geordnete Struktur, in denen die PrP-Moleküle unterschiedliche Sekundär- und Tertiärstrukturen aufweisen könnten.

Auch die Ergebnisse des Crosslinkings von PrP und S52 sind im Einklang mit diesem Modell. Das Peptid S52 (WGHKPSMAPMQS) enthält keine negativ geladenen Reste und mit dem Lysin an Position 4 nur einen positiven Rest. S52 kann daher durch EDC über dieses Lysin nur mit Glutamin- bzw. Asparaginsäureresten verknüpft werden, nicht aber mit basischen Resten. Im PrP sind Glutamat und Aspartat zwar nicht direkt in der zentralen hydrophoben Region zu finden, wohl aber direkt daran anschließend an den Positionen 144, 146, 147 und 152 der Helix 1 (rote Aminosäuren, Abb. 4.2) und somit noch im Bereich der möglichen PrP-PrP-Interaktionsstelle. Und S52 könnte diese PrP-PrP-Interaktion auch inhibieren, wenn es nur einen Teil der Bindestelle blockiert und die Bindung sterisch verhindert.

Da nach den bisherigen Ergebnissen S52 die Dimerisierung von PrP nicht beeinträchtigt, scheinen bei der Dimerisierung andere Regionen des PrP beteiligt zu sein als bei der S52-Bindung. Da S52 noch an diese Dimere binden kann und die Dimere Fibrillen bilden können, scheint auch die PrP-PrP-Interaktionsstelle für die Fibrillogenese im Dimer noch zugänglich zu sein. Diese PrP-PrP-Interaktionsstelle der Fibrillogenese wäre demnach nicht für die Dimerisierung verantwortlich, und wird durch die Bindung von S52 blockiert.

Eine weitere mögliche Bindestelle von S52 liegt in der globulären Domäne von PrP, genauer im Bereich der α -Helices 2 (172-194) und 3 (200-226) sowie dem Loop zwischen Helix 2 und zweiten β -Faltblattstrang (160-163). Diese globuläre Domäne unterliegt nach neueren Ergebnissen aus NMR und Röntgenstrukturuntersuchungen bei der Bildung von amyloiden Fibrillen bzw. PrP^{Sc} weitreichenden Umfaltungen (Wille et al., 2009; Cobb et al., 2007; Cobb et al., 2008). Neben dem vermehrten Anteil von β -Faltblatt, ändert sich auch die Exposition einiger Aminosäuren und Epitope. So sind die Aminosäuren Y128, Y225 und Y226 im nativen rekombinanten ShaPrP(90-231) gut zugänglich, im PrP27-30, dem PK-resistenten Kern von PrP^{Sc}, hingegen kaum. Umgekehrt ist die Region 149-164 des PrP27-30 und das Epitop YYR (AS 149-151) im PrP^{Sc}

zugänglicher als in der nativen Form (Gong *et al.*, 2011; Paramithiotis *et al.*, 2003). Darüber hinaus befinden sich 30 von 37 Punktmutationen im PrP, die familiäre Formen von Prionkrankheiten verursachen, in dieser globulären Domäne. Molekulardynamische Kalkulationen ergaben, dass die meisten dieser Mutationen die Struktur der Domäne nur wenig verändern, vor allem aber die Helix 3 destabilisieren (Rossetti *et al.*, 2011; Bae *et al.*, 2009) und der Loop zwischen Helix 2 und dem zweiten β -Faltblattstrang verändert ist (Meli *et al.*, 2011). Der Bereich um Helix 2 und 3 erscheint zudem hochgradig amyloidogen (Kuwata *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2007; Adrover *et al.*, 2010; Chakroun *et al.*, 2010; Tycko *et al.*, 2010). Demzufolge startet die Konversion von PrP mit der Umstrukturierung des Loops, der den Hairpin aus den Helices 2 und 3 mit dem β -Faltblatt bildet (Adrover *et al.*, 2010). Dieses Modell lässt den Loop als möglichen Angriffspunkt für ein Therapeutikum oder zur Prophylaxe erscheinen (Abb. 4.3). Sowohl der Loop (bei E196) als auch die beiden Helices (bei E178, E200, D202, E207, E211, E221) weisen Verknüpfungsmöglichkeiten auf (rote Aminosäuren in Abb. 4.2), die ein Crosslink mit S52 erklären würden. Demnach könnte S52 die Konversion von PrP inhibieren, indem es diesen Loop stabilisiert. Alternativ könnte S52 diese Region, die durch die Konversion zugänglicher wird (Sawaya *et al.*, 2007; Meli *et al.*, 2011), aber auch erst nach der Konversion binden und so eine weitere Interaktion des amyloiden PrP mit PrP^C und so das Wachstum der Aggregate und Fibrillen verhindern.

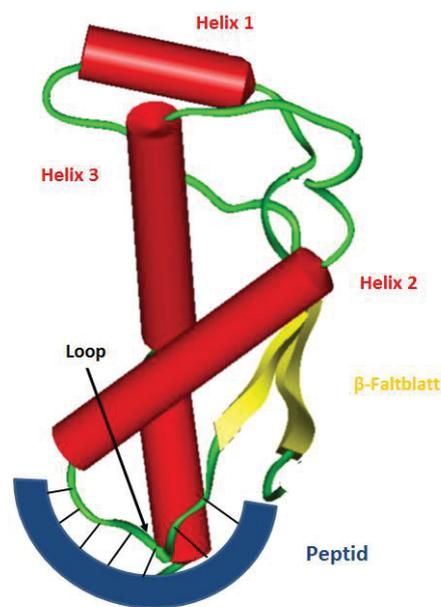


Abb. 4.3: Modell der Loop-Stabilisierung durch Bindung eines Peptids

Der Loop zwischen dem β -Faltblatt und der Helix 2 ist eine mögliche Initiationsstelle der PrP-Konversion (Adrover *et al.*, 2010). (verändert nach: Kaimann 2006)

Bei der Fibrillogenese in dieser Arbeit wurde das Protokoll nach Stöhr *et al.* (2008) verwendet. Im Vergleich zu den Löslichkeitsbestimmungen und der Bestimmung der Sekundärstrukturanteile durch Zirkulardichroismus-Spektroskopie von PrP beinhalteten die Proben dabei zusätzlich 250 mM NaCl. Dadurch bilden sich keine α -helikalen Dimere, die ohne NaCl als stabile Zwischenstufe existieren (Jansen *et al.*, 2001), sondern es stellt sich Gleichgewicht zwischen Monomeren und Dimeren ein, deren α -helikale Struktur teilweise denaturiert ist (Stöhr *et al.*, 2008). Da diese Monomere und Dimere bei längerer Inkubation bei 0,03 % SDS amyloide Fibrillen bilden, stellen sie somit eine präamyloide Zwischenstufe dar (Abb. 4.4). Wie beim Dimer ohne NaCl ist auch im der N-Terminus nicht flexibel, sondern dieser ist ebenfalls strukturiert und an die globuläre Domäne des PrP gebunden. Der N-Terminus scheint beim präamyloiden Dimer jedoch nicht so fest gebunden und noch leicht flexibel zu sein (Stöhr, 2007). Wie Stöhr *et al.* (2008) für präamyloiden Dimere und Monomere konnten andere Arbeitsgruppen ein Gleichgewicht von Monomeren und Dimeren für natürliches bovines PrP zeigen, allerdings nicht für rekombinantes PrP (Meyer *et al.*, 2000). Damit scheint das präamyloide Dimer, obwohl hier aus rekombinantes PrP, sich wie das natürliche posttranslational

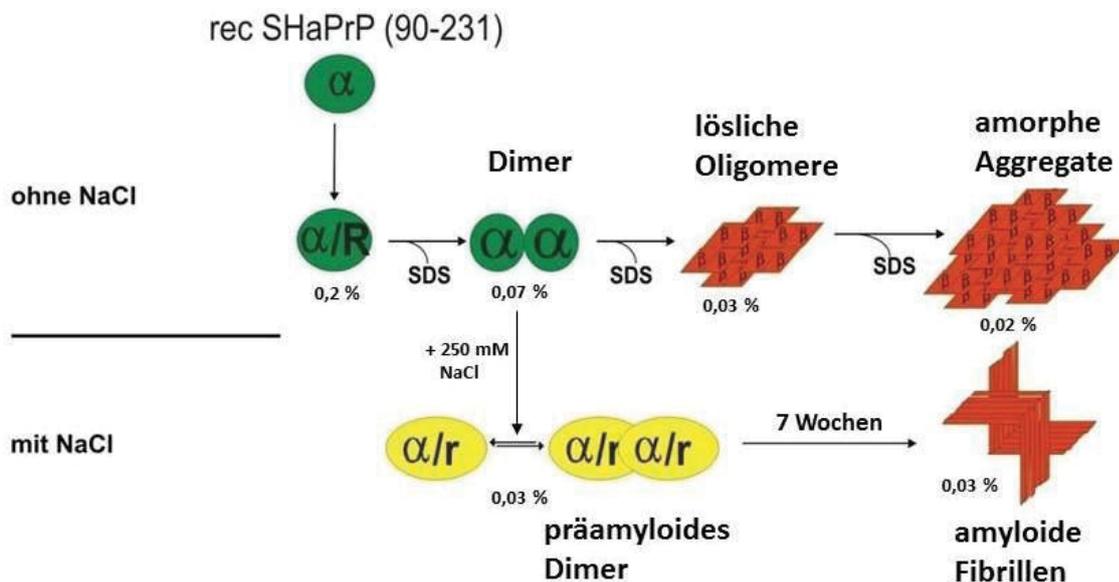


Abb. 4.4: SDS-basiertes *In-Vitro*-Konversionssystem für rekombinantes PrP (90-231) des Syrischen Goldhamsters (rec SHaPrP).

Ohne NaCl bildet PrP bei Verringerung der SDS-Konzentration zunächst α -helikale Dimere und aggregiert recht schnell amorph. Mit 250 mM NaCl bildet sich zunächst ein Gleichgewicht von Monomeren und Dimeren aus, in dem beide im Vergleich zu denen ohne NaCl leicht denaturiert sind. Aus dem PrP des präamyloiden Zwischenzustands bilden sich dann bei längerer Inkubation amyloide Fibrillen aber nur wenige amorphe Aggregate. (verändert nach: Stöhr *et al.*, 2008)

modifizierte PrP zu verhalten und damit auch näher das Verhalten von PrP *in vivo* widerzuspiegeln. Deshalb und da es eine zentrale Rolle während der Fibrillogenese einnimmt, wäre im Rahmen dieser Arbeit auch das Crosslinking von S52 und dem präamyloiden Dimer, d.h. bei 250 mM NaCl, aufschlussreich. Dies wurde aber nicht untersucht, da dieser Aspekt des Konversionssystems erst ganz zum Schluss dieser Arbeit etabliert worden war. Die strukturelle Ähnlichkeit der beiden Dimere lässt aber eine ähnliche Bindung vermuten. Zudem zeigten die Bindungsstudien mit der FCS unter den Bedingungen des präamyloiden Dimers (0,03 % SDS, 250 mM NaCl) eine Bindung von S52, während für die Bedingungen des α -helikalen Dimers (0,06 % SDS, ohne NaCl) keine Bindung nachgewiesen werden konnte. Dies deutet sogar auf eine möglicherweise stärkere Bindung von S52 an das präamyloide Dimer hin.

4.4.3 Modell der β -Faltblatt-Bindung

Die Bindestudien mittels FCS und die bisher diskutierten möglichen Mechanismen sprechen aufgrund der SDS-Konzentrationen für eine Bindung von S52 an α -helikales PrP. Dennoch schließen FCS und die CD-Untersuchungen von PrP in den Selektionspuffern des Phage Displays eine Bindung an β -Oligomere nicht aus. So wäre auch möglich, dass S52 als β -Sheet-Breaker wirkt. S52 (WGHKPSMAPMQS) enthält zwei Proline (P), die nicht nur α -Helices sondern auch β -Faltblätter verhindern können. S52 könnte demnach an β -Faltblätter löslicher Oligomere binden und dadurch deren Wachstum zu unlöslichen Aggregaten oder Fibrillen verhindern. Indem es einzelne Stränge der β -Faltblätter, an die es bindet, durch seine Proline in eine andere Konformation umfaltet und dadurch aus dem β -Faltblatt herauslöst, ließe sich auch die teilweise Auflösung von Aggregaten und Fibrillen erklären (Abb. 4.5). Dabei ist die Wirkung auf Fibrillen, deren Bildung ganz inhibiert werden kann, sogar deutlicher als die auf Aggregate, deren Bildung nicht gänzlich verhindert werden kann. Man kann spekulieren, dass dies auf die Anwesenheit von NaCl bei den Fibrillogeneseansätzen zurückzuführen ist, da S52 auch in Gegenwart von NaCl selektiert wurde und die Ansätze der einfachen Aggregation kein Salz zusätzlich zu den 10 mM Puffer beinhalteten. Die Bindung von S52 an β -Faltblätter des PrP wird über Wechselwirkungen des Peptidrückrats von S52 und PrP vermittelt und wäre damit nicht sehr von der genauen Sequenz des Peptids abhängig. Damit würde erklärt werden, warum S52scr und S52scr2 einen ähnlichen Effekt zeigen wie S52. Beide enthalten ebenfalls je zwei Proline und könnten damit als β -Sheet-Breaker wirken (Abb. 4.5). Dennoch scheint die

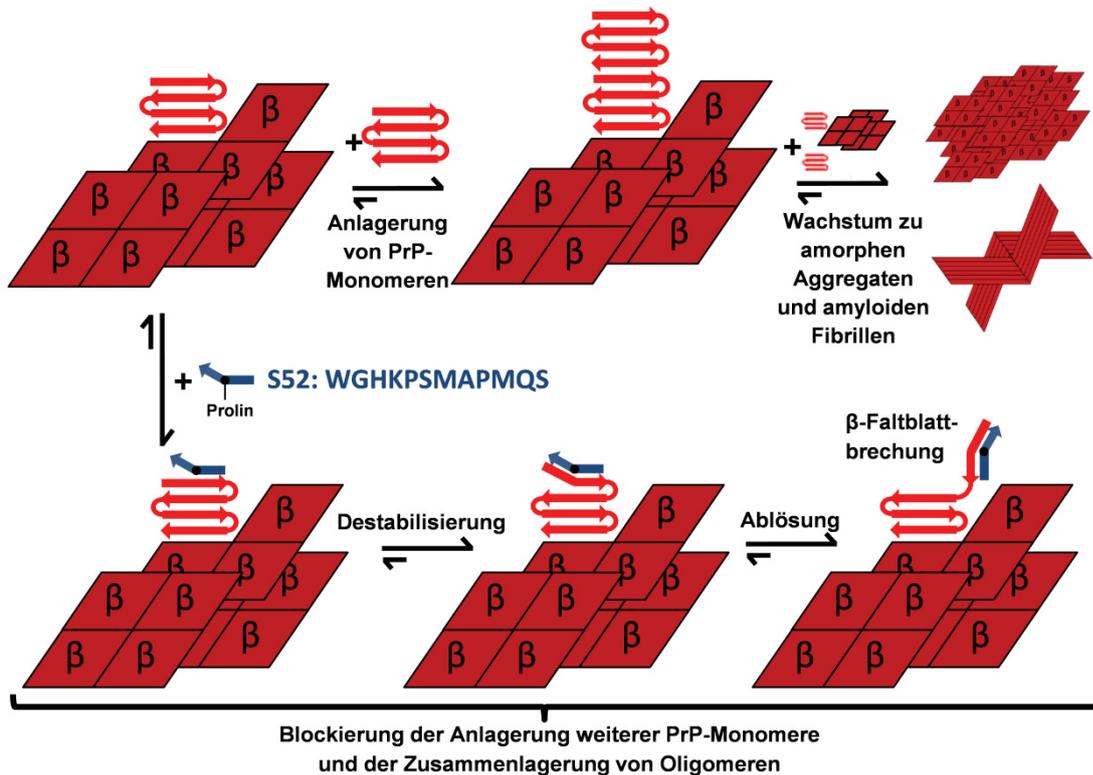


Abb. 4.5: Modell der Wirkung von S52 auf β -Faltblätter von PrP-Oligomeren

Durch Anlagerung von PrP-Monomeren werden die β -Faltblätter vergrößert und so unlösliche Aggregate oder Fibrillen gebildet. Auch durch Zusammenlagerung von β -Oligomere können sich größere Aggregate bilden (oben). S52 bindet an das β -Faltblatt und durch die Konformation des Prolins können sich keine weiteren PrP-Moleküle an das β -Faltblatt des Oligomers oder Oligomere zusammenlagern. Zusätzlich induziert S52 als β -Sheet-Breaker durch die Konformation des Prolins die Destabilisierung eines β -Strangs und löst diesen vom Rest des β -Faltblatts ab (unten). S52 kann so Monomere ablösen und die Oligomere und Aggregate verkleinern.

Aminosäurefolge des S52 die deutlichste Wirkung zu erzielen. Das Vorhandensein der beiden Proline allein jedoch scheint keine Wirkung zu haben. So wurden viele Peptide selektiert, die ein oder zwei Proline enthalten (Kap. 2.6), aber keine Wirkung auf die Konversion von PrP zeigten. Allein ist das Peptid S52 abgesehen von den Prolinen auch sonst kein guter β -Faltblatt-Bildner. In S52 fehlen die Aminosäuren Isoleucin (I), Valin (V) und Threonin (T), aber auch die aromatischen Aminosäuren Tyrosin (Y) und Phenylalanin (F), die als gute β -Faltblatt-Bildner bekannt sind. Dennoch könnte S52 zunächst an ein β -Faltblatt binden und durch die Proline den β -Faltblattstrang destabilisieren, in eine andere Konformation umfalten und dadurch aus dem β -Faltblatt herauslösen.

Die Konversion von PrP zu β -Faltblatt kann S52 nicht komplett verhindern. Demzufolge müsste S52 ein Intermediat der Konversion binden, welches noch

löslich aber bereits ein β -Oligomer ist und in einem Gleichgewicht mit größeren Aggregaten steht (vgl. Abb. 4.4). Als β -Breaker würde S52 die Zusammenlagerung der Oligomere und deren Wachstum durch Anlagerung von PrP-Monomeren blockieren. Es verhindert damit die Bildung von großen unlöslichen Aggregaten (Abb. 4.5) und kann vielleicht auch einzelne PrP-Moleküle wieder ablösen. Denkbar wäre auch, dass S52 Aggregate, die aus zusammengeagerten Oligomeren bestehen, wieder in einzelne Oligomere auflöst. Durch diese Mechanismen würde S52 so zu mehr löslicheren Oligomeren als zu großen unlöslichen Aggregaten führen.

Mit einer ähnlichen Wirkungsweise könnte es auch das Wachstum der Fibrillen inhibieren. Da diese erheblich langsamer wachsen als amorphe Aggregate, würde durch die Fibrillogenese gänzlich verhindert und die Konversion von PrP zu den Oligomeren und Aggregaten um gelenkt. Die Bildung von Oligomeren wird dabei kaum inhibiert, wohl aber deren Wachstum. Das Gleichgewicht zwischen Oligomeren und unlöslichen Aggregaten würde auch hier mehr zu den löslichen Oligomeren verschoben. Im Falle der Fibrillogenese mit NaCl wird das Gleichgewicht zwischen Fibrillen und Oligomeren sogar so weit verschoben, dass sich gar keine Fibrillen bilden, sondern nur Oligomere und Aggregate, ähnlich wie in den Ansätzen ohne NaCl.

Das Modell, dass S52 an β -Faltblätter bindet und als β -Sheet-Breaker wieder auflöst oder so blockiert, dass diese nicht mehr mit PrP-Monomeren oder Dimeren interagieren und somit anlagern und Oligomere sich zusammenlagern können, kann somit am besten alle beobachteten Wirkungen von S52 und S52scr auf die Konversion von PrP erklären. Da bei der Fibrillogenese durch die 250 mM NaCl im Vergleich zur amorphen Aggregation etwas andere Bedingungen vorlagen, ist auch denkbar, dass sich der Mechanismus der S52-Bindung hier von dem bei der amorphen Aggregation etwas unterscheidet. Da die Fibrillogenese aber erst gegen Ende dieser Arbeit zur Verfügung stand, konnte dies nicht mehr eingehender untersucht werden.

4.5 Eignung von Peptiden zur Therapie von Prionkrankheiten

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien oder Prionkrankheiten sind neurodegenerative Erkrankungen bei Mensch und Tier. Sie haben meist eine sehr lange Inkubationszeit, verlaufen nach dem Eintritt erster Symptome aber sehr schnell und sind immer tödlich. Die Diagnose ist häufig erst mit dem Auftreten von Symptomen möglich, und eine sichere Diagnose ist bis heute nur

durch eine histopathologisch Analyse der befallenen Hirne *post mortem* möglich. Eine frühe Diagnose vor dem Auftreten erster Symptome ist aber nötig, um die Krankheit möglichst früh therapieren zu können. Vor allem ist sie wichtig für die Entwicklung einer Therapie, damit diese in frühen Stadien der Krankheit getestet werden kann. Doch auch wenn bis jetzt noch kein geeignetes Verfahren zur Frühdiagnose zur Verfügung steht, so ist die Entwicklung von TSE-Therapieansätzen bereits jetzt dennoch sinnvoll. Denn mit der Evaluation möglicher Therapieansätze erst zu beginnen, wenn eine routinemäßige Frühdiagnose *in vivo* zur Verfügung steht, würde wertvolle Zeit verschenken. Zudem haben einige Diagnoseansätze bereits ein Stadium erreicht, das auf eine baldige breite Anwendung hoffen lässt.

Es gibt eine Reihe vielversprechender diagnostischer Ansätze, die Erkrankung bereits in einem frühen Stadium erkennen zu können. Bei diesen wird PrP^{Sc} entweder direkt, durch seinen Aggregationszustand oder über die Fähigkeit als Keim zu wirken nachgewiesen. Doch gerade die spontanen und erblichen Formen der Prionkrankheiten zeichnen sich durch eine nur sehr geringe Erregerkonzentration außerhalb des ZNS aus und sind daher anhand von PrP^{Sc} nur schwer frühzeitig zu detektieren. Daher beruht der Nachweis von PrP^{Sc}, z.B. im Blut, meist auf dessen Amplifikation wie bei der PMCA (zur Übersicht: Gonzalez-Montalban *et al.*, 2011; Soto, 2011) oder QuIC (Wilham *et al.*, 2010). Jedoch können diese Methoden durch die Entstehung von PrP^{Sc} *de novo* zu falschen positiven Ergebnissen führen. Darüber hinaus ist die Verwendung von aufgereinigtem PrP^C, wie es für diese Methoden notwendig ist, sehr aufwendig. Die Methode der zyklischen Amplifikation erfordern lange Messzeiten und zudem ein sehr geübtes Labor, so dass sie zwar für humane Therapieentwicklung, nicht aber für eine routinemäßige Kontrolle von Tierbeständen in Frage kommt. Andere Methoden, die einzelne Erregerpartikel in Körperflüssigkeiten nachweisen, erreichen noch nicht die erforderliche Sensitivität oder beschränken sich auf experimentelle Tiermodelle (Birkmann *et al.*, 2008).

Zurzeit gibt es für TSEs keine wirksame Therapie, lediglich einige Ansätze sind in der Lage, die Krankheit in experimentellen Tiermodellen nach peripherer Infektion aufzuhalten, jedoch nicht mehr nach dem Eintritt des Erregers in das ZNS. Anti-Prion-Substanzen, die infizierte Zellkulturen kurieren können, zeigen ebenfalls keine oder nur eine geringe Wirkung *in vivo* und scheinen nicht direkt mit PrP^{Sc} oder PrP^C zu interagieren (Poncet-Montange *et al.*, 2011). Es besteht daher die Möglichkeit, dass diese Substanzen nicht die infizierten Zellen heilen, sondern durch ihre häufig gegebene zusätzliche Zytotoxizität lediglich die Zellkultur auf nicht infizierte Zellen selektieren. Die Forschungsgruppen um S. Prusiner und F. Tagliavini testeten Quinacrin bzw. Tetrazykline, die *in vitro*

und in Zellkultur positive Effekte zeigten, in zugelassenen Studien an CJD-Patienten als mögliche Therapeutika, erzielten aber keine zufrieden stellenden Ergebnisse. Daher erscheint ein mehr mechanistischer Ansatz zur Entwicklung einer Therapie mit einem Wirkstoff, der direkt PrP^C, PrP^{Sc} oder eine Zwischenstufe der Konversion als Target hat, wie in der vorliegenden Arbeit vorgestellt, sinnvoller.

Eine Hauptanforderung an ein Vakzin ist zudem ihre Wirksamkeit jenseits der Blut-Hirn-Schranke. Antikörper können diese nicht passieren und wirken daher oft nur außerhalb des ZNS. Bereits mehrere Arbeitsgruppen konnten den Ausbruch einer Prionkrankheit nach peripherer Inokulation von PrP^{Sc} verhindern und auch erste neurologische Veränderungen rückgängig machen. Doch nachdem der Erreger das ZNS erst einmal erreicht hatte, zeigten sich die Behandlung mit Antikörpern weitestgehend wirkungslos (zur Übersicht: Li *et al.*, 2010). Auch Peptide passieren die Blut-Hirn-Schranke oft nur sehr schlecht, da sie meist zu groß oder hydrophil sind, Membranen passiv zu überwinden. Doch hydrophilen Peptiden können lipophile Reste, wie z.B. Laurylgruppen oder Triglyceride, angefügt werden, um die passive Diffusion durch Membranen zu erhöhen. Bindung von Glukose an ein Peptid oder Kationisierung können über spezifische Transportmechanismen eine aktive Aufnahme über die Blut-Hirn-Schranke bewirken. Im Gehirn sind viele endogene Peptide, wie Peptidhormone, Wachstumshormone und Neuropeptide, wirksam. Einige von diesen werden über spezielle Transportsysteme über die Blut-Hirn-Schranke transportiert. Ein therapeutisches Peptid könnte daher mit dem Teil eines solchen endogenen Peptids fusioniert werden, welcher den Transport gewährleistet.

Neben der Schwierigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, haben Peptide aber auch eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Stoffklassen. Sie sind meist gut löslich, selten toxisch und leicht zu synthetisieren. Andererseits werden sie schnell durch Proteasen degradiert. Modifikationen des N- und C-Terminus, wie z.B. Acetylierung, oder die Modifikationen von Seitenketten, wie Halogenierung oder Methylierungen, können die Degradation durch Proteasen aber deutlich verlangsamen und so die biologische Halbwertszeit des Peptids verlängern.

Eine weitere Möglichkeit die Degradation zu verhindern, ist die Verwendung von Peptiden aus D-Aminosäuren. Diese werden im Gegensatz zu Peptiden aus L-Aminosäuren kaum von Enzymen erkannt und haben daher eine lange Verweildauer im Organismus. Durch die fehlende Spaltung durch Proteasen

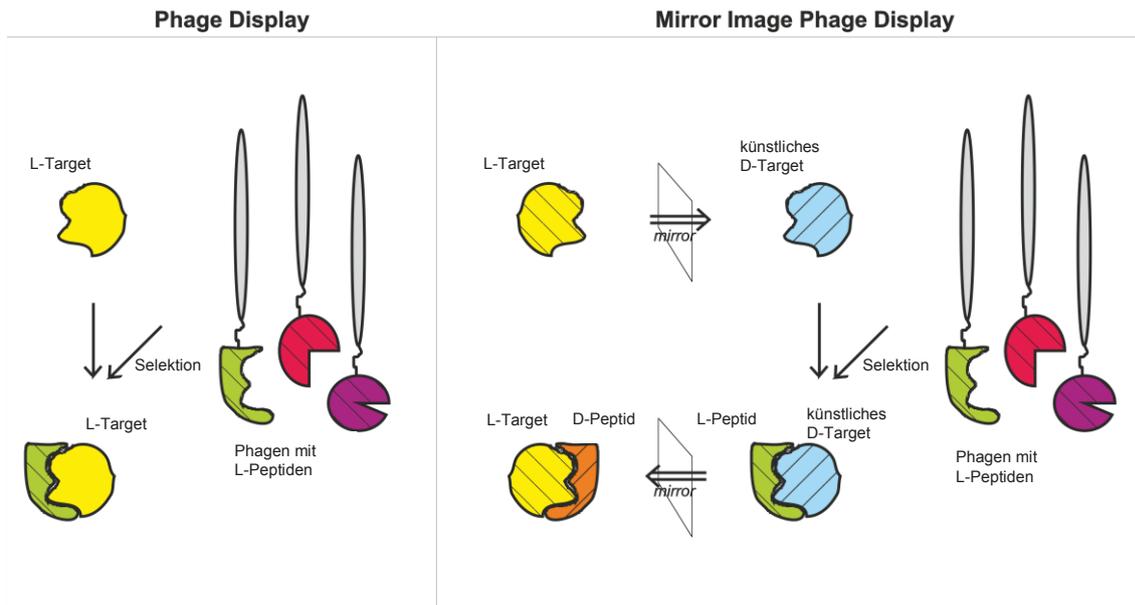


Abb. 4.6: Prinzip von Phage Display und Mirror Image Phage Display

Beim Phage Display werden die Phagen gegen ein L-Target selektiert. Beim Mirror Image Phage Display hingegen wird zunächst ein D-Target synthetisiert, das das gespiegelte L-Target darstellt. Gegen dieses werden die L-Peptide der Phagen selektiert. Die D-Enantiomere dieser selektierten L-Peptide binden dann das natürliche L-Target. (verändert nach: Funke & Willbold, 2009)

können sie von Immunzellen zudem nicht als Antigen präsentiert werden und rufen dadurch eine geringere humorale Immunantwort hervor als L-Peptide, welche eine starke Immunantwort hervorrufen können. Die D-Peptide können über Mirror Image Phage Display (Abb. 4.6) identifiziert werden. Dazu werden zunächst L-Peptide gegen das künstliche D-Enantiomer des eigentlichen L-Targets selektiert. Die so identifizierten Peptidsequenzen sollten dann als D-Peptid an das natürliche L-Target binden (zur Übersicht: Funke & Willbold, 2009). Die Arbeitsgruppe von D. Willbold konnte mit D-Peptiden so bereits erste therapeutische Erfolge in einem Tiermodell der Alzheimer-Krankheit erzielen (van Groen *et al.*, 2008; Funke *et al.*, 2010).

Das zentrale Ereignis in der Pathogenese von Prionkrankheiten ist die Umwandlung des wirtseigenen zellulären PrP^{C} in das mit Infektiosität assoziierte amyloidogene PrP^{Sc} . Daher stellt sich die Frage, ob PrP^{C} oder PrP^{Sc} das geeignetere Target für die Selektion von Peptiden ist. Obwohl Infektiosität inzwischen aus rekombinantem PrP unter Zugabe von nur wenigen wohl definierten Kofaktoren *in vitro* generiert werden kann (Wang *et al.*, 2010), ist die genaue molekulare Struktur von PrP^{Sc} nach wie vor unbekannt. Auch scheint mit diesem oder ähnlichen Verfahren zur Genese von PrP^{Sc} jeweils nur ein

Bruchteil des ursprünglich eingesetzten PrPs wirklich infektiös zu werden. PrP scheint daher hierbei mehrere verschiedene Formen, infektiöse und nicht-infektiöse, anzunehmen. Darüber hinaus existieren Prionstämme, die sich nicht in der Aminosäuresequenz und daher wahrscheinlich ebenfalls nur durch ihre PrP-Konformation unterscheiden. Diese strukturelle Heterogenität und die Schwierigkeit, infektiöses PrP^{Sc} hoch rein herzustellen und zu isolieren, macht es als Target für eine Selektion von therapeutischen Peptiden ungeeignet. Es würden zu viele Peptidsequenzen identifiziert werden, die nur an mitaufgereinigte zelluläre Faktoren binden würden oder welche, die nur an einen einzelnen Prionstamm binden. So zeigen verschiedenste Therapieansätze mit unterschiedlichen Stoffklassen als Therapeutika, die sich gegen PrP^{Sc} richten, auch nur eine geringe Wirkung *in vivo* (Trevitt & Collinge, 2006).

Der bessere Ansatzpunkt für die Selektion ist daher die zelluläre Isoform PrP^C. Dieses kann hoch rein hergestellt werden und besitzt eine genau bekannte Struktur. PrP^C ist das Substrat für die Replikation von PrP^{Sc} und ist als membrangebundenes neuronales PrP^C für die Neurotoxizität des PrP^{Sc} erforderlich (Brandner *et al.*, 1996) und bietet sich daher als Target an. Ein therapeutisches Peptid könnte an PrP^C binden und die für die Prionreplikation notwendige Interaktion mit PrP^{Sc} verhindern. Oder es könnte PrP^C zumindest so stabilisieren, dass eine Konversion entweder nicht mehr möglich ist, oder in eine Richtung gelenkt wird, die als weniger pathogen erscheint, wie in dieser Arbeit vorgestellt. Im Idealfall bindet es ein sehr frühes Intermediat der Konversion, ohne die zelluläre Funktion des PrP^C zu beeinträchtigen. So konnte bereits gezeigt werden, dass ein Peptid die Konversion von PrP zu β -faltblattreichen Struktur rückgängig machen und die Infektiosität des Erregers verringern kann, zeigte *in vivo* aber nur eine schwache Verlängerung der Inkubationszeit (Soto *et al.*, 2000). Im Gegensatz hierzu zielen Therapieansätze mit Antikörpern (zur Übersicht: Li *et al.*, 2010) oder RNAi (Verity & Malucci, 2011) direkt auf eine Verringerung von PrP^C an der Zelloberfläche. Zwar entfernen die Antikörper PrP^C nicht vollständig, sie können aber durch ihre Größe sterisch die zelluläre Funktion blockieren. Ob eine derartige Beeinträchtigung der zellulären Funktion in Kauf genommen werden kann, ist fraglich. Zwar zeigten sich bei so behandelten Mäusen keine Nebenwirkungen, aber ob sich das Ausschalten eines hochkonservierten neuronalen Proteins beim Menschen ebenso wenig auswirkt, darüber gibt es nur wenig Anhaltspunkte. PrP-Knockout-Mäuse zeigen jedoch neurologische Auffälligkeiten und nach neueren Studien ist PrP an der Stabilität von Myelinscheiden im PNS maßgeblich beteiligt (Bremer *et al.*, 2010).

Zusammenfassend erscheinen Therapeutika aussichtsreich, die PrP^C oder frühe Konversionsintermediate wie β -Oligomere als Substrat des pathologischen Konversionsprozesses blockieren. Insbesondere Peptide eignen sich hierfür, da sie sich gegenüber vielen anderen Stoffklassen leichter selektieren und modifizieren und so besser auf einen bestimmten Wirkmechanismus ausrichten lassen. Dadurch unterliegen sie weniger Einschränkungen anderer Stoffklasse und minimieren mögliche Nebenwirkungen, so dass sie für eine Therapie von Prionkrankheiten aussichtsreich erscheinen.

In dieser Arbeit wurden bei verschiedenen SDS-Konzentrationen Dissoziationskonstanten für S52 und PrP von 14 - 100 μ M bestimmt (Kap. 3.2.1 und 3.5.3). Werte in dieser Größenordnung waren nach dem Phage Display auch zu erwarten. So fanden einige andere Arbeitsgruppen durch Phage Display Peptide mit einem IC₅₀ gegen ihr Target von nur etwa 100 μ M, beispielsweise ein Peptid gegen KDR (Kinase Domain Receptor), welches dadurch dessen Interaktion mit VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) inhibiert und so *in vitro* Tumorwachstum hemmen kann (Hetian *et al.*, 2002). Andererseits sind bei der Inhibierung von Enzymen durch selektierte Peptide auch Dissoziationskonstanten K_D unter 10 nM erreicht worden (Huang *et al.*, 2003).

Weitere Runden des Phage Displays mit an einzelnen Positionen zufällig mutiertem S52 kann noch Peptide mit besserer Affinität liefern und so auch die Konzentration von S52, die für einen positiven Effekt nötig ist, noch verringern. Zumal sind die in dieser Arbeit verwendeten 100 - 150 μ M S52 *in vivo* nicht zu verwirklichen. Jenseits der Blut-Hirn-Schranke sind Konzentrationen von Pharmazeutika meist nur im einstelligen nanomolaren Bereich realisierbar. Andererseits fällt *in vivo* noch die Konkurrenz von SDS um die Bindung an PrP weg, so dass eine geringere Konzentration von S52 ausreichend sein müsste. Zwar ist S52 nach den hier gezeigten Ergebnissen mit seiner Affinität und wirksamen Konzentration noch mehrere Zehnerpotenzen von einer pharmazeutischen Anwendung entfernt, es gibt jedoch noch aussichtsreiche Möglichkeiten diese zu steigern.

Betrachtet man die Pathogenese der Prionkrankheiten als ein Zusammenspiel von PrP^{Sc}-Bildung und dessen Clearance, dann könnte S52 vielleicht auch schon durch eine leichte Verringerung der PrP^{Sc}-Bildung dieses Verhältnis zu Gunsten der Clearance verschieben und somit den Krankheitsverlauf stoppen. Insbesondere ist zu berücksichtigen, dass S52 mit den löslichen β -Oligomeren einen PK-sensitiven Zwischenzustand stabilisiert, so dass die Clearance bzw. Degradation durch Proteasen vermutlich erhöht wird.

4.6 Fazit und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es ursprünglich, die α -helikale Isoform von PrP zu stabilisieren und die Bildung von Fibrillen zu verhindern. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass S52 die α -helikale Isoform des PrP, wenn überhaupt, aber nur kurzzeitig stabilisieren kann. Danach bildet PrP eine Isoform mit deutlich vermehrtem β -Faltblattanteil aus. Es bilden sich zwar unlösliche Aggregate, die Ausbildung von Fibrillen wird jedoch durch S52 verhindert. Auch wenn trotz der hohen Ähnlichkeit zu infektiösen synthetischen Prionen die Infektiosität der Fibrillen aus dem SDS-basierten *In-vitro*-Konversionssystem bisher noch nicht gezeigt werden konnte, so lassen diese Ergebnisse doch auf die inhibitorische Wirkung von S52 auf die Bildung von Infektiosität hoffen.

Diese Arbeit zeigt prinzipiell, dass mittels synthetischer Peptide die Konversion von PrP zwar nicht vollständig, speziell aber dessen Fibrillogenese inhibiert werden kann. Durch diesen Ansatz auf molekularer Ebene und die Kenntnisse über den Mechanismus des Konversionsprozesses im SDS-basierten *In-vitro*-Konversionssystem kann die Fibrillogenese somit gezielt gehemmt werden. Nach den hier gezeigten Ergebnissen, erscheinen daher kurze Peptide als aussichtsreiche potentielle Therapeutika für Prionkrankheiten.

Wenn es auch zunächst nicht Ziel dieser Arbeit war, so ließen sich doch aus den Ergebnissen und dem zugrundeliegenden Konversionsmodell (Stöhr *et al.*, 2008) einige Rückschlüsse auf den Mechanismus dieser Inhibierung bzw. auf die Wirkungsweise des S52 ziehen. So passen alle Beobachtungen gut in das Konversionsmodell und unterstützen es dadurch indirekt. So bestätigt diese Arbeit, dass die amorphe Aggregation und die Fibrillogenese von PrP zwei unterschiedliche Prozesse sind, deren Wege sich bereits früh im Konversionsprozess trennen. Eine weiter gehende Untersuchung der Inhibierung der Fibrillogenese durch S52 könnte sogar weitere wertvolle Hinweise auf den bisher nicht geklärten Mechanismus der Fibrillenbildung liefern.

Die für eine positive Wirkung nötigen Konzentrationen von S52 sind in dem in dieser Arbeit verwendeten SDS-basierten *In-vitro*-Konversionssystem noch relativ hoch. Wie aber bereits in Kapitel 4.4 diskutiert, ließe sich diese aber wahrscheinlich durch Sequenzvariation des S52 noch verringern. Auch die Konkurrenz von SDS fällt *in vivo* weg, so dass hier S52 besser binden kann. Darüber hinaus könnte eine Untersuchung der Bindung von S52 und PrP durch Proteolyse und Massenspektrometrie der verknüpften Komplexe die Bindestelle identifizieren sowie die Art der Bindung näher spezifiziert werden. Eventuell ergeben sich hierdurch weitere molekulare Optimierungsmöglichkeiten. So könnte das Peptid S52 verlängert werden, nicht nur um fester zu binden,

sondern auch um einen größeren Bereich des PrP abdecken zu können und so die mögliche PrP-PrP-Interaktion bei der Aggregation und Fibrillogenese noch besser zu inhibieren.

Im *In-vitro*-Konversionssystem läuft die Fibrillogenese aufgrund der hohen PrP-Konzentration sehr schnell ab, bei höheren Konzentrationen als in dieser Arbeit verwendet, sogar schon innerhalb einer Woche. *In vivo* läuft dieser Prozess nicht nur langsamer ab, sondern scheint auch durch eine gewisse Clearancerate zumindest teilweise wieder rückgängig gemacht zu werden. Daher könnte es um die Krankheit zu stoppen *in vivo* ausreichend sein, die PrP^{Sc}-Bildung nicht vollständig zu hemmen, sondern nur so weit zu verlangsamen, dass die Clearance die PrP^{Sc}-Bildung egalisiert.

5 Zusammenfassung

Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) sind neurodegenerative Erkrankungen bei Mensch und Tier, die durch Prionen ausgelöst werden und immer tödlich verlaufen. Prionen bestehen sehr wahrscheinlich ausschließlich aus dem umgefalteten wirtseigenen Prion-Protein (PrP). Die Struktur der pathogenen Isoform von PrP wird, im Gegensatz zur nativen Isoform mit überwiegend α -helikalen Struktur, von β -Faltblättern dominiert. Die pathogene Isoform ist unlöslich und bildet Aggregate oder Fibrillen. Bis heute existiert keine Therapie für Prion-Krankheiten und die bisher untersuchten Ansätze fielen sehr ernüchternd aus und zeigten meist nur *in vitro* eine Wirkung.

In dieser Arbeit wurde als neuer Therapieansatz für Prionkrankheiten mittels Phage Display kurze PrP-bindende Peptide selektiert und deren Wirkung auf die Konversion von PrP im SDS-basierten *In-vitro*-Konversionssystem untersucht. Dieses Konversionssystem eignet sich hierzu besonders gut, da die Zwischenstufen der PrP-Konversion durch Variation der SDS-Konzentration einstellbar und bereits gut charakterisiert sind. Es wurde hierbei bewusst auf die Untersuchung der Infektiosität verzichtet, denn Ziel dieser Arbeit war nicht die Suche eines konkreten Therapeutikums, sondern zunächst die Identifizierung eines möglichen Mechanismus zur Inhibierung der PrP-Konversion. Bei Erfolg kann dieser Mechanismus durch die definierten Bedingungen des *In-vitro*-Konversionssystem näher charakterisiert und dadurch weiter optimiert werden.

Eines der über 40 im Rahmen dieser Arbeit selektierten Peptide, das Peptid S52, konnte die α -helikale Isoform von PrP kurzzeitig stabilisieren, wie Zirkular-Dichroismus-Spektroskopie belegt. Differentielle Ultrazentrifugation zeigt, dass darüber hinausgehend S52 die Löslichkeit von PrP dauerhaft verbessert, indem es die Aggregation verringert und die krankheits-assoziierte Fibrillogenese sogar gänzlich inhibiert. Durch Crosslinking von PrP und S52 und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) konnte nachgewiesen werden, dass S52 an Monomere und Dimere von PrP mit einer K_D im zweistelligen mikromolaren Bereich bindet. Durch die zuvor erlangten Kenntnisse des Konversionsprozesses in dem verwendeten *In-vitro*-System konnte zudem bereits ansatzweise auf die Wirkungsweise von S52 geschlossen werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es mittels kurzer Peptide prinzipiell möglich ist, die krankheits-assoziierte Konversion von PrP zu verhindern. Demnach könnten

kurze PrP-bindende Peptide die Grundlage für eine erfolgreiche Therapie von Prionkrankheiten darstellen.

6 Abstract

Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSEs) are fatal neurodegenerative diseases in humans and animals, which are caused by prions. Prions consist mainly if not only of the host encoded prion protein (PrP). In contrast to the native isoform of PrP with predominantly α -helical structure the structure of the pathogenic isoform is dominated of β -sheets. The pathogenic isoform is insoluble and forms aggregates or amyloid fibrils. Until today there is no therapy for prion diseases and the approaches studied so far were very sobering and mostly showed only an effect *in vitro*.

In this work, as a new therapeutic approach for prion diseases based on interaction of peptides with PrP is presented. Short PrP-binding peptides are selected via phage display and their effect to the conversion of PrP was investigated in the SDS-based *in-vitro*-conversion system. This conversion system is suitable for this purpose particularly well, since the intermediates of PrP-conversion can be adjusted by varying the SDS concentration and are already well characterized by earlier work of our research group. Aim of this work was not searching for a new therapeutic agent and abolishing prion infectivity, which structure is still obscure, but initially the identification of a possible mechanism for the inhibition of PrP-conversion. If successful, this mechanism could be further examined by the defined conditions of the *in-vitro*-conversion system and optimized and subsequent expanded to degrade infectivity too.

One of the 40 selected peptides in this work, peptide S52, briefly stabilizes the α -helical isoform of PrP as demonstrated by circular dichroism spectroscopy. Beyond this, differential ultracentrifugation shows S52 improves the solubility of PrP permanently by reducing the disease-associated aggregation and by inhibiting of fibrillogenesis. Crosslinking of S52 with PrP and fluorescence correlation spectroscopy (FCS) showed that S52 binds to monomers and dimers of PrP with a K_D in the two-digit micromolar range. Due to the previously acquired knowledge of the PrP conversion process by using this *in-vitro*-conversion system, some conclusions about the mechanism of S52-PrP-Interaction could be drawn. These results show that in principle it is possible to prevent disease-associated conversion of PrP by short peptides. Accordingly, short PrP-binding peptides could be the basis for a successful therapy of prion diseases.

7 Literaturverzeichnis

- Adessi, C., Soto, C. (2002)
Converting a Peptide into a Drug: Strategies to Improve Stability and Bioavailability
Curr. Med. Chem. 9: 963-78
- Adjou, K.T., Demaimay, R., Deslys, J.P., Lasmezas, C.I., Beringue, V., Demart, S., Lamoury, F., Seman, M., Dormont, D. (1999)
MS-8209, a water-soluble amphotericin B derivative, affects both scrapie agent replication and PrPres accumulation in Syrian hamster scrapie
J. Gen. Virol. 80 (Pt 4): 1079-85
- Adrover, M., Pauwels, K., Prigent, S., de Chiara, C., Xu, Z., Chapuis, C., Pastore, A., Rezaei, H. (2010)
Prion fibrillization is mediated by a native structural element that comprises helices H2 and H3.
JBC 285(27):21004-12
- Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., Clarke, M.C. (1967)
Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?
Nature 214: 764-6
- Bae, S.H., Legname, G., Serban, A., Prusiner, S.B., Wright, P.E., Dyson, H.J. (2009)
Prion proteins with pathogenic and protective mutations show similar structure and dynamics.
Biochemistry 48(34):8120-8
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M. (1986)
Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene
Cell 46: 417-28
- Bennion, B.J., DeMarco, M.L., Daggett, V. (2004)
Preventing misfolding of the prion protein by trimethylamine N-oxide.
Biochemistry 43(41):12955-63
- Benvegnù, S., Gasperini, L., Legname, G. (2011)
Aged PrP null mice show defective processing of neuregulins in the peripheral nervous system.
Mol Cell Neurosci. 47(1):28-35
- Birkmann, E., Henke, F., Funke, S.A., Bannach, O., Riesner, D., Willbold, D. (2008)
A highly sensitive diagnostic assay for aggregate-related diseases, including prion diseases and Alzheimer's disease.
Rejuvenation Res. 11(2):359-63

- Bocharova, O. V., Breydo, L., Parfenov, A. S., Salnikov, V. V., Baskakov, I. V. (2005)
In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP^{Sc}
J. Mol. Biol. 346: 645-59
- Brandner, S., Isenmann, S., Raeber, A., Fischer, M., Sailer, A., Kobayashi, Y., Marino, S., Weissmann, C., Aguzzi, A. (1996)
Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity
Nature 379(6563): 339-43
- Bremer, J., Baumann, F., Tiberi, C., Wessig, C., Fischer, H., Schwarz, P., Steele, A.D., Toyka, K.V., Nave, K.-A., Weis, J. & Aguzzi, A. (2010)
Axonal prion protein is required für peripheral myelin maintenance.
Nature Neuroscience 13(3): 310-320
- Brown, P., Cervenakova, L., Goldfarb, L.G., McCombie, W.R., Rubenstein, R., Will, R.G., Pocchiari, M., Martinez-Lage, J.F., Scalici, C., Fasullo, C. (1994)
Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: an example of the interplay between ancient genes and modern medicine
Neurology 44: 291-3
- Brown, D. R., Hafiz, F., Glassmith, L. L., Wong, B., Jones, I. M., Clive, C., Haswell, S. J. (2000)
Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance
EMBO J. 19(6): 1180-6
- Brown, L.R. & Harris, D.A. (2003)
Copper and zinc delivery of the prion protein from the plasma membrane to a subset of early endosomes and the Golgi
J. Neurochem. 87: 353-63
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W. (1997)
Transmission to mice indicates that "new variant" CJD is caused by the BSE agent
Nature 389: 498-501
- Budka, H. (2001)
Kapitel 14: Portrait der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)
In: *Prionen und Prionkrankheiten*.
Hörnlimann, B., Riesner, D. & Kretzschmar, H. (Hrsg.), De Gruyter, Berlin
- Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., Weisman, C. (1992)
Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein
Nature 356: 577-82

- Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., Weismann, C. (1993)
Mice devoid of PrP are resistant to scrapie
Cell 73: 1339-47
- Caspi, S., Halimi, M., Yanai, A., Sasson, S.B., Taraboulos, A., Gabizon R. (1998)
The anti-prion activity of Congo red. Putative mechanism.
J. Biol. Chem. 273(6): 3484-9
- Cassirer, P. (1898)
Über die Traberkrankheit der Schafe: pathologisch-anatomische und bakterielle Untersuchung
Pathol. Anat. Physiol. 153: 89-110
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., Soto, C. (2005)
In vitro generation of infectious scrapie prions
Cell 121(22): 195-206
- Caughey, B., Race, R.E. (1992)
Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by Congo red
J. Neurochem. 59: 768-71
- Caughey, B., Lansbury, P.T. (2003)
Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders
Annu. Rev. Neurosci. 26: 267-98
- Chabry, J., Caughey, B., Chesebro, B. (1998)
Specific inhibition of in vitro formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides
J. Biol. Chem. 273(21): 13203-7
- Chakroun, N., Prigent, S., Dreiss, C.A., Noinville, S., Chapuis, C., Fraternali, F., Rezaei, H. (2010)
The oligomerization properties of prion protein are restricted to the H2H3 domain.
FASEB J. 24(9):3222-31
- Chandler, R.L. (1961)
Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material
Lancet 1: 1378-1379
- Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E., Oldstone, M (2005)
Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical Scrapie
Science 308: 1435-9

- Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., Ashe, K.H. (2005)
Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function
Nature Neurosci.8(1): 79-84
- Cobb, N.J., Sönnichsen, F.D., McHaourab, H., Surewicz, W.K. (2007)
Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure.
PNAS 104(48):18946-51
- Cobb, N.J., Apetri, A.C., Surewicz, W.K. (2008)
Prion protein amyloid formation under native-like conditions involves refolding of the C-terminal alpha-helical domain.
JBC 283(50):34704-11
- Cohen, F.E., Pan, K.M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R.J., Prusiner, S.B. (1994)
Structural clues to prion replication
Science 264: 530-1
- Come, J. H., Fraser, P. E., Lansbury, P. T. (1993)
A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding
PNAS USA 90(13): 5959-63
- Doh-ura, K., Ishikawa, K., Murakami-Kubo, I., Sasaki, K., Mohri, S., Race, R., Iwaki, T. (2004)
Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models
J. Virol. 78(10): 4999-5006
- Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Wright, P.E., Dyson, H.J. (1997)
Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible
PNAS USA 94(25): 13452-7
- Dumpitak, C. (2003)
Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Polysacchariden und alterungsassozierten Proteinmodifikationen bei Prionen
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Dumpitak, C., Riesner, D. (2005)
Der Beweis der Prionhypothese
Bild: Hans Kretzschmar, München
Biologie in unserer Zeit 35(6): 374-83

- Dutkiewicz, E., Jakubowska, A. (2002)
Effect of electrolytes on the physicochemical behaviour of sodium dodecyl sulphate micelles.
Colloid Polym. Sci. 208: 1009-14
- Ehlers, B., Diring, H. (1984)
Dextran sulfate 500 delays and prevents mouse scrapie by impairment of agent replication in spleen
J. Gen. Virol. 65: 1325-30
- Eigen, M. (1996)
Prionics or the kinetic basis of prion diseases
Biophys. Chem. 63: A1-A18
- Elfrink, K., Ollesch, J., Stöhr, J., Willbold, D., Riesner, D., Gerwert, K. (2008)
Structural changes of membrane-anchored native PrP(C).
PNAS 105(31):10815-9
- Enari, M., Flechsig, E., Weissmann, C. (2001)
Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody
PNAS USA 98(16): 9295-9
- Farquhar, C., Dickinson, A., Bruce M. (1999)
Prophylactic potential of pentosan polysulphate in transmissible spongiform encephalopathies
Lancet 353(9147): 117
- Foster, B.A., Coffey, H.A. Morin, M.J., Rastinejad, F. (1999)
Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function
Science 286, 2507-10
- Funke, S:A. & Willbold, D. (2009)
Mirror page display – a method to generate D-peptide ligands for use in diagnostic or therapeutical applications
Molecular BioSystems 5:783-6
- Funke, S.A., van Groen, T., Kadish, I., Bartnik, D., Nagel-Steger, L., Brener, O., Sehl, T., Batra-Safferling, R., Moriscot, C., Schoehn, G., Horn, A.H.C., Müller-Schiffmann, A., Korth, C., Sticht, H., Willbold, D. (2010)
Oral Treatment with the D-Enantiomeric Peptide D3 Improves Pathology and Behavior of Alzheimer's disease Transgenic Mice.
ACS Chem. Neurosci. 1: 639-648
- Gong, B., Ramos, A., Vázquez-Fernández, E., Silva, C.J., Alonso, J., Liu, Z., Requena, J.R. (2011)
Probing structural differences between PrP(C) and PrP(Sc) by surface nitration and acetylation: evidence of conformational change in the C-terminus.
Biochemistry 50(22):4963-72

- Gonzales-Montalban, N., Makarava, N., Ostapchenko, V.G., Savtchenk, R., Alexeeva, I., Rohwer, R.G., Bakakov, I.V. (2011)
Highly Efficient Protein Misfolding Cyclic Amplifikation.
PLOS Pathogens 7(2): e1001277. doi 101371
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. (2004)
Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers
PNAS 101: 8342-7
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. (2004b)
Chapter 5: Structural Studies of Prion Protein.
S.243-282 in: *Prion Biology and Disease. Second Edition.*
Prusiner, S.B. (Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press 2004
- Greenfield, N., Fasman, G.D. (1969)
Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation
Biochemistry 8(10): 4108-16
- Greenfield, N.J. (1996)
Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data
Anal. Biochem. 235: 1-10
- Hafner-Bratkovic, I., Pristovsek, R., Gaedtke, L., Veranic, P., Gaspersic, J., Mancek-Keber, M., Avbelj, M., Polymeidou, M., Julis, C., Aguzzi, A. (2010)
Globular Domain of the Prion Protein needs to be unlocked by Domain Swapping to support Prion Protein Conversion.
JBC 286(14): 12149-56
- Haigh, C.L., Edwards, K., Brown, D.R. (2005)
Copper binding is the governing determinant of prion protein turnover
Mol. Cell. Neurosci. 30: 186-96
- Haik, S., Brandel, J.P., Salomon, D., Sazdovitch, V., Delasnerie-Laupretre, N., Laplanche, J.L., Faucheux, B.A., Soubrie, C., Boher, E., Belorgey, C., Hauw, J.J., Alperovitch A. (2004)
Compassionate use of quinacrine in Creutzfeldt-Jakob disease fails to show significant effects
Neurology 63(12): 2413-5
- Heppner, F.L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M.A., Rulicke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R.M., Kalinke, U., Aguzzi, A. (2001)
Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies
Science 294(5540): 178-82

- Herms, J.W. & Kretzschmar, H. (2001)
Kapitel 7: Die Funktion des zellulären Prion-Proteins PrP^C als
kupferbindendes Protein an der Synapse.
In: *Prionen und Prionkrankheiten*.
Hörnlimann, B., Riesner, D. & Kretzschmar, H. (Hrsg.), De Gruyter, Berlin
- Hetian, L., Ping, A., Shumei, S., Xiaoying, L., Luowen, H., Jian, W., Lin, M.,
Meisheng, L., Junshan, Y., Chengchao, S. (2002)
A novel peptide isolated from a phage display library inhibits tumor
growth and metastasis by blocking the binding of vascular endothelial
growth factor to its kinase domain receptor.
JBC 277(45): 43137-42
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S. (1997)
The same prion strain causes vCJD and BSE
Nature 398: 448-50
- Hjelmeland, L. M., Chrambach, A. (1984)
Solubilization of functional membrane proteins.
Meth. Enzym. 104: 305-18
- Horiuchi, M., Priola, S.A., Chabry, J., Caughey, B. (2000)
Interactions between heterologous forms of prion protein: binding,
inhibition of conversion, and species barriers.
PNAS USA 97: 5836-41
- Horiuchi, M., Baron, G.S., Xiong, L.-W., Caughey, B. (2001)
Inhibition of Interactions and Interconversions of Prion Protein Isoforms
by Peptide Fragments from the C-terminal Folded Domain
J. Biol. Chem. 276(18): 15489-97
- Hornemann, S., Schorn, C., Wüthrich, K. (2004)
NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf
brains
EMBO Reports 5: 1159-64
- Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H. (2001)
Prions in Humans and Animals.
de Gruyter, Berlin
- Hoshino, S., Inoue, K., Yokoyama, T., Kobayashi, S., Asakura, T.,
Teramoto, A., Itohara, S. (2003)
Prion prevent brain damage after experimental brain injury: a preliminary
report
Acta Neurochir. Suppl. 86: 297-9
- Huang, L., Sexton, D.J., Skogerson, K., Devlin, M., Smith, R., Sanyal, .I,
Parry, T., Kent, R., Enright, J., Wu, Q.L., Conley, G., DeOliveira, D.,
Morganelli, L., Ducar, M., Wescott, C.R., Ladner, R.C. (2003)
Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2.
JBC 278(18): 15532-40

- Huang, Z., Gabriel, J.M., Baldwin, M.A., Fletterick, R.J., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. (1994)
Proposed three-dimensional structure for the cellular prion protein
PNAS 91: 7139-43
- Ingrosso, L., Ladogana, A., Pocchiari, M. (1995)
Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters.
J. Virol. 69(1):506-8
- Jackson, G. S., Murray, I., Hosszu, L. L. (2001)
Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein
PNAS 98: 8531-35
- Jansen, K., Schafer, O., Birkmann, E., Post, K., Serban, H., Prusiner, S. B., Riesner, D. (2001)
Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form
Biol. Chem. 382(4): 683-91
- Jarret, J. T., Lansbury, P. T. (1993)
Seeding "one-dimensional crystallisation" of amyloid: A pathogenic mechanism in alzheimer's disease and scrapie?
Cell 73: 1055-58
- Johnson, W.C.Jr. (1990)
Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide.
Proteins 7(3): 205-14
- Kaimann, T. (2002)
Strukturveränderungen von kovalent verknüpften Oligomeren des Prion-Proteins.
Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Kaimann, T. (2006)
Massenspektrometrische Strukturuntersuchungen an Monomeren und Dimeren des Prion-Proteins.
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Kaimann, T., Metzger, S., Kuhlmann, K., Brandt, B., Birkmann, E., Höltje, H.D., Riesner, D. (2008)
Molecular model of an alpha-helical prion protein dimer and its monomeric subunits as derived from chemical cross-linking and molecular modeling calculations.
J. Mol. Biol. 376(2):582-96
- Kanaani, J., Prusiner, S.B., Diacovo, J., Baekkeskov, S., Legname, G. (2005)
Recombinant prion protein induces rapid polarization and development of synapses in embryonic rat hippocampal neurons *in vitro*
J. Neurochem. 95: 1373-86

- Kaneko, K., Wille, H., Mehlhorn, I., Zhang, H., Ball, H., Cohen, F. E., Baldwin, M. A. & Prusiner, S. B. (1997)
Molecular properties of complexes formed between the Prion Protein and synthetic peptides. *J. Mol. Biol.* 270: 574-86
- 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 (RRGE)
J. Gen. Virol. 73: 1025-29
- Kimberlin, R.H., Walker, C.A. (1986)
Suppression of scrapie infection in mice by heteropolyanion 23, dextran sulfate, and some other polyanions
Antimicrob. Agents Chemother. 30: 409-13
- Klabunde, T., Petrassi, H.M., Oza, V.B., Raman, P., Kelly, J.W., Sacchettini, J.C. (2000)
Rational design of potent human transthyretin amyloid disease inhibitors
Nature Struct. Biol. 7(4): 312-21
- Kocisko, D.A. Priola, S.A., Raymond, G.J., Chesebro, B., Lansbury, P.T. Jr., Caughey, B. (1995)
Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier
PNAS USA 92(9): 3923-27
- Kong, Q., Surewicz, W.K., Petersen, R.B., Zou, W., Chen, S.C., Gambetti, P., Parchi, P., Capellari, S., Goldfarb, L., Montagna, P., Lugaresi, E., Piccardo, P., Ghetti, B. (2004)
Chapter 14: Inherited Prion Diseases. Biophysical background of inherited prion diseases
S.693-697 in: *Prion biology and Diseases. Second Edition.*
Stanley Prusiner (Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press 2004
- Korth, C., May, B.C., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. (2001)
Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease
PNAS USA 98(17): 9836-41
- Krebs, M.R.H., Bromley, E.H.C., Donald A.M. (2004)
The binding of Thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications
Journal of Structural Biology 149: 30-37
- Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E. and DeArmond, S. J. (1986)
Scrapie prion proteins are synthesized in neurons
Am. J. Pathol. 122: 1-5
- Kretzschmar, H. (2001)
Kapitel 26: Die Pathologie und Genetik der Prionkrankheiten beim Menschen. In: *Prionen und Prionkrankheiten.*
Hörnlimann, B., Riesner, D. & Kretzschmar, H. (Hrsg.), De Gruyter, Berlin

- Kumar, J., Sreeramulu, S., Schmidt, T.L., Richter, C., Vonck, J., Heckel, A., Glaubitz, C., Schwalbe, H. (2010)
Prion protein amyloid formation involves structural rearrangements in the C-terminal domain.
Chembiochem 11(9):1208-13
- Kuwata, K., Li, H., Yamada, H., Legname, G., Prusiner, S.B., Akasaka, K., James, T.L. (2002)
Locally disordered conformer of the hamster prion protein: a crucial intermediate to PrPSc?
Biochemistry 41(41):12277-83
- Ladner, R.C., Sato, A.K., Gorzelany, J., de Souza, M. (2004)
Phage display-derived peptides as therapeutical alternatives to antibodies
Drug Discovery Today 9(12): 525-9
- Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227: 680-85
- Lasmezas, C. I., Desley, J. P., Demaimay, R. (1996)
BSE transmission to macaques
Nature 381: 743-44
- Leffers, K.-W., Schell, J., Jansen, K., Lucassen, R., Kaimann T., Nagel-Steger, L., Tatzelt, J., Riesner, D. (2004)
The Structural Transition of the Prion Protein into its Pathogenic Conformation is Induced by Unmasking Hydrophobic Sites
J. Mol. Biol. 244: 839–53
- Leffers, K. W., Wille, H., Stöhr, J., Junger, E., Prusiner, S. B., Riesner D. (2005)
Assembly of natural and recombinant prion protein into fibrils
Biol. Chem. 386(6): 569-80
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. (2004)
Synthetic mammalian prions
Science 305: 673-6
- Leopoldt, J.G. (1759)
Der Trab ist auch eine Krankheit der Schafe, und ist ansteckend.
In: „Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zu der Landwirtschaft“ Christian Friedrich Günthern, Berlin und Glogau, 1759
- LeVine, H (2003)
Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with Thioflavin T.
Methods Enzymol. 309: 274-84

- Li, L., Napper, S., Cashman, N.R. (2010)
Immunotherapy for prion diseases: opportunities and obstacles.
Immunotherapy 2(2): 269-82
- 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: 5362-77
- Lu, X., Wintrode, P.L., Surewicz, W.K. (2007)
Beta-sheet core of human prion protein amyloid fibrils as determined by hydrogen/deuterium exchange.
PNAS 104(5):1510-5
- Marciano, P.G., Brettschneider, J., Manduchi, E., Davis, J.E., Eastman, S., Raghupathi, R., Saatman, K.E., Speed, T.P., Stoeckert, C.J.Jr., Eberwine, J.H., McIntosh, T.K. (2004)
Neuron-specific mRNA complexity responses during hippocampal apoptosis after traumatic brain injury
J. Neurosci. 24: 2866-76
- 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: 104-10
- Masters, C.L., Gajdusek, D.C., Gibbs, C.J. Jr. (1981)
Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies
Brain 104(3): 559-88
- May, B.C., Fafarman, A.T., Hong, S.B., Rogers, M., Deady, L.W., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. (2003)
Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bis-acridines
PNAS USA 100(6): 3416-21
- McKenzie, D., Kaczkowski, J., Marsh, R., Aiken J. (1994)
Amphotericin B delays both scrapie agent replication and PrP-res accumulation early in infection
J. Virol. 68(11): 7534-6
- McKinley, M.P., Meyer, R.K., Kenaga, L., Rahbar, F., Cotter, R., Serban, A., Prusiner, S.B. (1991)
Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis
J. Virol. 65(3): 1340-51

- Mehlhorn, I., Groth, D., Stockel, J., Moffat, B., Reilly, D., Yansura, D., Willet, 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: 5528-37
- Meli, M., Gasset, M., Colombo, G. (2011)
Dynamic diagnosis of familial prion diseases supports the β 2- α 2 loop as a universal interference target.
PLoS One 6(4):e19093
- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M., Iqbal, K. (1981)
Abnormal fibrils from scrapie-infected brain
Acta Neuropathol. 54: 63-74
- Meyer, R.K., Lustig, A., Oesch, B., Fatzer, R., Zurbriggen, A., Vandevelde, M. (2000)
A monomer-dimer equilibrium of a cellular prion protein (PrPC) not observed with recombinant PrP.
J. Biol. Chem. 275(48):38081-87
- Miller, M.B., Geoghegan, J.C., Supattapone, S. (2011)
Dissociation of infectivity from seeding ability in prions with alternate docking mechanism.
PLoS Pathog. 7(7):e1002128.
- 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(5486): 1925-8
- Nakajima, M., Yamada, T., Kusahara, T., Furukawa, H., Takahashi, M., Yamauchi, A., Kataoka, Y. (2004)
Results of quinacrine administration to patients with Creutzfeldt-Jakob disease
Dement Geriatr Cogn Disord. 17(3): 158-63
- Newbery, E.J. (1979)
The Variation of the critical micelle concentration of sodium dodecyl sulphate with ionic strength monitored by selective-ion membrane electrodes.
Colloid & Polymer Sci. 257: 773-5
- Nico, P.B., de-Paris, F., Vinade, E.R., Amaral, O.B., Rockenbach, I., Soares, B.L., Guarnieri, R., Wichert-Ana, L., Calvo, F., Walz, R., Izquierdo, I., Sakamoto, A.C., Brentani, R., Martins, V.R., Bianchin, M.M. (2005)
Altered behavioural response to acute stress in mice lacking cellular prion protein
Behav Brain Res. 162(2): 173-81

- 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., Prusiner, S.B., Weissmann, C. (1985)
A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein
Cell 40: 735-46
- 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 alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins
PNAS 90: 10962-66
- Paramithiotis, E., Pinard, M., Lawton, T., LaBoissiere, S., Leathers, V.L., Zou, W.Q., Estey, L.A., Lamontagne, J., Lehto, M.T., Kondejewski, L.H., Francoeur, G.P., Papadopoulos, M., Haghghat, A., Spatz, S.J., Head, M., Will, R., Ironside, J., O'Rourke, K., Tonelli, Q., Ledebur, H.C., Chakrabarty, A., Cashman, N.R. (2003)
A prion protein epitope selective for the pathologically misfolded conformation.
Nat Med. 9(7):893-9
- Pattison, I. H., Hoare, M. N., Jebbett, J. N. and Watson, W. A. (1974)
Further observations on the production of scrapie in sheep by oral dosing with Foetal membranes from scrapie-affected sheep
Br. Vet. J. 130: 115-7
- Peretz, D., Williamson, R.A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I.R., Legname, G., Wormald, M.R., Rudd, P.M., Dwek, R.A., Burton, D.R., Prusiner, S.B. (2001)
Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity
Nature 412(6848): 739-43
- Perrier, V., Wallace, A.C., Kaneko, K., Safar, J., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. (2000)
Mimicking dominant negative inhibition of prion replication through structure-based drug design
PNAS USA 97(11): 6073-8
- Piro, J.R., Wang, F., Walsh, D.J., Rees, J.R., Ma, J., Supattapone, S. (2011)
Seeding specificity and ultrastructural characteristics of infectious recombinant prions.
Biochemistry 50(33):7111-6
- Pitschke, M. (1999)
Mechanismus der Multimerisierung von Prion-Proteinen als Basis eines biophysikalischen Diagnoseverfahrens von spongiformen Encephalopathien und der Alzheimer Erkrankung. Dissertation Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- Poncet-Montange, G., St.Martin, S.J., Bogatova, O.V., Prusiner, S.B., Shoichet, B.K., Ghaemmaghami, S. (2011)
A Survey of Antiprion Compounds Reveals the Prevalence of Non-PrP Molecular Targets.
J Biol Chem. 286(31):27718-28
- Post, K., Pitschke, M., Schaefer, 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(11): 1307-17
- Prado, M.A.M., Alves-Silva, J., Magalhaes, A.C., Prado, V.F., Linden, R., Martins, V.R., Brentani, R.R. (2004)
PrP^C on the road: trafficking of the cellular prion protein
J. Neurochem. 88: 769-81
- 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(7):3299-3305
- Priola, S.A., Raines, A., Caughey, W.S. (2000)
Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds
Science 287(5457): 1503-6
- Proske, D., Gilch, S., Wopfner, F., Schätzl, H.M., Winnacker, E.L., Famulok, M. (2002)
Prion-protein-specific aptamer reduces PrPSc formation
Chembiochem. 3(8): 717-25
- Prusiner, S.B., Groth, D.F., McKinley, M.P., Chochran, S.P., Bowman, K.A., Kasper, K.C. (1981)
Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent
PNAS 78: 4606-10
- Prusiner, S.B. (1982)
Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.
Science 216: 136-44
- Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F., Glenner, G. G. (1983)
Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods
Cell 35(1): 349-58
- Prusiner, S.B., Scott, M., Foster, D., Pan, K-M., Groth, D., Mirenda, C., Torchia, M., Yang, S. L., Serban, D., Carlson, G. A., Hoppe, P. C., Westaway, D., DeArmond J. (1990)
Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication
Cell 63: 673-86

- Prusiner, S.B. (1998)
Prions.
PNAS 95(23): 13363-83
- Prusiner, S.B., May, B.C.H., Cohen, F.E. (2004)
Chapter 18: Therapeutic Approaches to Prion Diseases.
In: *Prion biology and Diseases. Second Edition.*
Stanley Prusiner (Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press 2004
- Rachidi, W., Vilette, D., Guiraud, P., Arlotto, M., Riondel, J., Laude, H.,
Lehmann, S., Favier, A. (2003)
Expression of prion protein increases cellular copper binding and
antioxidant enzyme activities but not copper delivery
J. Biol. Chem. 278: 9064-72
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., Wüthrich, K.
(1996)
NMR structure of the mouse prionprotein domain PrP (121-231)
Nature 382: 180-2
- 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: 1714-22
- Riesner, D., Birkmann, E., Dumpitak, C., Elfrink, K., Kellings, K., Leffers, K.-W.,
Nagel-Steger, L., Stöhr, J. (2006)
Von PrP-Monomeren zu PrP-Fibrillen und Infektiosität
Nova Acta Leopoldina 347: 61-77
- Rigler, R. & Elson, E. (2001)
Fluorescence correlation spectroscopy: theory and applications.
Springer Verlag
- Roos, R., Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. Jr. (1973)
The clinical characteristics of transmissible Creutzfeldt-Jakob disease
Brain 96: 1-20
- Roucou, X., LeBlanc, A.C. (2005)
Cellular prion protein neuroprotective function: implications in prion
disease
J. Mol. Med. 83: 3-11
- Saborio, G. P., Permanne, B., Soto, C. (2001)
Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of
protein misfolding
Nature 411(14): 810-3

- 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: 20276-84
- 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
Nature Med. 4: 1157-65
- Safar, J.G., Kellings, K., Serban, A., Groth, D., Cleaver, J.E., Prusiner, S.B., Riesner, D. (2005)
Search for a Prion-Specific Nucleic Acid
J. Virol. 79(16): 10796-806
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989)
Molecular cloning: A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York, Second Edition
- Santuccione, A., Sytnyk, V., Leshchyns'ka, I., Schachner, M. (2005)
Prion protein recruits its neuronal receptor NCAM to lipid rafts to activate p59fyn and to enhance neurite outgrowth
J. Cell. Biol. 169(2): 341-54
- Sawaya, M.R., Sambashivan, S., Nelson, R., Ivanova, M.I., Sievers, S.A., Apostol, M.I., Thompson, M.J., Balbirnie, M., Wiltzius, J.J., McFarlane, H.T., Madsen, A.Ø., Riek, C., Eisenberg, D. (2007)
Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers.
Nature 447(7143):453-7
- 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(5): 1209-25
- Sethi, S., Lipford, G., Wagner, H., Kretzschmar, H. (2002)
Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity
Lancet 360(9328): 229-30
- Shindoh, R., Kim, C.L., Song, C.H., Hasebe, R., Horiuchi, M. (2009)
The region approximately between amino acids 81 and 137 of proteinase K-resistant PrP^{Sc} is critical for the infectivity of the Chandler prion strain.
J. Virol. 83(8):3852-60

- Sigurdsson, E.M., Sy, M.S., Li, R., Scholtzova, H., Kascsak, R.J., Kascsak, R., Carp, R., Meeker, H.C., Frangione, B., Wisniewski, T. (2003)
Anti-prion antibodies for prophylaxis following prion exposure in mice
Neurosci. Lett. 336(3): 185-7
- Silveira, J.R., Raymond, G.J., Hughson, A.G., Race, R.E., Sim, V.L., Hayes, S.F., Caughey, B. (2005)
The most infectious prion protein particles
Nature 437: 257-61
- Sinz, A. (2006)
Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three dimensional protein structures and protein-protein-interactions.
MassSpectrometry Reviews 25: 663-82
- Solforosi, L., Criado, J.R., McGavern, D.B., Wirz, S., Sanchez-Alavez, M., Sugama, S., DeGiorgio, L.A., Volpe, B.T., Wiseman, E., Abalos, G., Masliah, E., Gilden, D., Oldstone, M.B., Conti, B., Williamson, R.A. (2004)
Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo
Science 303(5663): 1514-6
- Soto, C., Kascsak, R.J., Saborio, G.P., Aucouturier, P., Wisniewski, T., Prelli, F., Kascsak, R., Mendez, E., Harris, D.A., Ironside, J., Tagliavini, F., Carp, R.I., Frangione, B. (2000)
Reversion of prion protein conformational changes by synthetic beta-sheet breaker peptides
Lancet 355(9199): 192-7
- Soto, C. (2006)
Chapter nine: Therapeutic approaches
In: *Prions - The New Biology of Proteins*
CRC Press 2006
- Soto, C. (2011)
Prion hypothesis: the end of the controversy?
Trends in Biochemical Sciences 36(3): 151-158
- 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
- Stöhr, J. (2007)
Biophysikalische Charakterisierung des Vorläufer- und Endzustandes von Fibrillen aus rekombinanten und natürlichen Prion-Proteinen
Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- Stöhr, J., Weinmann, N., Wille, H., Kaimann, T., Nagel-Steger, L., Birkmann, E., Panza, G., Prusiner, S.B., Eigen, M., Riesner, D. (2008)
Mechanism of prion protein assembly into amyloid.
PNAS 105(7): 2409-14
- Sturzenegger, M. & Will, R.G. (2007)
Clinical Findings in human Prion Diseases
Kapitel 30 in: *Prions in Humans and Animals*,
Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H., de Gruyter, Berlin
- Supattapone, S., Wille, H., Uyechi, L., Safar, J., Tremblay, P., Szoka, F.C., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Scott, M.R. (2001)
Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells
J. Virol. 75(7): 3453-61
- Tagliavini, F., McArthur, R.A., Canciani, B., Giaccone, G., Porro, M., Bugiani, M., Lievens, P.M., Bugiani, O., Peri, E., Dall'Ara, P., Rocchi, M., Poli, G., Forloni, G., Bandiera, T., Varasi, M., Suarato, A., Cassutti, P., Cervini, M.A., Larsen, J., Salmona, M., Post, C. (1997)
Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters
Science 276(5315): 1119-22
- Tatzelt, J., Prusiner, S.B., Welch, W.J. (1996)
Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein
EMBO J. 15(23): 6363-73
- Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rüdliche, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P.A., Manson, J.C. (1996)
Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein
Nature 380: 639-42
- Trevitt, C.R., Collinge, J. (2006)
A systematic review of prion therapeutics in experimental models
Brain 129: 2241-65
- Trifilo, M.J., Yajima, T., Gu, Y., Dalton, N., Peterson, K.L., Race, R.E., Meade-White, K., Portis, J.L., Masliah, E., Knowlton, K.U., Chesebro, B., Oldstone, M.B. (2006)
Prion-induced amyloid heart disease with high blood infectivity in transgenic mice
Science 313(5783): 94-7
- 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

- Tycko, R., Savtchenko, R., Ostapchenko, V.G., Makarava, N., Baskakov, I.V. (2010)
The α -helical C-terminal domain of full-length recombinant PrP converts to an in-register parallel β -sheet structure in PrP fibrils: evidence from solid state nuclear magnetic resonance.
Biochemistry 49(44):9488-97
- Tzaban, S., Friedlander, G., Schonberger, O., Horonchik, L., Yedidia, Y., Shaked, G., Gabizon, R., Taraboulos, A.(2002)
Protease-sensitive scrapie prion protein in aggregates of heterogeneous sizes
Biochemistry 41(42): 12868-75
- Umlong, I.M., Ismail, K. (2007)
Micellization behaviour of sodium dodecyl sulfate in different electrolyte media.
Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 299: 8-14
- van Groen, T., Wiesehan, K., Funke, S.A., Kadish, I., Nagel-Steger, L., Willbold, D. (2008)
Reduction of Alzheimer's disease amyloid plaque load in transgenic mice by D3, a D-enantiomeric peptide identified by mirror image phage display.
ChemMedChem 3: 1848-52
- Verity, N.C. & Malucci, G.R. (2011)
Rescuing neurons in prion disease.
Biochemical Journal 433: 19-29
- 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
PNAS USA 93: 14945-9
- Wang, F., Wang, X., Yuan,C.-G., Ma, J. (2010)
Generating a Prion with Bacterial Expressed Recombinant Prion Protein.
Science 327(5969): 1132-5
- Wang, F., Wang, X., Ma, J. (2011)
Conversion of bacterially expressed recombinant prion protein.
Methods 53:208-11
- Weissmann, C. (1994)
Molecular biology of prion diseases
Trends Cell Biol. 4: 10-14
- Weissmann, C., Aguzzi A. (2005)
Approaches to therapy of prion disease
Annu. Rev. Med. 56: 321-44

- Wiesehan, K., Willbold, D. (2003)
Mirror-image phage display: aiming at the mirror
Chembiochem. 4(9): 811-5
- Wilham, J.M., Orru, C.D., Bessen, R.A., Atarashi, R., Sano, K., Race, B.,
Meade-White, K.D., Taubner, L.M. Timmes, A., Caughey, B. (2010)
Rapid End-Point Quantitation of Prion Seeding Activity with Sensitivity
Comparable to Bioassays.
PLOS Pathogens 6(12): e 1001217. doi:10.1371
- Wille, H., Zhang, G.F., Baldwin, M.A., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. (1996)
Separation of scrapie prion infectivity from PrP amyloid polymers
J. Mol. Biol. 259(4): 608-21
- 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
PNAS USA 99(6): 3563-8
- Wille, H., Bian, W., McDonald, M., Kendall, A., Colby, D.W., Bloch, L.,
Ollesch, J., Borovinskiy, A.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Stubbs, G.
(2009)
Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction.
PNAS 106(40):16990-5
- Zerr, I. (2001)
Methods for the Clinical Diagnosis of Human Prion Diseases
Kapitel 31 in: *Prions in Humans and Animals*,
Hörnlimann, B., Riesner, D., Kretzschmar, H., de Gruyter, Berlin