

**Expression, Reinigung und
Charakterisierung von posttranslational
modifiziertem zellulärem Prion Protein aus
*Pichia pastoris***

Inaugural-Dissertation

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

Vorgelegt von
Jendrik Marbach
aus Wesel

Düsseldorf 2013

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

Abgabedatum: 25.11.2013

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 2013

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

Referent: Prof. Dr. Henrike Heise

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 25.11.2013

(Jendrik Marbach)

Daten aus dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Marbach J, Zentis P, Ellinger P, Muller H, Birkmann E (2013) Expression and characterisation of fully posttranslationally modified cellular prion protein in *Pichia pastoris*. *Biological chemistry* **394**: 1475-1483

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Zusammenfassung	VI
Summary	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen	1
1.2 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSEs)	1
1.3 Der Erreger: Das Prion	4
1.4 Die zelluläre Form des Prion Proteins	5
1.5 Funktion des zellulären Prion Proteins	9
1.6 Unterscheidung zwischen zellulärem Pr ^{PC} und krankheitsassoziiertem Pr ^{PSc}	10
1.7 NMR-Analysen und Pr ^{PC} -Expressionssysteme	11
1.8 Das <i>Pichia pastoris</i> Expressionssystem	15
1.9 Zielsetzung der Arbeit	26
2. Material	28
2.1 Chemikalien	28
2.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen	28
2.3 Kulturmedien	31
2.4 raft-like Liposomen	32
2.4.1 Lipide/Lipid-Puffer	32
2.4.2 Zusammensetzung von raft-like Liposomen	33
2.5 Verwendeter Expressionsvektor	34
2.6 Verwendete Antikörper	35
2.7 Verwendete Oligonukleotide	35
2.8 Transformierte und exprimierte Konstrukte in <i>P. pastoris</i>	36
3. Methoden	38
3.1 Molekularbiologische Methoden	38
3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
3.1.2 Kolonie PCR	38

3.1.3	Agarose Gelelektrophorese	39
3.1.4	Restriktionsverdau	39
3.1.5	Gelelution	40
3.1.6	Ligation	40
3.1.7	Plasmidpräparation	40
3.1.8	Konzentrationsbestimmung einer Nukleinsäurelösung	41
3.1.9	Sequenzierung	41
3.1.10	Natrium-Acetat DNA-Fällung	41
3.1.11	Transformation von elektrokompetenten <i>E. coli</i> Zellen	42
3.1.12	Herstellung elektrokompetenter <i>P. pastoris</i> Zellen	42
3.1.13	Transformation von elektrokompetenten <i>P. pastoris</i> Zellen	42
3.2	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	43
3.2.1	Protein Expression in <i>P. pastoris</i>	43
3.2.2	Zellaufschluss und Präparation der Hefe-Zellmembranen	44
3.2.3	PNGaseF Verdau	45
3.2.4	Proteinase K Verdau von PrP	45
3.2.5	Probenpräparation für die Fluoreszenzmikroskopie	46
3.2.6	Fluoreszenzmikroskopie	47
3.2.8	Reinigung von PrP aus <i>P. pastoris</i>	47
3.2.8.1	Solubilisierungsanalyse	47
3.2.8.2	Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)	48
3.2.8.3	reversed phase high performance liquid chromatography (rpHPLC)	49
3.2.9	Lyophilisierung des PrP	51
3.2.10	Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung	51
3.2.11	Zirculardichroismus Spektroskopie	51
3.2.12	Rekonstitution von PrP-GPI in Liposomen	53
3.2.12.1	Präparation kleiner unilamellarer Vesikel (SUV)	54
3.2.12.2	Trennung von Liposomen und Farbstoff	55
3.2.12.3	Rekonstitution von PrP in Liposomen	55
3.2.12.4	Dichtegradientenzentrifugation	56
3.2.12.5	Nachweis der Liposomenfraktionen	56
3.2.13	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	57
3.2.13.1	Nachweis von Proteinen mittels Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau	57
3.2.13.2	Nachweis von Proteinen mittels Silberfärbung	58
3.2.14	Western-Blot und Immunologischer Proteinnachweis	58
3.2.14.1	Dot Blot	58
3.2.14.2	Semi-Dry Western Blot	58
3.2.14.3	Immunologischer Proteinnachweis	59

3.2.15	Festkörper-NMR Analyse von membrangebundenem PrP	60
4.	Ergebnisse	63
4.1	<i>Klonierung</i>	63
4.1.1	PrP-GPI	63
4.1.2	Umklonierung der synthetisch hergestellten Konstrukte GFP-GPI/PrP-GPI-V	66
4.1.3	PrPΔSS/GFPΔSS	68
4.1.4	SHaPrP	70
4.2	<i>Expression von PrP in P. pastoris</i>	71
4.2.1	PrP-GPI	71
4.2.2	PrP-GPI und PrPΔSS	72
4.2.3	Vergleich aller PrP Konstrukte	73
4.3	<i>Glykosylierungsanalyse von PrP</i>	74
4.4	<i>Proteinase K Verdau von PrP</i>	75
4.5	<i>Expression von GFP in P. pastoris</i>	77
4.6	<i>Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der zellulären Lokalisation</i>	78
4.7	<i>Reinigung des PrP aus P. pastoris</i>	81
4.7.1	Solubilisierungsanalyse	81
4.7.2	Metallchelat - Affinitätschromatographie	83
4.7.3	Reversed phase high performance liquid chromatography	89
4.8	<i>Löslichkeitsscreen</i>	94
4.9	<i>Sekundärstrukturanalyse des PrP-GPI</i>	98
4.10	<i>Rekonstitution von PrP-GPI in raft-like Liposomen</i>	99
4.11	<i>Festkörper-NMR-Spektroskopie von Membran-gebundenem PrP^C</i>	102
5.	Diskussion	106
5.1	<i>Problematik der PrP-Expression in E. coli</i>	106
5.2	<i>Verwendung alternativer Membranverankerungen</i>	107
5.3	<i>Einfluss des GPI-Ankers</i>	109
5.4	<i>Expression von posttranslational modifiziertem Prion Protein</i>	109
5.5	<i>Expression des Prion Proteins in Hefen</i>	110
5.6	<i>SHa-PrP exprimiert in P. pastoris</i>	112
5.7	<i>Prozessierung in P. pastoris</i>	113
5.8	<i>Lokalisation des prozessierten Prion Proteins in der Zellmembran</i>	114
5.9	<i>Vergleich der Prion Protein Expressionssysteme</i>	115
5.10	<i>Reinigung von posttranslational modifiziertem PrP aus P. pastoris</i>	117
5.11	<i>Auftretende Proteindegradation</i>	118
5.12	<i>Sekundärstrukturanalyse des Prion Proteins aus P. pastoris</i>	119

Inhaltsverzeichnis	IV	
<hr/>		
5.13	<i>Rekonstitution von PrP^C in Modellmembranen</i>	120
5.14	<i>Festkörper-NMR-Analyse von membranverankertem PrP</i>	121
5.15	<i>Ausblick</i>	122
Literaturverzeichnis		125
Danksagung		143
Anhang		145

Zusammenfassung

Prionkrankheiten sind fatale neurodegenerative Erkrankungen in Mensch und Tier, welche eine spontane, genetische oder infektiöse Ätiologie aufweisen können. Die Erreger der Prionkrankheiten sind Prionen, deren Hauptbestandteil die krankheitsassoziierte Isoform des Prion Proteins (PrP^{Sc}) darstellt. Das Prion Protein ist ein wirtseigenes, posttranslational modifiziertes Membranprotein, das ebenfalls im gesunden Organismus exprimiert wird (PrP^C). Dabei ist das Prion Protein über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) in der Zellmembran inkorporiert. Es wird angenommen, dass die Konversion von PrP^C in die fehlgefaltete Isoform PrP^{Sc} an oder in der Nähe der Zellmembran stattfindet und die Integration des Prion Proteins in der Zellmembran durch den GPI-Anker entscheidend ist. Aus diesem Grund sind Strukturdaten von membranassoziiertem PrP^C von großer Bedeutung. Die meisten bisher durchgeführten Experimente und gewonnenen Strukturdaten basieren auf löslichem, rekombinantem PrP (recPrP), welches in *E. coli* exprimiert wurde. Auf Grund der Expression in *E. coli* wird recPrP nicht posttranslational modifiziert und weist weder Glykosylierungen noch die Modifikation mittels GPI-Anker auf.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression sowie die Reinigung von vollständig modifiziertem Prion Protein in dem eukaryotischen *Pichia pastoris*-System zu etablieren. Darauffolgend sollte das exprimierte PrP^C auf seine posttranslationalen Modifikationen hin analysiert und erste strukturelle Daten von PrP^C in Membranumgebung gewonnen werden.

Im Zuge der Arbeit konnte gezeigt werden, dass PrP^C in verschiedenen, glykosylierten Isoformen erfolgreich in *P. pastoris* exprimiert und prozessiert wird. Das exprimierte PrP^C ist durch den GPI-Anker in der Zellmembran lokalisiert. Dies konnte durch einen Vergleich mit dem löslichen Modellprotein GFP, mit und ohne PrP^C-spezifische Signalsequenzen, bestätigt werden.

Des Weiteren wurde die Reinigung des PrP^Cs etabliert, wodurch erstmals vollständig modifiziertes PrP^C für NMR-Strukturanalysen in ausreichend großen Mengen bereitgestellt werden konnte. Das exprimierte und gereinigte PrP^C weist eine für zelluläres PrP^C bekannte, großteils α -helikale Struktur auf. Neben der Expression und Reinigung des PrP^C konnte die GPI-Anker-vermittelte Interaktion von PrP^C mit *raft-like* Liposomen durch Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation gezeigt werden. Schließlich wurden erste Festkörper-NMR-Spektren von membrangebundenem PrP^C aufgenommen, wobei für einige spezifisch zugeordnete Aminosäuren erste Aussagen zu deren lokalen Sekundärstrukturmerkmalen getroffen werden konnten.

Summary

Prion diseases are fatal neurodegenerative diseases with infectious, spontaneous or genetic etiology. The main component of prions is the disease-associated isoform of the prion protein (PrP^{Sc}). The prion protein is a host encoded cellular membrane protein (PrP^C) that is glycosylated and attached to the cell membrane via a glycosylphosphatidylinositol-anchor (GPI-anchor). It is likely, that conversion of non-infectious PrP^C into infectious PrP^{Sc} occurs in close proximity to the outer cell membrane. Furthermore it was shown that attachment to the cell membrane via a GPI-anchor is crucial for the conversion process. For elucidating the mechanism it is highly important to obtain structural data of membrane-attached PrP^C. Up to now many studies on PrP, including the NMR-solved structure of PrP, were determined utilizing recombinant PrP (recPrP), which is expressed in *E. coli*. recPrP is not posttranslationally modified and lacks both glycosylation and GPI-anchor, respectively.

The aim of this study was the expression and purification of fully posttranslationally modified PrP^C in the eukaryotic expression system *Pichia pastoris*. Moreover posttranslational modifications should be analyzed and first structural data of membrane attached PrP^C should be obtained.

In this work, expression and posttranslational processing of Syrian golden Hamster PrP^C including its native N- and C-terminal signal sequences in the yeast *P. pastoris* was established. The GPI-anchor mediated membrane localization was shown and confirmed by the analysis of green fluorescent protein as a model protein with and without PrP-specific signal sequences respectively. PrP^C glycosylation could be verified using PNGaseF.

Moreover a purification protocol for PrP^C was developed providing sufficient amounts of fully modified PrP^C for NMR-measurements. The purified, soluble PrP^C showed a typical α -helical secondary structure. Furthermore the GPI-anchor modification was proven by interaction studies of PrP^C with *raft-like* liposomes utilizing sucrose gradient centrifugation. In addition solid-state NMR-measurements of membrane bound PrP^C were conducted and first secondary structure information of some few specific assigned amino acids were obtained.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
(v/v)	„volume per volume“; Volumenprozent
(w/v)	„weight per volume“; Gewichtsprozent
ACN	Acetonitril
AD	„Alzheimer’s disease“; Alzheimer Krankheit
AOX	Alkoholoxidase
Aq. dest.	Deionisiertes, sterilfiltriertes Wasser
AS	Aminosäure
α Syn	α Synuclein
A β	Abeta-Peptid
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CAT	Katalase
CB	Cerebroside
CBS	„citrate buffered saline“; Citrat gepufferte Salzlösung
CD	Zirkular-Dichroismus
CHO	„chinese hamster ovary“; Zelllinie aus Ovarienzellen des chin. Hamsters
Chol	Cholesterol
CJD	„Creutzfeldt-Jakob-disease“; Creutzfeldt-Jakob Krankheit
CWD	„Chronic wasting disease“; Chronische Auszehrungskrankheit
DHAS	Dihydroxyaceton Synthase
DIC	Differentialinterferenzkontrast
DMPC	Dimyristolphosphatidylcholin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRM	„detergent-resistant membrane“
EPL	„expressed protein ligation“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
fCJD	Familiäre Creutzfeldt-Jakob Krankheit
FFI	fatale familiäre Insomnie
FSE	Feline spongiforme Enzephalopathie
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GdnHCl	Guanidinhydrochlorid
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
GSS	Gerstmann-Sträussler-Schenker-Syndrom
huPrP	Humanes PrP
iCJD	Iatrogene Creutzfeldt-Jakob Krankheit
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie
LB	„lysogeny broth“
MLV	multilamellare Vesikel
moPrP	Maus-PrP
MW	Molekulargewicht
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaPi	Natriumphosphat
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure

NMR	„nuclear magnetic resonance“; Kernspinresonanz
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBS	„phosphate buffered saline“; phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	„Polymerase chain reaction“; Polymerase-Kettenreaktion
PD	„Parkinson’s disease“; Parkinson
PI-PLC	phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C
PK	Proteinase K
PRNP	Gen des Prion Proteins
PrP	Prion Protein
recPrP	„recombinant prion protein“; rekombinantes Prion Protein
rpm	„revolutions per minute“; Umdrehungen pro Minute
rpHPLC	„reversed phase high performance liquid chromatography“
RT	Raumtemperatur
SDS	„sodium dodecyl sulfate“; Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Gelelektrophorese
SHa	„syrian hamster“; Goldhamster
SHa-PrP	PrP des syrischen Goldhamsters
SM	Sphingomyelin
SUV	kleine unilamellare Vesikel
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	„Tris buffered saline Tween“; Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween
TME	Transmissible Nerz-Enzephalopathie
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
vCJD	Variante Creutzfeldt-Jakob Krankheit
VSG	„Variant Surface Glycoprotein“
YPD	„Yeast Extract Peptone Dextrose“
ZNS	Zentralnervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der Aminosäuresequenz und der Strukturmerkmale des zellulären Prion Proteins.	6
Abbildung 2: Biosynthese des zellulären Prion Proteins	7
Abbildung 3: Grundstruktur eines GPI-Ankers.....	8
Abbildung 4: Vergleich der Proteinase K Sensitivität von PrP ^C und PrP ^{Sc} durch Western Blot Analyse.....	10
Abbildung 5: NMR-Struktur von Maus PrP (AS 23-224)	12
Abbildung 6: Schema Asparagin-verlinkter Glykosylierungs-Pathways.....	17
Abbildung 7: Verwendete Lipide in der raft-like Lipidmischung	33
Abbildung 8: Vektorkarte des Expressionsvektors pPICzA von Invitrogen.....	34
Abbildung 9: Verwendetes Chromatographieprogramm zur HPLC-Reinigung von PrP ^{ΔSS} sowie PrP-GPI	50
Abbildung 10: CD-Spektren bekannter Sekundärstrukturelemente.....	52
Abbildung 11: Schematischer Mechanismus der Vesikel-bildung:	54
Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines semi-dry Western Blots.....	59
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Konstrukts PrP-GPI.....	64
Abbildung 14: 1,5 %iges Agarosegel nach erfolgter PCR.....	64
Abbildung 15: Restriktionsverdau des.....	65
Abbildung 16: Schematische Darstellung des Konstrukts PrP-GPI-V.....	66
Abbildung 17: Schematische Darstellung des Konstrukts GFP-GPI	66
Abbildung 18: Restriktionsverdau der Expressionsvektoren pPICzA-PrP-GPI-V und pPICzA-GFP-GPI mit den Restriktionsendonukleasen EcoR I / Apa I.....	67
Abbildung 19: Schematische Darstellung des Konstrukts PrP ^{ΔSS}	68
Abbildung 20: Schematische Darstellung des Konstrukts GFP ^{ΔSS}	68
Abbildung 21: 1,5 %iges Agarosegel nach erfolgter PCR.....	69
Abbildung 22: Restriktionsverdau der Expressionsvektoren pPICzA-PrP ^{ΔSS} und pPICzA-GFP ^{ΔSS} mit EcoR I / Apa I	70
Abbildung 23: Schematische Darstellung des Konstrukts SHaPrP.....	70
Abbildung 24: Expressionskontrolle und Überprüfung der zellulären Lokalisation durch Western Blot des Konstrukts PrP-GPI.	71
Abbildung 25: Expressionskontrolle und Vergleich der zellulären Lokalisation von PrP ^{ΔSS} und PrP-GPI durch Western Blot	72
Abbildung 26: Expressionskontrolle und Vergleich aller PrP Konstrukte mittels Western Blot	73
Abbildung 27: Glykosylierungsanalyse von PrP-GPI exprimiert in <i>P. pastoris</i>	74
Abbildung 28: Proteinase K-Analyse der exprimierten Konstrukte PrP-GPI und PrP ^{ΔSS}	76
Abbildung 29: Proteinase K-Analyse der exprimierten Konstrukte PrP-GPI und PrP ^{ΔSS} im Vergleich zu einer Probe Scrapie-infizierten-Hirnhomogenates.....	77
Abbildung 30: Expressionskontrolle und Vergleich der zellulären Lokalisation von GFP-GPI und GFP ^{ΔSS}	78
Abbildung 31: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der zellulären Lokalisation von GFP ^{ΔSS} und GFP-GPI.....	79
Abbildung 32: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der zellulären Lokalisation von PrP ^{ΔSS} und PrP-GPI.....	80

Abbildung 33: Western Blot der Solubilisierung von 5 mg/ml Ganzzellmembranen aus <i>P. pastoris</i> mit nativem Puffer.	82
Abbildung 34: Western Blot der Solubilisierung von 5 mg/ml Ganzzellmembranen aus <i>P. pastoris</i> mit denaturierendem Puffer.	83
Abbildung 35: Exemplarisches Chromatogramm eines Ni-NTA IMAC-Laufs (GdnHCl-Puffer).....	84
Abbildung 36: Coomassie gefärbtes PAA-Gel der Ni-NTA Reinigung von PrP Δ SS.....	85
Abbildung 37: Western Blot der Ni-NTA-Elutionsfraktionen des Konstrukts PrP Δ SS.....	86
Abbildung 38: Coomassie gefärbtes PAA-Gel der Ni-NTA Reinigung von PrP-GPI.....	87
Abbildung 39: Western Blot der Ni-NTA-Elutionsfraktionen des Konstrukts PrP-GPI.....	87
Abbildung 40: Analyse der Elutionsfraktionen der SDS-IMAC Reinigung von PrP-GPI.....	88
Abbildung 41: Chromatogramm der HPLC-Läufe unterschiedlicher Elutionsfraktionen nach der Ni-NTA-Reinigung des Konstrukts PrP Δ SS.....	90
Abbildung 42: Coomassie-gefärbtes PAA-Gel und Western Blot der vereinigten Peaks bei 12,7 min und 13,3 min nach HPLC Reinigung des Konstrukts PrP Δ SS.....	91
Abbildung 43: Chromatogramm eines HPLC-Läufes nach der Ni-NTA-Reinigung des Konstrukts PrP-GPI.....	92
Abbildung 44: Analyse der PrP-GPI HPLC-Fraktionen 16-20 durch Western Blot.....	93
Abbildung 45: Analyse der PrP-GPI HPLC-Fraktionen 16-20 durch Silberfärbung.....	93
Abbildung 46: Coomassie-gefärbtes PAA-Gel und Western Blot des HPLC gereinigten PrP-GPI Konstruktes...	94
Abbildung 47: Erster Löslichkeitsscreen von PrP-GPI in verschiedenen Puffern.....	95
Abbildung 48: Analyse der maximalen Löslichkeit von PrP-GPI in Aq. dest. und NaPi (0,1 % SDS).....	96
Abbildung 49: Western Blot und SDS PAGE Analyse von resuspendiertem PrP-GPI in NaPi (0,1 % SDS) und Aq. dest. aus dem Löslichkeitstest.....	97
Abbildung 50: Analyse der Sekundärstruktur von PrP-GPI in zwei verschiedenen Puffern.....	98
Abbildung 51: Relative Fluoreszenzintensität der Dichtegradientfraktionen nach TritonX100 Zugabe.....	100
Abbildung 52: Rekonstitutionsexperiment von PrP-GPI in raft-like Liposomen.....	101
Abbildung 53: Western Blot der ^{13}C -SHA-PrP Probe für Festkörper- NMR.....	102
Abbildung 54: 2D-(^{13}C - ^{13}C)-Korrelationsspektrum eines vorgereinigtem PrP $^{\text{C}}$ -GPI-Membranpellets.....	103
Abbildung 55: Grafische Darstellung der sekundären chemischen Verschiebungen.....	104

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersicht der Prionkrankheiten bei Mensch und Tier</i>	<i>3</i>
<i>Tabelle 2: Vergleich der Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}</i>	<i>11</i>
<i>Tabelle 3: Zusammensetzung der raft-like Lipidmischung</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Antikörper.</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 5: Zur Klonierung und Sequenzierung verwendete Primer.....</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 6: Verwendete PrP- und GFP- Konstrukte</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 7: PCR Schema für alle Klonierungs PCR Reaktionen mit der Phusion DNA Polymerase.</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 8: PCR Schema für alle Kolonie PCR Reaktionen mit der MyTag HS DNA Polymerase.....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 9: Verwendete Messparameter der CD-Messungen.....</i>	<i>53</i>
<i>Tabelle 10: Schaubild der verschiedenen Kombinationen von Puffer und Detergenz zur Solubilisierung von PrP-GPI aus Zellmembranen.</i>	<i>81</i>
<i>Tabelle 11: Berechnung der sekundären chemischen Verschiebungen.....</i>	<i>104</i>
<i>Tabelle 12: Auflistung der bisher publizierten PrP-Expressionen in Hefen.</i>	<i>112</i>
<i>Tabelle 13: Vergleich verschiedener PrP-Expressionssysteme.....</i>	<i>117</i>

1. Einleitung

1.1 *Neurodegenerative Erkrankungen*

Neurodegenerative Erkrankungen sind geprägt durch Schädigungen des Gehirns bzw. des zentralen Nervensystems (ZNS). Auftreten können sie in unterschiedlichsten Lebensaltern, jedoch hauptsächlich bei älteren Personen. Damit einhergehend ist der langsam fortschreitende, irreversible Verlust bzw. die Degeneration von Neuronen. Die auftretenden Symptome sind vor allem die Einschränkung der geistigen Leistungsfähigkeit sowie Störungen des Bewegungsapparates. Zu den bekanntesten neurodegenerativen Erkrankungen beim Menschen gehören die Alzheimer-Krankheit (AD), die Parkinson-Krankheit (PD) sowie die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD). Allen gemeinsam ist die Ablagerung von fehlgefalteten Proteinen, welche eine toxische Wirkung auf die Neuronen aufweisen. Im Falle von AD ist dies das β -Amyloid ($A\beta$), bei PD handelt es sich um α -Synuclein (α Syn) und bei CJD um das Prion Protein (PrP) (Ross *et al.*, 2004; Soto *et al.*, 2008).

1.2 *Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSEs)*

Im Gegensatz zu ausschließlich erblich bedingten oder sporadisch auftretenden neurodegenerativen Krankheiten zeichnen sich TSEs zusätzlich dadurch aus, dass sie innerhalb bzw. zwischen Spezies übertragbar (transmissibel) sind und zu einer schwammartigen Degeneration (spongiforme Enzephalopathie) des Gehirns führen. Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) kommen sowohl beim Menschen als auch beim Tier vor (Imran *et al.*, 2011). Die älteste beschriebene Krankheit, die mit TSEs in Verbindung gebracht wird, ist die Traberkrankheit (Scrapie) bei Schafen. Sie wurde bereits vor über 200 Jahren beschrieben (Leopoldt, 1759). Die Übertragbarkeit wurde 1936 durch Infektion gesunder Schafe mit Hirn- und Rückenmarksgewebe erkrankter Schafe nachgewiesen (Cuillè J., 1936). 1961 gelang die Transmission von Scrapie auf die Maus (Chandler, 1961) und 1975 die Übertragung auf den Goldhamster (Marsh *et al.*, 1975), was die Maus und den Hamster zu den bevorzugten Modellsystemen für TSEs machte. In den 1990er Jahren erlangten TSEs große Aufmerksamkeit durch das Auftreten der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) in Großbritannien. Nach der ersten Beobachtung der

Krankheit bei Rindern 1985, welche durch Bewegungsstörungen (Ataxie), Muskelzittern (Tremor) und Gewichtsverlust gekennzeichnet ist, wurde BSE 1987 als eigenständige Krankheit beschrieben (Wells *et al.*, 1987). Bereits ein Jahr später wurde ein Zusammenhang zwischen Scrapie bei Schafen und BSE bei Rindern berichtet (Wilesmith *et al.*, 1988). Im Falle humaner neurodegenerative Erkrankungen wurden TSEs erstmals 1920 durch Hans-Gerhard Creutzfeldt sowie Alfons Maria Jakob beschrieben, was zu der Bezeichnung Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) führte. Es wurde zu diesem Zeitpunkt jedoch noch kein Zusammenhang zu tierischen TSEs beschrieben (Creutzfeldt, 1920). Erste Ähnlichkeiten zwischen tierischen TSEs und der in Neu Guinea 1957 entdeckten, durch Endokannibalismus übertragenden Kuru-Krankheit beim Menschen, wurden 1959 durch Hadlow festgestellt (Hadlow, 1959). Die Übertragbarkeit dieser Krankheit konnte experimentell erstmals 1966 durch Transmission von Kuru auf Primaten durch Gajdusek nachgewiesen werden (Gajdusek *et al.*, 1966). Neueren Erkenntnissen zufolge kann CJD mit dem Verzehr von BSE-kontaminierten Lebensmitteln in Verbindung gebracht werden (Bruce *et al.*, 1997; Hill *et al.*, 1997; Lasmezas *et al.*, 1996). Zu den Symptomen der CJD-Krankheit zählen Koordinationsstörungen des Bewegungsapparates sowie die Einschränkung der kognitiven Leistungsfähigkeit, welche von Gedächtnisstörungen über Verwirrtheit bis hin zur späteren Demenz führen. Weitere bekannte TSEs sind verschiedene Varianten der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD), das Gerstmann-Sträussler-Schenker-Syndrom (GSS) und die fatale familiäre Insomnie (FFI) beim Menschen (Tabelle 1). Typische Charakteristika von TSEs sind die lang andauernde, symptomlose Inkubationszeit, gefolgt von einem raschen Krankheitsverlauf. Als pathologisches Hauptmerkmal gelten die lichtmikroskopisch sichtbaren, schwammartigen (spongiformen) Veränderungen im Gehirn, der Verlust von Nervenzellen und Hirngewebe. Diese entstehen durch eine fortschreitende Vakuolisierung des Neuropils und das Absterben der Neuronen. Der Verlust der Neuronen durch Apoptose führt letztlich zu einer Fehlfunktionen des Gehirns (Gray *et al.*, 1999). Durch die erhöhte Aktivität der Mikrogliazellen und Astrozyten werden zusätzlich auftretende Entzündungsreaktionen verursacht (Betmouni *et al.*, 1996; Masters *et al.*, 1981). Neben den neuromorphologischen Merkmalen treten extrazelluläre Proteinablagerungen in Form von Plaques auf. Diese Ablagerungen bestehen zu 10 % aus amyloiden Strukturen und zu 90 % aus amorphen Aggregaten (Jeffrey *et al.*, 1997). Allen unter dem Begriff TSE zusammengefassten Krankheiten ist gemein, dass sie durch nur einen Erreger verursacht werden. Der Hauptbestandteil des Erregers, die Prionen, bestehen hauptsächlich aus einer fehlgefalteten Form des Prion Proteins. In Anlehnung an das Prion Protein sind diese Krankheiten auch als Prionkrankheiten bekannt (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht der Prionkrankheiten bei Mensch und Tier

Krankheit	Mechanismus	Wirt
Creutzfeld-Jakob-Krankheit (CJD)		Mensch
Familiär (fCJD)	Keimbahnmutation im Gen des Prion Proteins	
Iatrogen (iCJD)	Infektion durch medizinische Eingriffe	
Neue Variante (vCJD)	Infektion durch kontaminierte Rinderprodukte	
sporadisch (sCJD)	Somatische Mutation oder spontane Fehlfaltung des Prion Proteins	
Gerstmann-Sträussler-Schenker-Syndrom (GSS)	Keimbahnmutation im Prion Protein-Gen	
Fatale familiäre Insomnie (FFI)	Keimbahnmutation im Prion Protein-Gen	
Kuru	Infektion durch Endokannibalismus	
Scrapie	Sporadisch oder durch Infektion	Schaf, Ziege
Bovine-spongiforme-Enzephalopathie (BSE)	Infektion durch kontaminiertes Futter	Rind
Chronische auszehrende Krankheit (CWD)	Unbekannt	Hirsch, Elch
Feline spongiforme Enzephalopathie (FSE)	Infektion durch kontaminiertes Futter	Katzen
Transmissible Nerz-Enzephalopathie (TME)	Infektion durch kontaminiertes Futter	Nerz

Quelle (Imran *et al.*, 2011)

1.3 *Der Erreger: Das Prion*

Lange Zeit wurden auf Grund der Tatsache einer sehr langen Inkubationszeit bis zum eigentlichen Ausbruch der Erkrankungen Viren als mögliche Erreger der TSE-Krankheiten vermutet (Cho, 1976; Diringer *et al.*, 1994). Bereits Ende der 60er Jahre belegten Untersuchungen von Alper *et al.* jedoch, dass es sich bei dem Erreger vermutlich nicht um ein Virus handelt. Alper *et al.* konnten nachweisen, dass Scrapie-infizierte Hirnextrakte trotz Behandlung mit Nukleinsäure-schädigender Strahlung ihre Infektiösität nicht verloren (Alper *et al.*, 1967). Zudem stellte sich das minimale Molekulargewicht des Scrapie-Erregers mit $\sim 2 \times 10^2$ kDa als zu klein für einen Virus heraus (Alper *et al.*, 1966). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse gab es bereits 1967 Vermutungen, dass der Scrapie-Erreger ein sich selbst replizierendes Protein sein könnte (Griffith, 1967). Weitere Untersuchungen durch Prusiner *et al.* Anfang der 80er Jahre führten zu der Erkenntnis, dass der Erreger durch nukleinsäuremodifizierende- /schädigende-Behandlung nicht beeinflusst wurde, jedoch durch die Behandlung mit proteindenaturierenden Methoden inaktiviert werden konnte (Prusiner *et al.*, 1981a; Prusiner *et al.*, 1981b). Durch weitere Analysen konnte die Übertragung durch Nukleinsäuren weitestgehend ausgeschlossen werden (Kellings *et al.*, 1992; Riesner *et al.*, 1993; Safar *et al.*, 2005). Auf Grund der Tatsache, dass alle Studien auf ein proteinöses Erregertypus hindeuteten, wurde 1982 durch Prusiner die „*protein-only*“-Hypothese postuliert. Diese besagt, dass es sich bei dem Erreger um ein proteinogenes, nukleinsäurefreies und infektiöses Agens handelt. Daraufhin wurde von Prusiner der Begriff des „Prions“ als Abkürzung für proteinogener, infektiöser Partikel („*proteinaceous infectious particle*“) geprägt (Prusiner, 1982). Der Begriff Prion grenzte diesen neuartigen Erreger mit seiner Resistenz gegenüber nukleinsäureschädigender Methoden und der Infektionsübertragung durch ein Protein an sich von den bisher bekannten Krankheitserregern ab. Nach der Entdeckung einer Proteinase K-resistenten Form eines Proteins in Gehirnen von Scrapie-infizierten Hamstern, welche in Gehirnen gesunder Hamster nicht nachgewiesen werden konnte, wurde dieses Protein als Prion Protein (PrP) deklariert. Es wurde als Hauptbestandteil von Prionen analysiert (Bolton *et al.*, 1982; McKinley *et al.*, 1983).

Analysen durch N-terminale Sequenzierungen und der Einsatz von DNA-Sonden führten zu der Erkenntnis, dass das Prion Protein durch ein körpereigenes Gen (*PRNP*) kodiert wird, welches im wirtseigenem Genom lokalisiert ist. Dabei konnte die Prion Protein-spezifische mRNA sowohl in gesunden, als auch Scrapie-infizierten Tieren nachgewiesen werden. (Chesebro *et al.*, 1985; Oesch *et al.*, 1985; Prusiner *et al.*, 1984). Da das für PrP kodierende

Gen in allen bis dato untersuchten Organismen zu finden war, diese jedoch keine Krankheitssymptome aufwiesen, wurde postuliert, dass das Prion Protein in verschiedenen Isoformen vorkommen kann. Diese Vermutung wurde durch die partielle Resistenz der infektiösen Form des Prion Proteins im Vergleich zur nicht infektiösen Form (Hay *et al.*, 1987) bestärkt. Die Existenz einer, in jedem Organismus vorkommenden, zellulären Form des Prion Proteins erklärt auch das Ausbleiben einer Immunantwort in einem erkrankten Organismus. Zur Unterscheidung der Proteinase-sensitiven, zellulären Form des Prion Proteins und der infektiösen, Proteinase-resistenten Form wurden die Begriffe PrP^C (*cellular*) und PrP^{Sc} (*scrapie*) eingeführt. Spätere Untersuchungen mit *PRNP*-Knockout-Tieren zeigten, dass für die Infektion eines Organismus das körpereigene exprimierte PrP essentiell ist. Knockout-Tiere, welche kein PrP exprimierten, konnten nicht infiziert werden (Bueler *et al.*, 1993). Legname *et al.* konnten 2004 in Versuchstieren eine Prionkrankheit auslösen, indem den Versuchstieren rekombinant exprimiertes, fibrilläres PrP injiziert wurde (Legname *et al.*, 2004). Darauf basierend konnte die Infektiosität in Folgeexperimenten gesteigert und die „protein-only“-Hypothese von Stanley B. Prusiner bewiesen werden (Colby *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010). 1997 wurde S. B. Prusiner mit dem Nobelpreis für Medizin für die Entdeckung von Prionen als Krankheitserreger ausgezeichnet.

1.4 Die zelluläre Form des Prion Proteins

Die zelluläre Form des Prion Proteins (PrP^C) ist ein 254 Aminosäuren langes Vorläuferprotein (bezogen auf das Prion Protein des syrischen Goldhamster, SHaPrP), welches in fast allen Geweben von Säugetieren exprimiert wird. Vermehrt ist die PrP-mRNA in den Nervenzellen nachzuweisen (Kretzschmar *et al.*, 1986). Neben einer N- und C-terminalen Signalsequenz welche N-terminal 22 Aminosäuren und C-terminal 23 Aminosäuren umfasst, weist die Sequenz fünf Octapeptid-Wiederholungen im Bereich des N-Terminus auf. Diese Sequenzwiederholungen besitzen eine hohe Affinität zu Cu²⁺-Ionen (Brown, 1999; Jackson *et al.*, 2001). Des Weiteren sind an den beiden Aminosäuren Asp¹⁸¹ und Asp¹⁹⁷ zwei Glykosylierungsstellen lokalisiert, sowie eine Disulfidbrücke zwischen Cys¹⁷⁹ und Cys²¹⁴. Ein hydrophober Bereich ist zwischen den Aminosäuren 111 und 134 zu finden, welcher als HC-Bereich bezeichnet wird. Der C-terminale Teil des Prion Proteins besteht aus α -helikalen Bereichen (AS 145-153, AS 166-168, AS 172-194, AS 200-226) und einem β -Faltblatt Bereich

(AS 129-133, AS 160-163)(Abbildung 1). Der N-terminale Bereich bis Aminosäure 120 wird als flexibel beschrieben (Riek *et al.*, 1997). In Abbildung 1 (Dumpitak, 2003) ist ein Schema der SHaPrP Aminosäuresequenz mit posttranslationalen Modifikationen und Strukturmerkmalen dargestellt.

SHa PrP^C

- 1 - 22 = ER signal peptide (cleaved)
- 23 - 231 = major prion protein
- 23 - 89 +
- 141 - 176 = miniprion (PrP 106)
- 23 - 27 = alcalic region I
- 34 - 39 +
- 45 - 50 = 2 hexarepeats
- 51 - 91 = 5 octarepeats (Cu²⁺ - Binding)
- 74 - 103 = PK cleavage site
- 90 - 231 = "protease resistant core"
- 101 - 106 = alcalic region II
- 106 - 126 = neurotoxic fragment
- 113 - 128 = conserved hydrophobic region
- 121 - 231 = NMR structure of rec SHa PrP
- 129 - 133 = β -strand I
- 145 - 153 = α -helix I
- 160 - 163 = β -strand II
- 166 - 168 = α -helix II
- 172 - 194 = α -helix III
- 179 - 214 = Sphingolipid binding domain
- 179/214 = Disulfide-bridge
- 181 = N-Glycosylation I
- 183 = mutagen T→A: accumulates intracellularly
- 197 = N-Glycosylation II
- 199 = mutagen T→A: accumulates intracellularly
- 200 - 226 = α -helix IV
- 231 = GPI-anchor
- 232 - 254 = GPI signal peptide (cleaved)

Amino acids at pH 7:
 negatively charged (acidic)
 positively charged (alcalic)
 neutral hydrophilic
 hydrophobic

according to:
 Bloben-N *et al.*, Cell (1986), 48: 417-428
 Donnie-O-G *et al.*, PNAS (1997), 94, 13452-13457
 Endo-T *et al.*, Biochem. (1989), 28, 8380-8388
 Ham-D-A, Clin. Microbiol. Rev. (1999), 12: 429-444
 James-T-L, *et al.*, PNAS (1997), 94, 1066-10091
 Mahfoud *et al.*, JBC (2002), 277, 11292-11296
 Olson-D *et al.*, Cell (1995), 80, 735-746
 PDB Entry 1B10, Dec 2002 (<http://www.rcsb.org>)
 Roggen-M *et al.*, Glycosci. (1992), 1, 101-109
 Russo-P-M *et al.*, PNAS (1999), 96: 13044-13049
 Stahl-N *et al.*, Cell (1987), 91: 229-240
 Stahl-N *et al.*, Biochem. (1990), 29: 8879-8884
 Stahl-N *et al.*, Biochem. (1992), 31: 5043-5053
 SWISS-Prot Entry P04273, Dec 2002 (<http://www.expasy.org>)
 Turk-E *et al.*, Eur. J. Biochem. (1988), 176, 21-30.

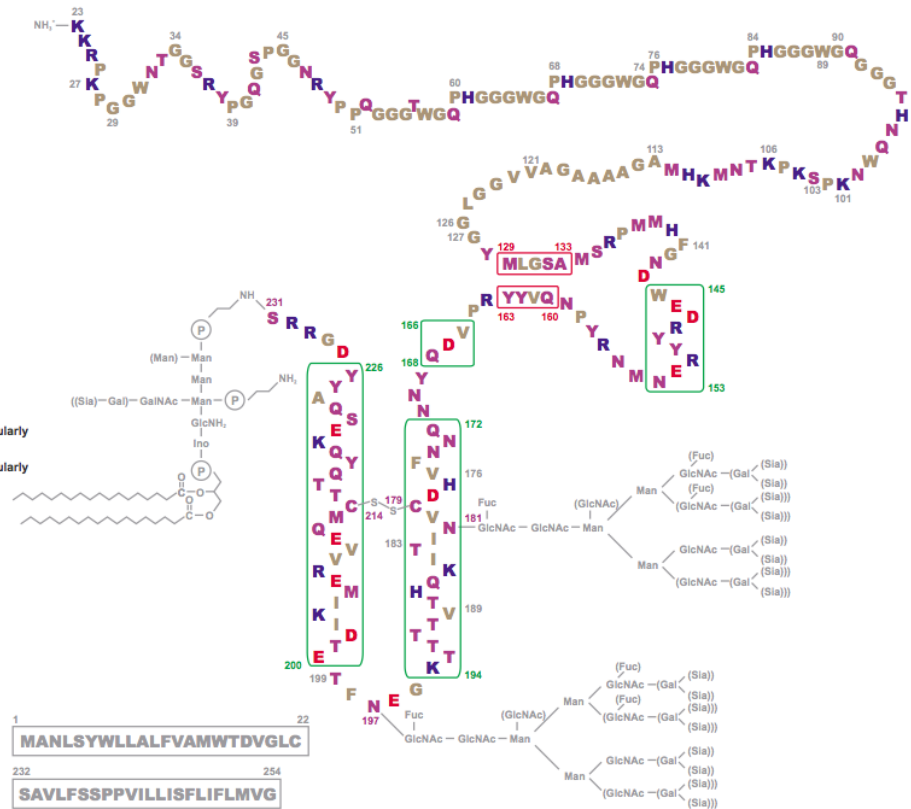


Abbildung 1: Schema der Aminosäuresequenz und der Strukturmerkmale des zellulärem Prion Proteins.
 (Abbildung entnommen aus Dumpitak, 2003)

Nach der Synthese des PrP^C an den Ribosomen kommt es zu einem cotranslationalen Transport der Aminosäurekette in das Endoplasmatische Retikulum (ER). Der Transport wird durch die hydrophobe N-terminale Signalsequenz initiiert und erfolgt über den Sec61-Komplex (Gorlich *et al.*, 1992; Meyer *et al.*, 1980; Sanders *et al.*, 1992). Nach Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz findet innerhalb des ER-Lumens die Glykosylierung der beiden Aminosäuren Asp¹⁸¹ und Asp¹⁹⁷ statt (Caughey *et al.*, 1989; Connolly *et al.*, 1989; Matlack *et al.*, 1998; Pohlschroder *et al.*, 1997). Die 23 C-terminalen Aminosäuren dienen als Erkennungssequenz zur Modifikation mittels eines Glykosylphosphatidylinositol-Ankers (GPI-Anker) (Stahl *et al.*, 1990). Der GPI-Anker wird nach Abspaltung der C-terminalen Signalsequenz auf Ser²³¹ übertragen (Abbildung 2).

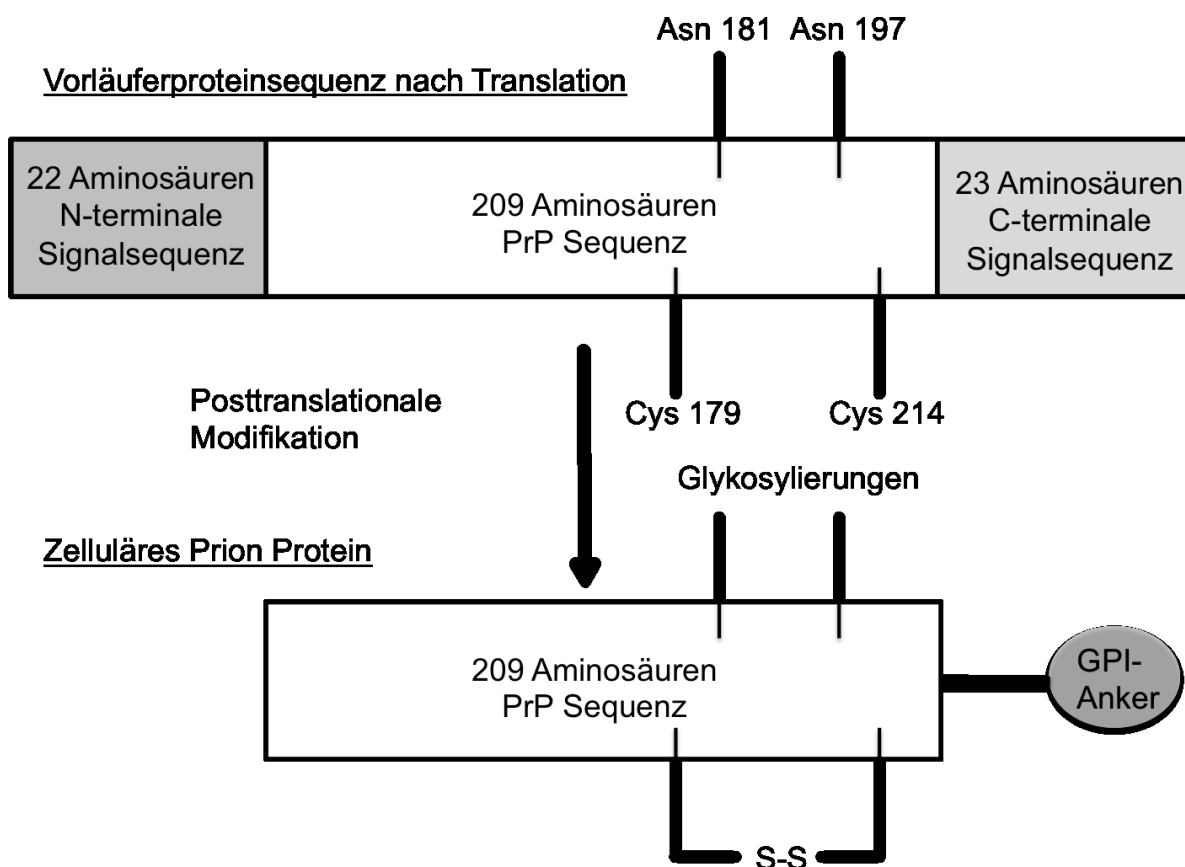


Abbildung 2: Biosynthese des zellulären Prion Proteins

Während der posttranslationalen Modifikation der Präproteinsequenz des PrPs erfolgt die Abspaltung der Signalsequenzen, die Glykosylierung, die Oxidation der Cysteine zur Disulfidbrücke, sowie die Modifikation mittels GPI-Anker am C-Terminus.

Das so posttranslational modifizierte Prion Protein wird vom ER zuerst zum Golgi-Apparat und schließlich zur Plasmamembran transportiert, wo es durch den GPI-Anker in der äußeren Zellmembran verankert wird (Shyng *et al.*, 1995). Die konservierte Grundstruktur des GPI-Ankers besteht aus Ethanolamin welches über eine Amidbindung an das Ser²³¹ gekoppelt ist, drei Mannose-Einheiten, einem unacetylierten Glucosamin und Phosphatidylinositol, welches mit einem Diacylglycerol verbunden ist. Über die beiden Fettsäureketten des Diacylglycerols ist der GPI-Anker in der Zellmembran verankert (siehe Abbildung 3) (Ikezawa, 2002; Stahl *et al.*, 1992; Stahl *et al.*, 1987). An den Mannose-Einheiten sind zahlreiche weitere Substitutionen möglich (Englund, 1993). Ebenso kann die Struktur eines GPI-Ankers für ein Protein innerhalb eines Organismus variieren. Dies wurde durch Untersuchungen an dem „Variant Surface Glycoprotein“ (VSG) von *Trypanosoma brucei* beschrieben, dessen GPI-Anker sich durch unterschiedliche Galaktose-Substitutionen am Mannose-Rückgrat auszeichnet (McConville *et al.*, 1993).

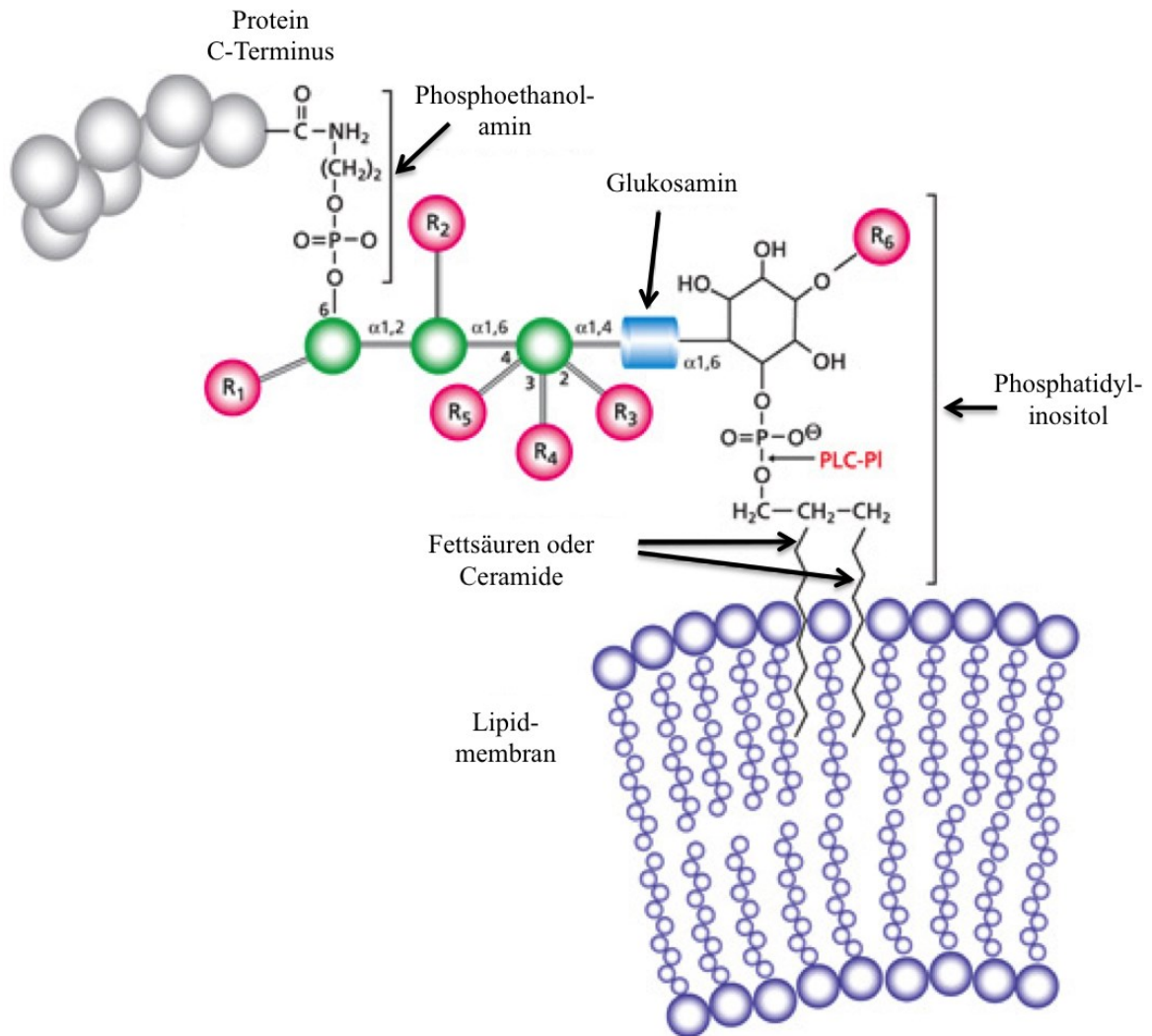


Abbildung 3: Grundstruktur eines GPI-Ankers

In grün sind die Mannose-Einheiten dargestellt, in rot mit R_1 - R_6 die möglichen Substituierungspositionen. PLC-PI: Phospholipase C. Abbildung modifiziert nach <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biology/Glycobiology/structure-of-gpi-anchored-proteins.jpg>

Entscheidend zur Entdeckung und Charakterisierung der GPI-Anker beigetragen hat deren Empfindlichkeit gegenüber hydrolytischen Phospholipasen (Udenfriend *et al.*, 1995). Durch Behandlung GPI-verankerter Proteine mit der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) werden die zuvor membranverankerten Proteine freigesetzt. Bevorzugt lokalisiert ist PrP^C in Cholesterin-reichen Mikrodomänen, den *lipid rafts* (Gorodinsky *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996). *Rafts* sind Membranmikrodomänen mit bestimmten chemischen Eigenschaften. Je nach Beschaffenheit können sich Membranproteine in bestimmten Mikrodomänen ansammeln. Die Zusammensetzung erlaubt eine distinkte, örtlich begrenzte Funktionalisierung der Membran. *Rafts* bestehen aus Cholesterin, Sphingolipiden und Cerebrosiden, können sich jedoch in ihrer Lipidzusammensetzung und damit auch Proteinzusammensetzung erheblich unterscheiden (Madore *et al.*, 1999). Eine weitere Eigenschaft dieser Mikrodomänen ist ihre

Unlöslichkeit nach Extraktion mit nicht-ionischen Detergenzien wie z.B. Triton X-100. Die Unlöslichkeit ist zurückzuführen auf die gesättigten Fettsäureketten der Phospholipide, welche zu einer dichten Packung der Acylketten und dadurch zu einer Phasentrennung führen. Auf Grund dieser Eigenschaft werden sie auch als *detergent-resistant membranes* (DRMs) bezeichnet (Brown *et al.*, 1997a; Pike, 2003; Wang *et al.*, 2000).

1.5 Funktion des zellulären Prion Proteins

Die genaue Funktion des Prion Proteins ist bis heute ungeklärt. Das Prion Protein ist ein hochkonserviertes Protein welches das höchste Expressionslevel innerhalb des zentralen Nervensystems aufweist, speziell in Verbindung mit synaptischen Membranen. Auch in Zellen des Immunsystems ist eine erhöhte Menge an Prion Protein im Vergleich zum übrigen Gewebe nachweisbar (Dodelet *et al.*, 1998). Trotz der Lokalisation innerhalb des ZNS zeigten PrP-*knock-out* Mäuse lediglich minimale Veränderungen des Schlaf-Wach-Rhythmus (Tobler *et al.*, 1996), des Geruchssinns (Le Pichon *et al.*, 2009) oder eine gestörte Vermehrung und Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen (Steele *et al.*, 2006). Abgesehen von diesen Merkmalen zeigten die Mäuse eine normale Entwicklung und waren lebensfähig (Bueler *et al.*, 1992). Ein Funktionsverlust von PrP^C als Ursache für Prionerkrankungen kann auf Grund der normalen Entwicklung von *knock-out*-Mäusen somit ausgeschlossen werden (Aguzzi *et al.*, 2009).

Auf Grund der hohen Affinität zu Kupfer wurde eine Funktion im Kupferhaushalt diskutiert (Brown *et al.*, 1997b; Hornshaw *et al.*, 1995). Es wurde ebenso eine Funktion des PrP^C als Superoxid-Dismutase vermutet, da Zelllinien die kein PrP exprimierten, eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber oxidativen Stress aufwiesen (Brown *et al.*, 1997c; Brown *et al.*, 1999). Weitere Untersuchungen beschrieben Einflüsse auf die Erhaltung hämatopoetischer Stammzellen, die Zelladhäsion und die Stabilität von Zell-Zell-Kontakten oder Funktionen im Zusammenhang mit Krebserkrankungen (Malaga-Trillo *et al.*, 2009; Mehrpour *et al.*, 2010).

1.6 Unterscheidung zwischen zellulärem PrP^C und krankheitsassoziiertem PrP^{Sc}

Die Feststellung, dass sowohl in gesunden als auch in infizierten Tieren das, aus chemischer Sicht, identische Prion Protein nachgewiesen und isoliert werden konnte, warf die Frage über mögliche strukturelle und funktionelle Unterschiede auf. Auf Aminosäuresequenzebene sind keine Unterschiede zwischen PrP^C und dem krankheitsassoziiertem PrP^{Sc} nachweisbar. Ebenso unterscheiden sich beide Formen nicht in den posttranslationalen Modifikationen (Stahl *et al.*, 1993). Riesner *et al.* konnten durch Elektronenmikroskopie nachweisen, dass PrP^C hauptsächlich als monomerer bzw. oligomerer Partikel vorkommt, PrP^{Sc} hingegen bildet amyloide Strukturen (Riesner *et al.*, 1996). Die Tendenz zur Aggregation korreliert direkt mit der für PrP^{Sc}-spezifischen, nachgewiesenen Resistenz gegenüber dem proteolytischen Verdau mit Proteinase K (PK). Aus gesunden Tieren isoliertes, natürliches Prion Protein zeigt in einem denaturierenden Gel ein Bandenmuster aus Banden, die der unglykosylierten, der monoglykosylierten und der diglykosylierten Isoform zugeordnet werden können. Alle Banden liegen im Molekulargewichtsbereich zwischen 33 kDa und 35 kDa. Nach Hydrolyse von PrP^{Sc} mit Proteinase K verbleibt ein um 70 Aminosäuren N-terminal verkürztes PrP-Fragment, welches eine Größe von 27 kDa-30 kDa aufweist (Abbildung 4). Diese N-terminal verkürzte Form des Prion Proteins wird auf Grund seiner Größe auch als PrP27-30 bezeichnet. PrP^C hingegen zeigt eine vollständige Sensitivität gegenüber dem Proteinase K-Verdau und wird gänzlich degradiert (McKinley *et al.*, 1983). Erstaunlicherweise zeigt das N-terminal verkürzte PrP27-30 keine verminderte Infektiosität (Prusiner *et al.*, 1983; Riesner, 2002).

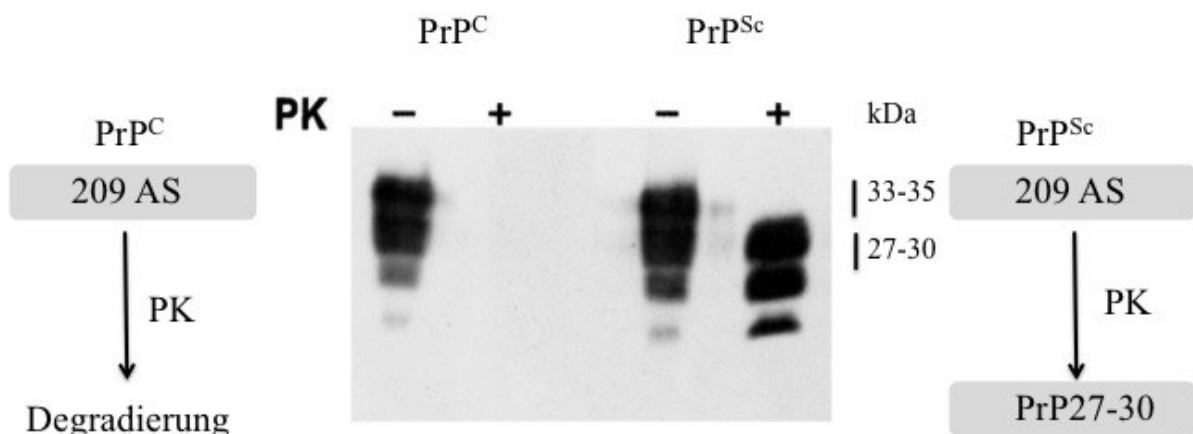


Abbildung 4: Vergleich der Proteinase K Sensitivität von PrP^C und PrP^{Sc} durch Western Blot Analyse.

Nach dem Proteinase K-Verdau einer PrP^C sowie einer PrP^{Sc} Probe wurde das Ergebnis durch SDS-PAGE und nachfolgenden Western Blot überprüft. Im Fall von PrP^C ist das deutlich sichtbare Dreibandmuster in der Kontrollprobe in der Spur der PK-verdauten Probe nicht mehr nachweisbar. Dagegen weist PrP^{Sc} ein zu niedrigerem Molekulargewicht hin verschobenes Dreibandmuster auf (N-terminal verkürztes PrP27-30) Abbildung modifiziert nach Riesner, 2002. PK: Proteinase K

PrP^C und PrP^{Sc} weisen neben der unterschiedlichen Sensitivität gegenüber PK zusätzlich verschiedene Sekundärstrukturelemente auf, wodurch sich die beiden Formen unterscheiden lassen (Cohen *et al.*, 1998; Ironside, 1998; Riesner, 2003). Durch Zirculardichroismus-Spektroskopie (CD) sowie Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR) konnten für PrP^C ein ~40 %iger Anteil an α -helikalen Bereichen und lediglich ~4 % β -Faltblatt Anteil bestimmt werden (Pan *et al.*, 1993). Im Gegensatz dazu wurde für PrP^{Sc} ein α -helikaler Anteil von ~30 % bestimmt, der β -Faltblatt Anteil lag jedoch bei ~43 %. PrP^{Sc} ist demnach β -Faltblatt dominiert, wohingegen PrP^C eine mehrheitliche α -helikale Sekundärstruktur aufweist. Ein weiterer Unterschied betrifft die Löslichkeit. PrP^C ist in milden Detergenzien löslich, PrP^{Sc} hingegen ist unlöslich und neigt zur Aggregation (Tabelle 2). Des Weiteren ist es nicht möglich die Löslichkeit von PrP^{Sc} zu erhöhen ohne dabei die Infektiosität zu beeinflussen. Riesner *et al.* konnten nachweisen, dass solubiliertes PrP^{Sc} einen verminderten β -Faltblatt Anteil und einen erhöhten α -helikalen Anteil aufweist (Riesner *et al.*, 1996). Diese strukturellen Hinweise führten zu der Hypothese, dass die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstrukturen einen entscheidenden Einfluss auf die Prion-Infektiosität besitzen.

Tabelle 2: Vergleich der Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}

<i>Eigenschaft</i>	<i>PrP^C</i>	<i>PrP^{Sc}</i>
Löslichkeit	Löslich in milden Detergenzien	Unlöslich
Sekundärstruktur	Hauptsächlich α -helikal	Überwiegend β -Faltblatt
PK-Resistenz	Sensitiv	C-terminal Resistent
Infektiosität	Nicht infektiös	Infektiös

1.7 NMR-Analysen und PrP^C-Expressionssysteme

1996 wurden die ersten PrP NMR-Strukturanalysen durch die Gruppe um den Nobelpreisträger Kurt Wüthrich durchgeführt, was zur Bestimmung der Struktur des C-terminalen Teils von PrP (Maus-PrP) führte (Riek *et al.*, 1996). Hierzu wurde PrP rekombinant in *E. coli* exprimiert und wies weder posttranslationale Modifikationen noch Infektiosität auf. Hochauflösende Strukturen von Hamster-PrP und menschlichem PrP wurden kurz darauf veröffentlicht (Hosszu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999). Bei diesen Strukturen handelte es sich jedoch nicht um die des Volllänge-Proteins, sondern um N-terminal verkürzte Varianten. Die erste Struktur von

Volllänge-Maus-PrP (AS 23-231) wurde 1997 durch Riek *et al.* analysiert (Riek *et al.*, 1997) (Abbildung 5).

Durch die Strukturdaten konnte in Kombination mit den Daten aus biophysikalischen Analysen festgestellt werden, dass PrP^C in Lösung aus einem flexiblen N-terminalen Bereich von ~100 Aminosäuren besteht und der C-terminale Bereich zwei kurze, antiparallele β -Faltblätter sowie drei α -Helices umfasst.

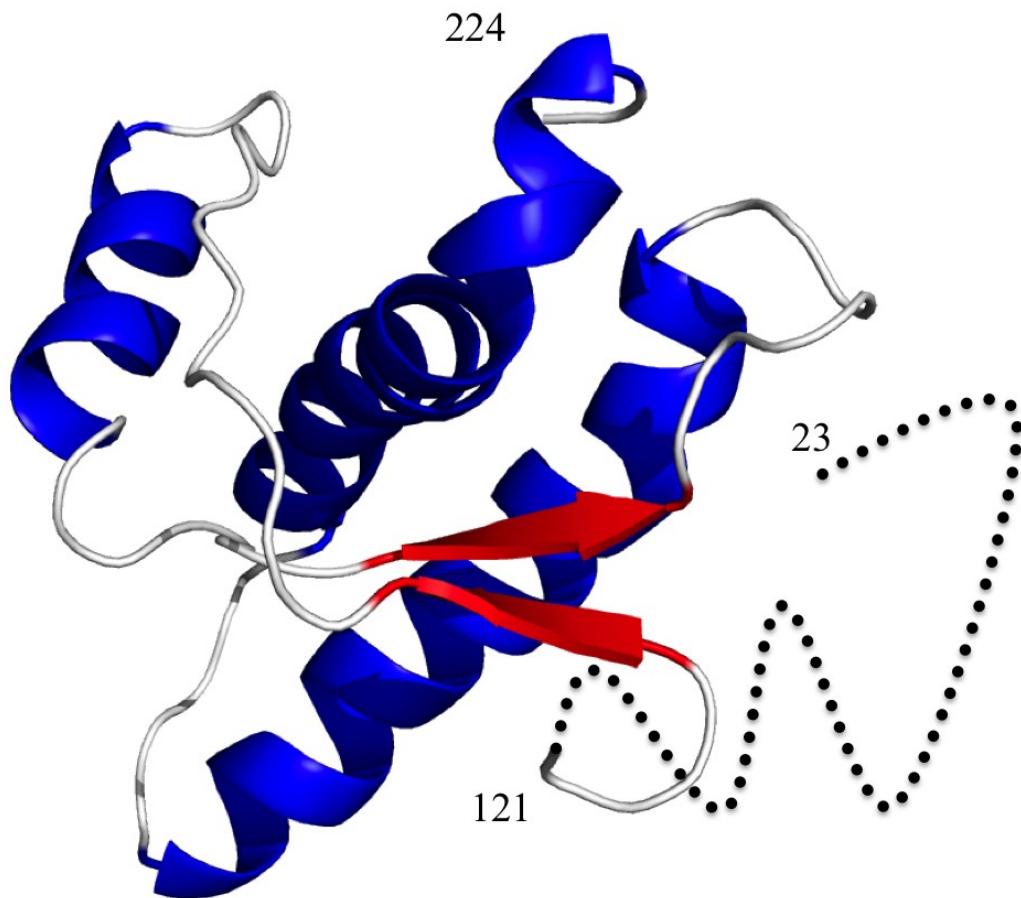


Abbildung 5: NMR-Struktur von Maus PrP (AS 23-224)

Mit schwarzen Punkten ist von Aminosäure 23 bis zu Aminosäure 120 der flexible N-terminale Bereich des Maus Prion Proteins dargestellt. Von AS 121 bis zu AS 224 folgt der strukturierte Bereich, welcher drei α -Helices (blau) und zwei β -Faltblatt Bereiche (rot) umfasst. Abbildung modifiziert nach Riek *et al.*, 1996. PDB Code 1AG2.

Zu bemerken ist der bei allen NMR-Analysen bisher verwendete pH-Wert, welcher zwischen 4,5 und 5,2 lag (Donne *et al.*, 1997; Lopez Garcia *et al.*, 2000; Riek *et al.*, 1996; Riek *et al.*, 1997; Zahn *et al.*, 2000). Dieser azide pH-Wert wurde auf Grund der besseren Löslichkeit von

PrP^C bei niedrigem pH gewählt, entspricht jedoch nicht dem natürlichen pH-Wert in der Zelle, weshalb eine abweichende Struktur nicht ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren basieren alle bisher gelösten Strukturen von PrP^C auf rekombinant in *E. coli* exprimiertem PrP^C, mit Ausnahme eines 1D-¹H-NMR-Spektrums von PrP^C, isoliert aus Hirnen gesunder Rinder durch Hornemann *et al.* (Hornemann *et al.*, 2004).

Im Falle dieser niedrig konzentrierten (13 µM) nicht Isotopen-markierten Probe für das 1D-¹H-NMR-Spektrum aus Rinderhirnen, handelte es sich um vollständig glykosyliertes PrP^C. Der GPI-Anker jedoch wurde mittels der phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C (PI-PLC) zum Zwecke der Reinigung/Isolierung entfernt. Alle anderen bisher durchgeführten NMR-Analysen basieren auf nicht posttranslational modifiziertem PrP^C. Dieses weist weder Glykosylierungen noch einen GPI-Anker auf. Es wird jedoch angenommen, dass die Konversion von nicht infektiösem PrP^C in die infektiöse PrP^{Sc}-Form in der Nähe, bzw. an der Zellmembran stattfindet (Vey *et al.*, 1996). Von entscheidender Bedeutung für die Konversion ist somit die Anwesenheit des GPI-Ankers. Dieser konnte schon als entscheidender Faktor für die Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} nachgewiesen werden, da GPI-verankertes PrP^C erfolgreich zu PrP^{Sc} konvertiert werden konnte, wohingegen PrP^C welches anstelle des GPI-Ankers über Transmembrandomänen verfügte, nicht zu PrP^{Sc} konvertierbar ist (Kaneko *et al.*, 1997; Resenberger *et al.*, 2011; Taraboulos *et al.*, 1995).

Um aussagekräftige Strukturdaten von PrP^C zu erhalten, bevorzugt in möglichst nativer Umgebung, d.h. verankert in einer Membranumgebung, ist es essentiell, große Mengen an vollständig posttranslational modifiziertem PrP^C herzustellen und reinigen zu können.

Zur Expression von PrP^C werden unterschiedliche Expressionssysteme verwendet. Hauptsächlich wird rekombinantes PrP^C in bakterieller Zellkultur aus *E. coli* gewonnen (Mehlhorn *et al.*, 1996). Die Vorteile der Expression in *E. coli* sind das schnelle Zellwachstum, die hohe Ausbeute und die verhältnismäßig geringen Kosten. Auch die Expression von Isotopen-markierten Proteinen ist in *E. coli* etabliert und unproblematisch. Allerdings kann in *E. coli* die Disulfidbrücke, welche für die korrekte Faltung von PrP^C notwendig ist, in den reduzierenden Bedingungen des Zytoplasmas nicht ausgebildet werden. Dieses Problem wird größtenteils umgangen durch die Reinigung von PrP^C aus *inclusion bodies* (Einschlusskörperchen) unter denaturierenden Bedingungen (GdnHCl) und der späteren Renaturierung und Bildung der Disulfidbrücke unter oxidativen Bedingungen (Mehlhorn *et al.*, 1996). Zudem ist *E. coli* nicht in der Lage, eukaryotische Signalsequenzen zu erkennen bzw. Proteine posttranslational zu modifizieren. Somit fehlt in *E. coli* exprimiertem PrP^C, jegliche Form von Glykosylierung sowie der GPI-Anker, welcher jedoch für die Membraninteraktion

von großer Bedeutung ist. Fehlende posttranslationale Modifikationen wurden in wenigen Studien nach der Expression hinzugefügt, indem synthetisch hergestellte GPI-Anker-Analoga (wie z.B. dem Lipid N-((2-pyridyldithio)-propionyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) an das Prion Protein kovalent gebunden wurden (Breydo *et al.*, 2007; Chu *et al.*, 2013; Eberl *et al.*, 2004; Hicks *et al.*, 2006; Olschewski *et al.*, 2007).

Von speziellem Interesse sind eukaryotische Expressionssysteme, da mit ihrer Hilfe posttranslational modifiziertes PrP^C exprimiert werden kann, welches dem natürlichen PrP^C sehr ähnlich bzw. identisch ist. Viele eukaryotische Expressionssysteme wurden getestet, jedoch kam es in den meisten Fällen zu Problemen, wie z.B. einem geringen Expressionslevel, Unlöslichkeit des exprimierten Proteins, instabiler Transfektion oder unvollständiger Reinigung des Proteins (Riesner, 2003). Ein häufig verwendetes eukaryotisches Expressionssystem basiert auf der Nutzung von CHO-Zellen (Chinesische Hamster-Ovarien-Zellen). Im Vergleich zum Wildtyp-Hamster weist dieses Expressionssystem ein 14-fach höheres Expressionslevel auf, wodurch Proteinausbeuten von bis zu 10 µg CHO-PrP^C pro Gramm CHO-Zellen erreicht werden können (Blochberger *et al.*, 1997; Elfrink, 2004; Riesner, 2003). Auf Grund der geringen Wachstumsrate der CHO-Zellen und der benötigten Proteinmengen (mg-Bereich) für NMR-Analysen ist dieses System jedoch weitestgehend unbrauchbar um strukturelle Analysen des PrP^C durchführen zu können. Über die letzten Jahre wurden einige Anstrengungen unternommen PrP^C in Hefen zu exprimieren. Dabei wurden das Hefe-System *Saccharomyces cerevisiae* (Ma *et al.*, 1999; Schumacher *et al.*, 2010) sowie das *Pichia pastoris*-System genutzt (Riley *et al.*, 2002; Weiss *et al.*, 1995). Trotz der ersten berichteten PrP-Expression in Hefen vor über 15 Jahren von Weiss *et al.*, gibt es bisher keine wissenschaftlichen Artikel über die erfolgreiche Expression und Reinigung von PrP^C aus Hefen. Weiss *et al.* berichtete ein zu geringes Expressionslevel und Lindquist *et al.* die Expression einer PrP^{Sc}-ähnlichen Form im Hefe-Zytoplasma. Dagegen gelangen Riley *et al.* 2002 die Expression von humanen PrP-Dimeren mit Proteinausbeuten von 50 mg-100 mg PrP^C-Fusionsprotein/l Zellkultur in *Pichia pastoris*, jedoch sind keine weiteren Folgearbeiten bekannt. 2010 gelangen Schumacher *et al.* die Expression eines PrP-Konstrukts mit den Signalsequenzen der Hefeproteine Kre5p und Gas1p, die zur späteren posttranslationalen Modifikation dienten. Ziel dieser Arbeit war jedoch nicht die Reinigung von modifiziertem PrP, sondern die Isolation des N-terminal mit einem Cystein modifizierten GPI-Ankers zum späteren Einsatz in einer *expressed protein ligation*-Reaktion (EPL). Im Vergleich zu Prokaryoten oder eukaryotischen Zelllinien (z.B. CHO-Zellen) bietet das Hefe-Expressionssystem durchaus entscheidende Vorteile.

1.8 *Das Pichia pastoris Expressionssystem*

Der zunehmende Bedarf an posttranslational modifizierten, rekombinanten Proteinen hat zur Verwendung komplexerer Expressionssysteme, angefangen von Prokaryoten über Eukaryoten, transgenen Tieren oder sogar Pflanzen, geführt. Unter ihnen befindet sich auch die Hefe *Pichia pastoris*. Unter Verwendung dieses Hefestammes sind bisher über 300 exprimierte Proteine dokumentiert, vom humanen Endostatin bis hin zum Spinnenseide Protein (Cereghino *et al.*, 2002; Cereghino *et al.*, 2000). Darunter befinden sich auch eine Anzahl funktionaler, korrekt gefalteter und rekonstituierter Membran-Proteine, welche in anderen Expressionssystemen nicht erfolgreich exprimiert werden konnten (Ramon *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu den oben genannten prokaryotischen Expressionssystemen ist das eukaryotische *P. pastoris*-System in der Lage lösliches, korrekt gefaltetes, rekombinantes Protein zu exprimieren, welches alle für die Funktionalität relevanten posttranslationalen Modifikationen durchlaufen hat (Damasceno *et al.*, 2004). Neben der Fähigkeit eukaryotische Signalsequenzen zu erkennen und zu prozessieren, ist *P. pastoris* bekannt für eine hohe Proteinausbeute, die sich im mg-g-Bereich pro Liter Zellkultur bewegen kann (Macauley-Patrick *et al.*, 2005). Zwar sind noch zahlreiche weitere eukaryotische Expressionssysteme, wie z.B. CHO-Zellen, verfügbar, welche ebenfalls die Fähigkeit zur posttranslationalen Modifikation besitzen, jedoch benötigen diese ein aufwendig zusammengestelltes Kulturmedium (zahlreiche Zusätze wie Glutamat, Asparagin, Natriumpyruvat, L-Methionin-Sulfoximin,...), weisen nur ein langsames Zellwachstum auf, was in erhöhten Kosten und einem erheblichem Zeitaufwand resultiert. Neben der relativ einfachen Möglichkeit der Kultivierung von *P. pastoris* in Bioreaktoren (Fermentern) können gleichzeitig viele wichtige Parameter kontrolliert werden, welche die Proteinproduktivität und Aktivität beeinflussen. Dazu zählen der pH-Wert, die Luftzufuhr, die Temperatur oder die Zufuhr von Kohlenstoffquellen. Im Falle der Expression löslicher, sekretierter Proteine stellt es auch eine Plattform zur einfachen Reinigung dieser bereit, da *P. pastoris* kaum eigene, endogene Proteine sekretiert und die heterolog exprimierten, sekretierten Proteine im Kulturmedium annähernd rein vorliegen (Sarramegna *et al.*, 2005). Die genetische Integration der codierenden DNA eines gewünschten Proteins kann unter anderem durch die etablierte Methode der homologen Rekombination in das Wirtsgenom erreicht werden. Aus diesen Gründen ist *Pichia* mittlerweile ein unkonventionelles Hefe-Expressionssystem, mit dem erfolgreich Proteine im Labormaßstab, als auch in Fermentationsprozessen größeren Maßstabs produziert werden (Cereghino *et al.*, 1999; Wegner, 1990).

P. pastoris ist in der Lage Methanol als Kohlenstoffquelle zu metabolisieren. Dazu verfügt *Pichia* über spezielle Enzyme, Alkoholoxidase (AOX1 & AOX2), Katalase (CAT) und Dihydroxyaceton Synthase (DHAS) welche die Hefe befähigen, Methanol als Kohlenstoffquelle abzubauen und als Energiequelle zu nutzen (Faber *et al.*, 1995). Dabei spielt das AOX1-Enzym eine entscheidende Rolle, da es für den initialen Schritt, der Oxidation von Methanol zu Formaldehyd, zuständig ist. Durch die Nutzung des AOX1-Promotors zur Expression des Zielproteins kann das Expressionslevel durch Variation des Kulturmediums reguliert werden. Die Expression rekombinanter Proteine ist komplett inhibiert wenn *P. pastoris* in glukose- oder glycerinhaltigem Medium wächst. Durch Austausch des Mediums hin zu einem methanolhaltigen Medium wird die Proteinexpression sehr effektiv induziert (Cereghino *et al.*, 1999). Diese exakt zu regulierende Inhibition und Induktion machen den AOX-Promotor zu einem sehr wirkungsvollen und für die Expression heterologer Proteine zu dem am meisten genutzten Promotor im *P. pastoris*-System (Faber *et al.*, 1995; Lin Cereghino *et al.*, 2001).

Wie vormals schon erwähnt sind eukaryotische Zellsysteme eine Option posttranslational modifizierte Glykoproteine zu exprimieren. Neben wenigen Unterschieden, wie der Verwendung der im Menschen nicht vorkommenden Sialinsäure und N-Glycolylneuraminsäure (Hamilton *et al.*, 2007), können Hefen auf eine evolutionär hochkonservierte Glykosylierungs-Biosynthese zurückgreifen. Obwohl der initiale Glykosylierungsschritt in Hefen identisch mit dem anderer eukaryotischer Zellsysteme ist, weist das final modifizierte Glykoprotein einige Unterschiede auf. Anders als im menschlichen Organismus kann *P. pastoris* keine Hybrid-Glykosylierungen oder komplexe Glykosylierungen durchführen, sondern produziert Glykolysierungsmuster des Hoch-Mannose-Typs, welches zu struktureller Heterogenität der produzierten Proteine führen kann (Daly *et al.*, 2005; Goncalves *et al.*, 2013; Ha *et al.*, 2011) (siehe Abbildung 6).

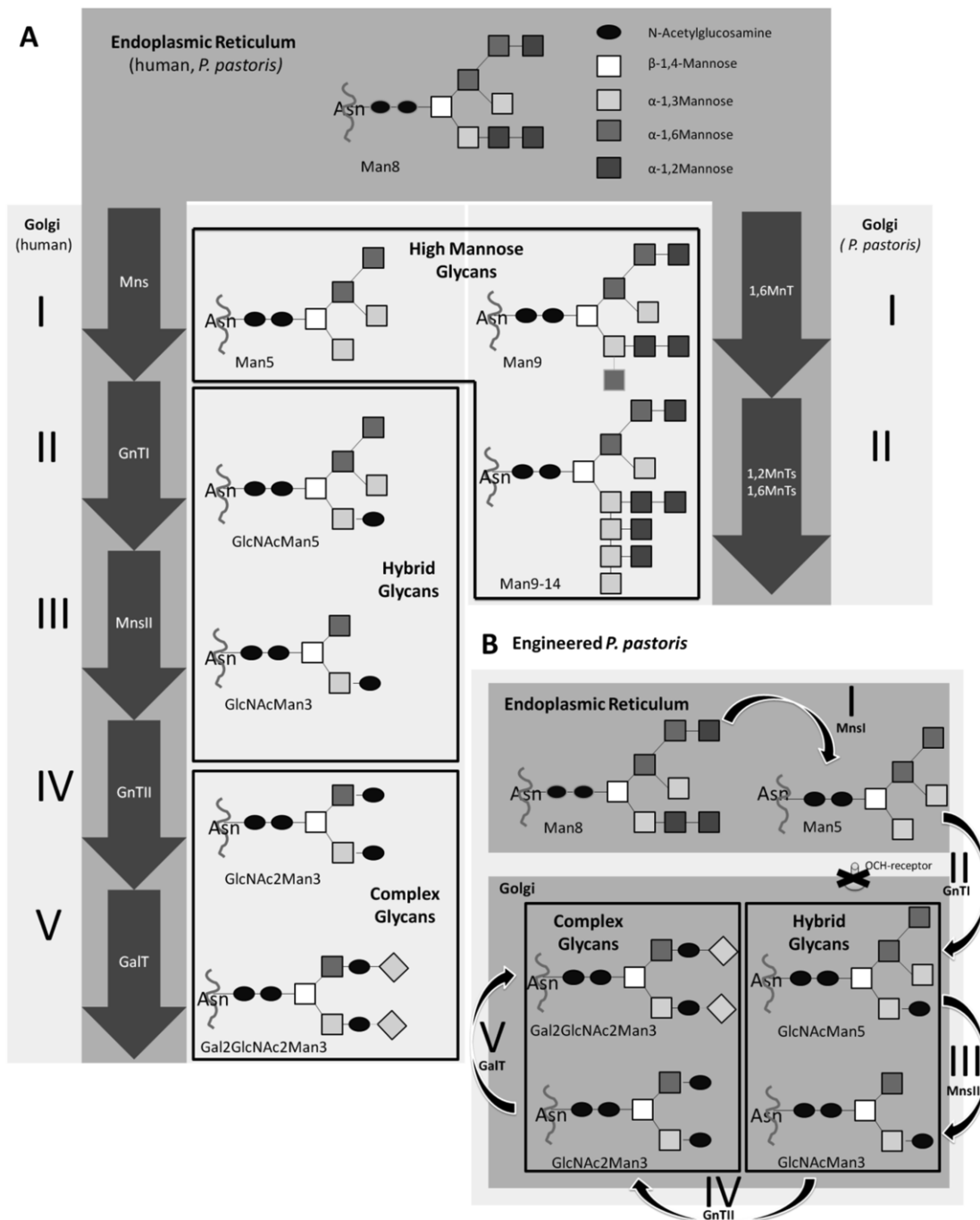


Abbildung 6: Schema Asparagin-verlinkter Glykosylierungs-Pathways

(A) Im Menschen und der Hefe *P. pastoris* (B) In *humanized P. pastoris*. Mns: α-1,2-mannosidase; GnTI: β-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase I; MnsII: mannosidase II; GnTII: β-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase II; GalT: β-1,4-galactosyltransferase; MnT: mannosyltransferase.

Abbildung entnommen aus Goncalves *et al.*, 2013

P. pastoris setzt sich von anderen Hefesystemen wie *S. cerevisiae* durch die Fähigkeit kürzere Oligosaccharidketten zu produzieren, die somit näher am menschlichen System als die Glykosylierungsmuster anderer Hefesysteme sind, ab (*S. cerevisiae* neigt zu Hyperglykosylierungen) (Li *et al.*, 2007). Zudem sind genetisch veränderte *P. pastoris*-Stämme

verfügbar, welche in der Lage sind humane Glykosylierungsmuster zu erstellen (Hamilton *et al.*, 2007; Potgieter *et al.*, 2009).

Weiterhin ist die Effektivität des *P. pastoris* Systems zur Expression komplexer, in anderen Systemen schwierig exprimierbarer Proteine dadurch belegt, dass mit diesem System mehrere Membranproteine exprimiert wurden, von denen hochauflösende 3D-Strukturen gelöst werden konnten (Dietzsch *et al.*, 2011; Ramon *et al.*, 2011). *P. pastoris* ist in der Lage, Proteine mit allen Arten von Transmembrandomänen korrekt gefaltet und posttranslational modifiziert zu exprimieren, dazu gehören z.B. Aquaporine oder Ionenkanäle (Bornert *et al.*, 2012).

Die Fähigkeit eukaryotische Signalsequenzen zu erkennen und zu prozessieren, sowie die Möglichkeit Proteine durch GPI-Anker zu modifizieren, machen das *P. pastoris*-System sehr interessant für die Expression des Prion Proteins als Membranprotein, welches über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verbunden ist. Als erste konnten Riley *et al.* als auch Schumacher *et al.* durch ihre Untersuchungen zeigen, dass PrP mit N- und C-terminalen Signalsequenzen in *S. cerevisiae* und *P. pastoris* posttranslational modifiziert werden kann und mittels GPI-Anker modifiziert wurde. Dabei nutzen Schumacher *et al.* jedoch mit Gas1p und Kre5p Hefeprotein-spezifische Signalsequenzen und Riley *et al.* exprimierten humane PrP-Dimere, modifiziert mit einem Flag-Tag nahe am Ende der PrP-Aminosäuresequenz. Obwohl beide Gruppen die erfolgreiche Expression beschrieben, sind keine darauf aufbauenden Veröffentlichungen betreffend der Reinigung und Charakterisierung des PrP^C bekannt (Riley *et al.*, 2002; Schumacher *et al.*, 2010).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Die meisten biophysikalischen und strukturellen Untersuchungen basieren auf Prion Protein welches in *E. coli* exprimiert wurde und keinerlei posttranslationale Modifikationen aufweist. Durch zahlreiche Untersuchungen ist nunmehr auch bekannt, dass diese Modifikationen, vor allem die Integration des Prion Proteins in der Zellmembran durch den GPI-Anker von großer Bedeutung für die Konversion und somit die Pathogenität ist. Zudem kann davon ausgegangen werden, dass die zusätzlichen Modifikationen und die Nähe zur Zellmembran einen Einfluss auf die Proteinstruktur verursachen. Aus diesen Gründen ist es essentiell, vollständig posttranslational modifiziertes Prion Protein in ausreichenden Mengen zur Verfügung zu haben um detaillierte Einblicke in die Struktur des membrangebundenen Prion Proteins zu erhalten. Bisher wurde dies durch die äußerst geringe Expressionsrate in Säugetierzellen und die komplizierte und aufwendige Reinigung des Prion Proteins erschwert. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten wird in dieser Arbeit das Augenmerk nicht auf semisynthetische Methoden gelegt um rekombinant exprimiertes Prion Protein nachträglich mit einem GPI-Anker-Analoga zu modifizieren, sondern auf die Expression von möglichst nativem, posttranslational modifiziertem PrP.

Zu diesem Zweck wird das *Pichia pastoris*-Expressionssystem verwendet. Es soll die erstmalige Expression des Prion Proteins aus dem syrischen Goldhamster (SHaPrP) in seiner möglichst nativen Form/Sequenz mit nativen Signalsequenzen untersucht und etabliert werden. Darauffolgend soll das exprimierte PrP auf seine posttranslationalen Modifikationen hin analysiert und diese bestätigt werden. Zusätzlich soll ein Verfahren gefunden und etabliert werden, das es ermöglicht, posttranslational modifiziertes Prion Protein in möglichst hohen Mengen zu isolieren und zu reinigen um es für spätere, strukturelle Analysen nutzen zu können. Es werden erste biophysikalische Untersuchungen zur Charakterisierung des Proteins durchgeführt und es sollen erste strukturelle Daten gewonnen werden unter Verwendung verschiedener biophysikalischer Methoden wie der Zirkulardichroismus-Spektroskopie. Bisher war es noch nicht möglich NMR-Daten von membrangebundenem Prion Protein zu erhalten. Dies liegt zum einen an der Tatsache, dass nicht genügend posttranslational modifiziertes Prion Protein zur Verfügung stand, zum anderem an der Problematik der Aggregation bei hohen Konzentrationen. Es soll versucht werden ¹³C-markiertes PrP, verankert in der Hefe-Plasmamembran, direkt in ausreichendem Maße zu präparieren und mit Hilfe von Festkörper-NMR-Analysen erste strukturelle Daten zu erhalten.

2. Material

2.1 Chemikalien

Lösungen und Chemikalien die in dieser Arbeit verwendet wurden, entsprechen dem Reinheitsgrad, „Reinst“, zur Analyse bzw. „pro analysi“ und wurden von gängigen Labormittel- und Chemikalienherstellern bezogen.

Mit Aq. dest. wird in dieser Arbeit Wasser bezeichnet, welches einem Reinstwassersystem (Milli-Q Ultrapure Water Purification System, Merck Millipore, Billerica, USA) entnommen wurde. Frisch angesetzte Puffer wurden mittels einer 0,2 µm Cellulosenitratmembran-Filtereinheit (Nalgene, Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) sterilfiltriert.

2.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

TGS (Tris/HCl-Glycine-SDS) Laufpuffer

25 mM	Tris/HCl, pH 8,3
192 mM	Glycine
0,1 % (w/v)	SDS

TG (Tris-Glycine) Blotting-Puffer

25 mM	Tris/HCl, pH 8,3
192 mM	Glycine
20 %	Methanol

5 %iges SDS-PAGE Sammelgel(10 ml)

5,7 ml	Aq. dest
1,7 ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid
2,5 ml	Gel-Puffer (0,5 M Tris/HCl/pH 6,8)
0,1ml	10 % (w/v) SDS
50 µl	10 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)
5 µl	TEMED (N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin)

15%iges SDS-PAGE Trenngel (10 ml)

2,4 ml	Aq.dest
5,0 ml	30 % Acrylamid/Bisacrylamid
2,5 ml	Gel-Puffer (1,5 M Tris/HCl/pH 8,8)
0,1 ml	10 % (w/v) SDS
50 µl	10 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)
10 µl	TEMED (N,N,N,N,-Tetramethylethylendiamin)

Coomassie-Lösung

0,2 %	Coomassie R-250
0,2 %	Coomassie G-250
45 %	Ethanol
10 %	Essigsäure

Coomassie-Entfärbelösung

10 %	Essigsäure
------	------------

4 x SDS Auftragspuffer (Laemmli, vor Verdünnung mit Probe)

280 mM	Tris/HCl, pH 6,8
20 %	2-β-Mercaptoethanol
8 %	SDS
20 %	Glycerin
0,2 %	Bromphenolblau

TBS-T

10 mM	Tris/HCl, pH 8,0
150 mM	NaCl
0,01 %	Tween20

S-Puffer

50 mM	Hepes, pH 7,5
1,2 M	Sorbitol

Aufschlusspuffer

0,33 M	Sucrose
0,15 M	Tris/HCl, pH 7,4
0,1 M	ϵ -Aminocapronsäure
1 mM	EDTA

Membran-Aufschlusspuffer

50 mM	Tris/HCl, pH 7,4
150 mM	NaCl
30 %	Glycerin

PBS

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
10 mM	Na_2HPO_4
2 mM	KH_2PO_4
pH 7,4	

TAE-Puffer

400 mM	Tris/HCl, pH 8,5
200 mM	Essigsäure
10 mM	EDTA

IMAC Reinigungspuffer:GdnHCl-Reinigungspuffer

6 M	Guanidinhydrochlorid (GdnHCl)
30 mM	Natriumphosphatpuffer (NaPi), pH 8,0
300 mM	NaCl

GdnHCl-Elutionspuffer

6 M	Guanidinhydrochlorid (GdnHCl)
30 mM	Natriumphosphatpuffer (NaPi), pH 8,0
300 mM	NaCl
500 mM	Imidazol

Membran-Aufschlusspuffer (M-B-B)

50 mM	Tris/HCl, pH 7,4
150 mM	NaCl
30 %	Glycerin
(0,1 %)	SDS

Membran-Aufschlusspuffer-Elution

50 mM	Tris/HCl, pH 7,4
150 mM	NaCl
500 mM	Imidazol
30 %	Glycerin
0,1 %	SDS

2.3 Kulturmedien

Niedrigsalz-LB (Lennox)-Medium

5 g/l	Hefeextrakt
10 g/l	Trypton
5 g/l	NaCl
(15 g/l	Agar)
pH 7,0	

YPD-Medium

10 g/l	Hefeextrakt
20 g/l	Pepton

Lösen in 900 ml Aq. dest.

Autoklavieren

Zugabe von 100 ml 20 % (w/v) Glukose

YPDS-Platten

10 g/l	Hefeextrakt
20 g/l	Pepton
20 g/l	Agar

1 M Sorbitol

Lösen in 900 ml Aq. dest.

Autoklavieren

Zugabe von 100 ml 20 % (w/v) Glukose

Minimal-Medium (MMY):

100 ml 10x *Yeast Nitrogen Base* (13,4 % *Yeast Nitrogen Base with Ammonium Sulfate without amino acids*)

2 ml 500x Biotin (0,02 % biotin)

100 ml 10x Methanol (5 % Methanol)

Auffüllen auf 1000 ml mit sterilem Wasser

2.4 raft-like Liposomen

2.4.1 Lipide/Lipid-Puffer

CBS-Puffer:

10 mM NaAcetat, pH 6,0

137 mM NaCl

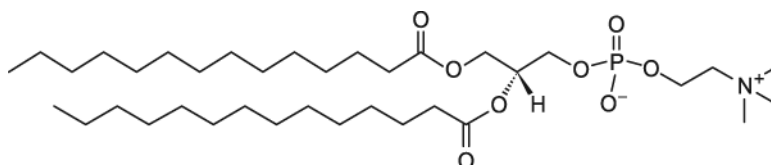
Carboxyfluoresceinlösung:

100 mM Carboxyfluorescein

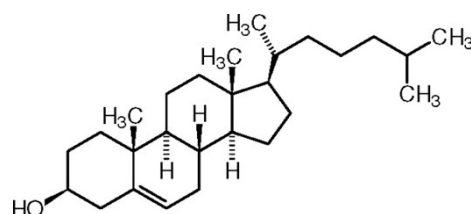
300 mM NaOH

Lipide:

Alle Lipide wurden von Avanti Polar Lipids, Inc. bezogen.



Dimyristol-
phosphatidylcholin
(DMPC)



Cholesterol
(Chol)

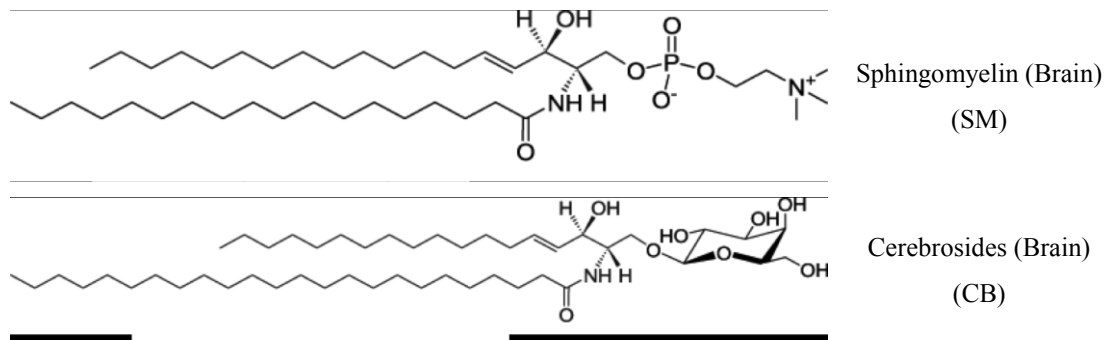


Abbildung 7: Verwendete Lipide in der *raft-like* Lipidmischung

2.4.2 Zusammensetzung von *raft-like* Liposomen

Bisher ist die genaue, natürliche Zusammensetzung der *raft*-Membranmikrodomänen nicht bekannt. Eine bekannte Eigenschaft der *raft*-Domänen ist der relativ hohe Anteil an Cholesterol und Sphingomyelin. In dieser Arbeit wurde die *raft-like* Lipidmischung in einem molaren Verhältnis von 2:1:1:2 aus DMPC, Sphingomyelin, Cerebrosiden und Cholesterol hergestellt (Baron *et al.*, 2003).

Tabelle 3: Zusammensetzung der *raft-like* Lipidmischung

MW = Molekulargewicht, DMPC = Dimyristolphosphatidylcholin, SM = Sphingomyelin CB = Cerebroside, Chol = Cholesterol

Der Unterschied zwischen theoretischem und praktischem Volumen basiert auf der Verwendung kleiner Glaskapillaren (Volumen von 20 μl oder 100 μl) zum Pipettieren. Aus diesem Grund ist es nicht möglich ein beliebig variables Volumen zu pipettieren.

	DMPC	SM	CB	Chol
MW [Da]	680	730	810	390
Anteile (molar)	2	1	1	2
Anteile (Masse)	2	1.074	1.191	1.147
Stammlösung [mg/ml]	20	25	10	10
Volumen (theor.)(μl)	400	171.8	476.4	460
Masse (theor.)(mg)	8	4.296	4.764	4.6
Volumen (prakt.)(μl)	400	160	500	400
Masse (prakt.)(mg)	8	4	5	4

2.5 Verwendeter Expressionsvektor

Alle in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse basieren auf der Transformation und Expression des Vektors pPICzA (Invitrogen, Carlsbad, USA) (Abbildung 8) in den *P. pastoris* Stamm X-33. Die verschiedenen Varianten des Expressionsvektors unterscheiden sich lediglich in der *multiple cloning site* zwischen der Schnittstelle *Not* I und dem c-myc Epitop. Dieser Vektor trägt eine Zeocin-Resistenz, weshalb bei der Klonierung auf die Verwendung von Niedrigsalz-LB-Medium pH 7,5 zu achten ist, da ansonsten das Antibiotikum Zeocin (Invitrogen, Carlsbad, USA) inhibiert wird und keine wirkungsvolle Selektion stattfindet.

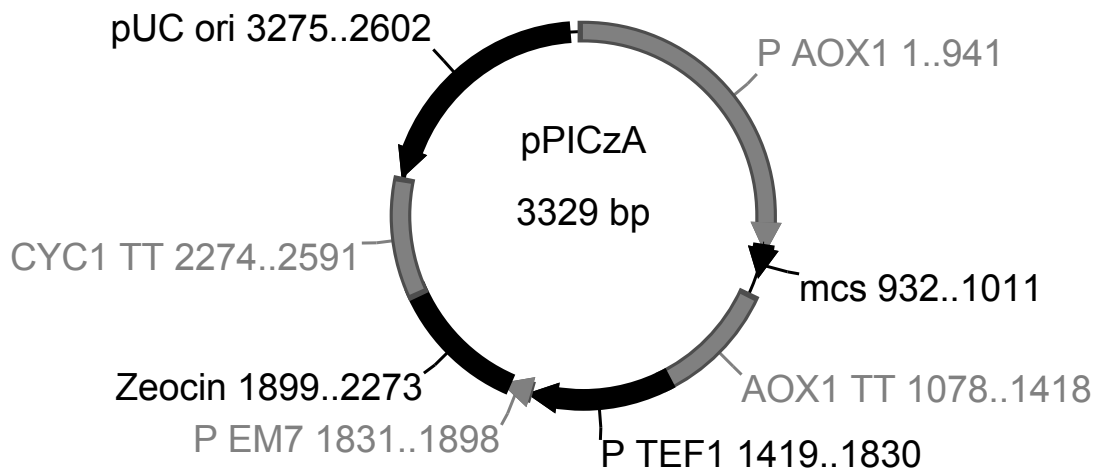


Abbildung 8: Vektorkarte des Expressionsvektors pPICzA von Invitrogen.

P AOX1: 5' AOX1 promoter region 1-941
 mcs: Multiple cloning site 932-1011
 AOX1 TT: AOX1 transcription terminator region 1078-1418
 P TEF1: TEF1 promotor 1419-1830
 P EM7: EM7 promotor 1831-1898
 Zeocin: *Sh ble* ORF 1899-2273
CYC1 TT: *CYC1* transcription terminator region 2274-2591
 pUC ori: pUC origin 2602-3275
*Eco*RI 943-948
*Apa*I 1006-1011

2.6 *Verwendete Antikörper*

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Antikörper.

WB = Western Blot, IF = Immunfluoreszenz

Antikörper	Epitop	Konzentration	Hersteller
SAF32	PrP AS 79-89	WB: 0.1 µg/ml IF: 5 µg/ml	SpiBio, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich
6H4 mouse anti PrP	PrP AS 144-152	WB: 0.15 µg/ml	Prionics, Schlieren-Zürich
mouse anti GFP	GFP und GFP Varianten	WB: 1.5 µg/ml	Invitrogen, Carlsbad, USA
goat anti mouse HRP conjugate	konservierte Region eines Maus-Antikörpers	WB: 0.1 µg/ml	Jackson ImmunoResearch, Balimore, USA
goat anti mouse IgG H&L (Cy2)	konservierte Region eines Maus-Antikörpers	IF: 10 µg/ml	Abcam, Cambridge, England

2.7 *Verwendete Oligonukleotide*

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide (Primer) können der nachfolgenden Tabelle 5 entnommen werden. Die AOX Primer wurden sowohl zur Sequenzierung des Vektors pPICzA als auch für die Kolonie *PCR* verwendet. Alle Primer wurden von MWG eurofins operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Tabelle 5: Zur Klonierung und Sequenzierung verwendete Primer.
bp: Anzahl Basenpaare

Primer	Sequenz (5' - 3')	bp
AOX forward	GACTGGTTCCAATTGACAAG	20
AOX reverse	GCAAATGGCATTCTGACATCC	21
PrP-GPI forward	GATTGAATTCATGGCGAACCTTAGCTACTGGCTGC TGGCACTCTTTGTGGCTATGTGGACTGATGTTGGCC TCTGCCATCATCATCATCATCACGGAAAGAAG CGGCCAAAGCCTGGAGGGTGGAAACAC	137
PrP-GPI reverse	GATCGGGCCCTCATCCCACCATCAGGAAGATGAGA AAGGAAATGAGGAGGATCACAGGAGGGGAGGAGA ACAGCACCGCGCTGGACCTTCTTCCATCGTAGTAG GCCTGGGACTCCTTC	119
PrP Δ GPI forward	GATTGAATTCATGCATCATCATCATCATCACG GAAAGAAGCGGCCAAAGCCTGGAGGGTGGAAACAC	69
PrP Δ GPI reverse	GATCGGGCCCTTAGGACCTTCTTCCATCGTAGTAG GCC	38
GFP Δ GPI forward	GATCGAATTCATGGCTAACTTGTCTACTGG	31
GFP Δ GPI reverse	GATCGGGCCCTTACTTGTACAACCTCGTCCATACCC AAAGTGATA	44

2.8 Transformierte und exprimierte Konstrukte in *P. pastoris*

Im Zuge dieser Arbeit wurde ausschließlich mit verschiedenen Varianten des Prion Proteins aus dem syrischen Goldhamster (SHaPrP (*Mesocricetus auratus*, NCBI accession no. XP_005068717) sowie mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP, NCBI accession no. AFS52245) gearbeitet.

Folgende sechs Konstrukte wurden kloniert bzw. durch Invitrogen life technologies (Carlsbad, USA) und MWG eurofins operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisch hergestellt (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Verwendete PrP- und GFP- Konstrukte

AS: Aminosäuren

Konstrukt	Protein	Erhalten durch	Besonderheit	Größe (AS)
PrP-GPI	SHa Prion protein	PCR	N- & C- terminale Signalsequenzen His ₇ -Tag	262
PrPΔGPI	SHa Prion protein	PCR	His ₇ -Tag	218
SHaPrP	SHa Prion protein	MWG eurofins operon	N- & C- terminale Signalsequenzen	254
PrP-GPI-V	SHa Prion protein	Invitrogen life technologies	N- & C- terminale Signalsequenzen His ₁₀ -Tag FactorX Schnittstelle	273
GFP-GPI	Enhanced Green fluorescent protein	Invitrogen life technologies	N- & C- terminale Signalsequenzen	285
GFPΔGPI	Enhanced Green fluorescent protein	PCR		239

3. Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für alle Klonierungs *PCRs* wurde die Korrekturlese-Polymerase Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, USA) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Als Template wurden standardmäßig 5 ng Plasmid DNA eingesetzt. Die finale Primerkonzentration betrug für den forward und reverse Primer jeweils 0,5 µM, die dNTP Konzentration betrug 200 µM. PCR's wurden in einem Mastercycler ep gradientS (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 7: PCR Schema für alle Klonierungs PCR Reaktionen mit der Phusion DNA Polymerase.

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	98	30
35 Zyklen	98	10
	55	20
	72	30
Finale Elongation	72	150
Hold	4	∞

3.1.2 Kolonie PCR

Um zu überprüfen, ob transformierte Bakterienkolonien den Vektor inklusive Insert tragen, wurde eine Kolonie *PCR* mit AOX forward/reverse Primern durchgeführt. Hierzu wurden mit einer Pipettenspitze Kolonien von der Agarplatte in ein *PCR* tube inklusive fertigem *PCR*-Mix überführt. Die finale Primerkonzentration betrug für den forward und reverse Primer jeweils 0,4 µM, die Konzentration an dNTP's betrug 1 mM. Es wurden für einen 50 µl Ansatz 2,5 Units DNA-Polymerase verwendet. Unmittelbar im Anschluss wurde die *PCR* Reaktion gestartet (Tabelle 8). Kolonie *PCRs* wurden mit der „MyTaq™ HS DNA Polymerase“ (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) nach Herstellerangaben in einem Mastercycler ep gradientS (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 8: PCR Schema für alle Kolonie PCR Reaktionen mit der MyTag HS DNA Polymerase

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (s)
Initiale Denaturierung	95	60
35 Zyklen	95	15
	55	20
	72	20
Finale Elongation	72	150
Hold	4	∞

3.1.3 Agarose Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurde die Agarosegelelektrophorese benutzt. Es wurden 1,5 %ige Agarosegele verwendet (1,5 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer). Die Elektrophorese wurde bei 120 V durchgeführt. Zur Anfärbung von DNA-Banden enthielt die 1,5 %ige Agarose-Lösung 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Die DNA-Banden wurden mittels UV-Licht an einer Dokumentationsanlage (G:Box, Syngene, Cambridge, Großbritannien) sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.1.4 Restriktionsverdau

Alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte tragen die beiden Restriktionsschnittstellen *ApaI* sowie *EcoRI*. In jedem Restriktionsverdau wurde sowohl der Expressionsvektor pPICzA separat, wie auch die Plasmide mit den gewünschten Inserts mit je 1 µl der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *ApaI* in einem 20 µl Reaktionsansatz bei 37 °C für 1 h verdaut. Die Linearisierung des Expressionsplasmids pPICzA zur Transformation in *P. Pastoris* wurde mit Hilfe des Restriktionsenzym *SacI* bei 25 °C für 16 h durchgeführt.

Während des Restriktionsverdaus des Vektors pPICzA wurde zur Dephosphorylierung des Vektors zusätzlich zu den Restriktionsenzymen 1 µl FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) hinzugefügt. Alle Enzyme wurden von Fermentas (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) bezogen.

3.1.5 Gelelution

Zur Reinigung/Elution von DNA-Banden aus einem Agarosegel wurde das Kit GeneJet Gel Extraction (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) verwendet. Alle Schritte wurden anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt.

3.1.6 Ligation

Ligationen zwischen DNA-Insert und Zielplasmid wurden bei 37 °C für 1 h oder bei RT über Nacht durchgeführt. Verwendet wurde 1 *Unit* T4 DNA Ligase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA). Folgende Formel wurde zur Berechnung des korrekten Verhältnisses zwischen Insert und Vektor genutzt:

$$Masse_{Fragment}[ng] = \frac{4 \times Masse_{Vektor}[ng] \times Länge_{Fragment}[bp]}{Länge_{Vektor}[ng]}$$

Formel 1: Formel zur Berechnung des Vektor-Insert-Verhältnisses

bp: Basenpaare

Ein vierfacher Überschuss an Insert-DNA in Bezug auf 50 ng Vektor DNA wurde eingesetzt um eine höchstmögliche Effizienz der Ligation zu gewährleisten. Die Ligation wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 65 °C für 10 min gestoppt. Alle Schritte wurden anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt.

3.1.7 Plasmidpräparation

Zur Präparation von Plasmiden aus Bakterienkulturen, wurden aus 5 ml Übernachtskulturen mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kits (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) die Plasmide isoliert und je nach Bedarf für Sequenzierungsreaktionen oder aber Testrestriktionen verwendet. Um größere Plasmidmengen zu erhalten wurden Plasmide aus 200 ml Übernachtskulturen mit dem NucleoBond Xtra Midi Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) isoliert. Alle Schritte wurden anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt.

3.1.8 Konzentrationsbestimmung einer Nukleinsäurelösung

Zur Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen wurde ein Spektralphotometer (Nanodrop ND2000, Peqlab, Erlangen, Deutschland) verwendet. Über die Absorption bei 260 nm sowie dem Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm wurde die Konzentration und die Reinheit von Nukleinsäurelösungen bestimmt.

3.1.9 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von MWG eurofins operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Hierzu wurden jeweils mindestens 100 ng Plasmid-DNA in einem finalen Volumen von 15 µl Aq. dest. angesetzt und zur Sequenzierung versendet.

3.1.10 Natrium-Acetat DNA-Fällung

In Vorbereitung auf die Transformation des Expressionsvektors pPICzA in *P. pastoris* wurde das zuvor linearisierte Expressionsplasmid einer Natriumacetat-Fällung unterzogen.

Nach der Linearisierung von ca. 15 µg der Plasmid-DNA wurden die Probe mit 1/10 des Volumens 3 M Natrium-Acetat pH 5,2 versetzt. Anschließend wurden 3 Volumen > 95 %iger Ethanol hinzugegeben und gut durchmischt.

Nach einer 15 minütigen Inkubation bei -80 °C wurde die Probe bei 16.000 xg und 4 °C für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das resultierende DNA-Pellet luftgetrocknet und in 15 µl Aq. dest. resuspendiert

3.1.11 Transformation von elektrokompetenten *E. coli* Zellen

Zur Transformation von *E. coli* wurden je 5 µl eines Ligationsansatzes zu ca. 50 µl elektrokompetenten *E. coli* BL21(DE3)pLysS Zellen (Novagen/MerckMillipore, Billerica, USA) pipettiert und für eine Minute auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde bei 2,5 kV, 25 µF und 600 Ω in einer vorgekühlten Elektroporationsküvette an einem Electro Cell Manipulator 600 (BTX, Holliston, USA) durchgeführt. Unmittelbar im Anschluss wurde 1 ml LB-Medium (37 °C) hinzugegeben. Die Bakteriensuspension wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden verschiedene Volumina der Suspension auf LB-Agarplatten mit entsprechender Antibiotika Resistenz ausgestrichen und für 24 h bei 37 °C inkubiert.

3.1.12 Herstellung elektrokompetenter *P. pastoris* Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *P. pastoris* X-33 Zellen wurde von einer YPDS-Platte Zellmaterial in 50 ml YPD (ohne Antibiotikum) überführt und über Nacht bei 30 °C, 200 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden aus der ÜN-Kultur 500 ml YPD Medium auf eine OD_{600nm} von 0,2 angeimpft. Die Kultur wurde für ca. 5 h–8 h bei 30 °C, 200 rpm inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 1,3-1,5 erreicht wurde. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis oder bei 4 °C durchgeführt. Die 500 ml Kultur wurde für 5 min bei 1.500 xg, 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Diese Suspension wurde wiederum bei 1.500 xg, 5 min, 4 °C zentrifugiert und das Pellet in 250 ml eiskaltem, sterilem Wasser resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 20 ml eiskaltem, sterilem 1 M Sorbitol resuspendiert, in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und noch am selben Tag verwendet.

3.1.13 Transformation von elektrokompetenten *P. pastoris* Zellen

Als Vorbereitung für die Transformation von *P. pastoris* Zellen wurden am Vortag die zu transformierenden Expressionsplasmide linearisiert. Dazu wurde das Restriktionsenzym *SacI* verwendet, welches eine Schnittstelle in der Sequenz der Expressionsvektoren pPICzA

aufweist. 15 µg Plasmid-DNA wurden mit dem Enzym *SacI* über Nacht für 16 h bei 25 °C inkubiert. Am Folgetag wurde während der Herstellung der elektrokompenten *P. pastoris* Zellen das restringierte Plasmid einer Natrium-Acetat-DNA-Fällung unterzogen. Die gefällte Plasmid-DNA wurde in 15 µl Aq. dest. resuspendiert und in der Transformationsreaktion eingesetzt.

Für die Elektroporation wurden 0,2 cm Elektroporationsküvetten genutzt. Die Küvetten wurden auf Eis vorgekühlt und mit 80 µl der elektrokompenten Zellen befüllt. Zusätzlich wurde die linearisierte Plasmidlösung hinzupipettiert.

Die Elektroporation erfolgte bei 1,5 kV für 5 ms mittels eines Multiporators (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Sofort nach dem Elektroschock wurde 1 ml eiskaltes 1 M Sorbitol hinzugegeben. Die Zellen wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und 1 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml YPD Medium hinzugefügt und die Zellen nochmals für eine weitere Stunde bei 30 °C, 200 rpm inkubiert. Es wurden je 100 µl und 200 µl auf YPDS-Platten (mit 200 µg/ml Zeocin) ausplattiert und mehrere Tage bei 30 °C inkubiert. Nach 4–6 Tagen Inkubation waren, nach erfolgreicher Transformation, Kolonien sichtbar.

3.2 *Proteinbiochemische Methoden*

3.2.1 *Protein Expression in P. pastoris*

Zur Expression in kleinen Volumina (<50 ml Kulturmedium, beispielsweise für Testexpressionen) wurde die entsprechende Menge YPD Medium (mit 200 µg/ml Zeocin) mit einer Hefekolonie des entsprechenden Konstrukts angeimpft und über Nacht bei 30 °C, 200 rpm inkubiert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium bei 2.000 xg, 10 min, 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im selben Volumen wie zur Vorkultur in Minimal-Expressionsmedium (MMY) resuspendiert. Nach 24 h wurde die Expressionsphase durch Zentrifugation bei 2.000 xg, 10 min, 4 °C und Schockgefrieren der Hefezellen in flüssigem Stickstoff beendet. Die Zellpellets wurden bei -80 °C gelagert.

Zur Expression größerer Volumina (>50 ml) wurden 50 ml YPD Medium (mit 200 µg/ml Zeocin) mit einer Hefekolonie des entsprechenden Konstrukts angeimpft und über Nacht bei 30 °C, 200 rpm inkubiert. In einem 2 l Kulturkolben mit Schikanen wurden 400 ml YPD Medium auf eine OD_{600nm} von 1,0 aus der Übernachtskultur angeimpft und 24 h bei 200 rpm inkubiert. Nach 24 h Stunden wurden 2 ml (finale Konz. 0,5 %) Glycerin als Kohlenstoffquelle

hinzugefügt und die Kultur nochmals für 24 h bei 30 °C, 200 rpm inkubiert. Nun folgte ein Zentrifugationsschritt bei 5.000 xg, 5 min, 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 400 ml MMY Medium resuspendiert. Nach 24 h Inkubation bei 30 °C, 200 rpm wurde die Zellkultur bei 5.000 xg, 5 min, 4 °C abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen, nochmals zentrifugiert und schließlich in flüssigem Stickstoff in 50 ml Reaktionsgefäßen eingefroren. Die Zellpellets wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Zellaufschluss und Präparation der Hefe-Zellmembranen

P. pastoris Zellpellets aus bis zu 50 ml Zellkultur wurden in 6 ml, auf 4 °C temperierten Aufschlusspuffer resuspendiert (versetzt mit dem Proteaseinhibitor *cOmplete, Mini*, Roche, Penzberg, Deutschland). Zellpellets aus 400 ml Zellkultur wurden in ca. 40 ml, auf 4 °C temperierten Aufschlusspuffer resuspendiert (versetzt mit dem Proteaseinhibitor *cOmplete*, Roche, Penzberg, Deutschland). Die Zellsuspension wurde in 15 ml Reaktionsgefäße überführt und ca. 1 cm Zirkonia-/Silicakugeln (Durchmesser 0,5 mm, *Zirkonia/Silica Beads*, BioSpec, Bartlesville, USA) wurden hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C mittels einer FastPrep 24 (Hochgeschwindigkeits-Homogenisator) (MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) fünfmal für 30 s mit Maximalleistung aufgeschlossen. Zwischen den Aufschlussschritten wurden die Zellen jeweils 30 s auf Eis gelagert. Das Zelllysate wurde bei 3.000 xg, 5 min, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und nochmals bei 5.000 xg, 10 min, 4 °C zentrifugiert, danach für weitere Analysen bei -20 °C weggefroren.

Für die Präparation der Gesamtzellmembranen sind, für analytische Zwecke, Volumen von bis zu einem Milliliter des Überstandes nach dem 5.000 xg Zentrifugationsschritt verwendet worden. Zur Trennung der unlöslichen Membranfraktion von der löslichen Fraktion wurde ein 100.000 xg Zentrifugationsschritt für 1 h bei 4 °C in einer Beckman Optima Tisch-Ultrazentrifuge durchgeführt (Rotor TI 45). Das resultierende Pellet enthält die unlösliche Membranfraktion, wohingegen der Überstand die zytosolische, lösliche Fraktion enthält (Wang *et al.*, 2006).

Für präparative Zwecke hingegen sind Volumen von bis zu 25 ml des Überstandes nach dem 5.000 xg Zentrifugationsschritt pro Ultrazentrifugationsröhrchen in einer Beckman Optima L-80 XP Ultrazentrifuge mit dem Rotor Ti 55.2 verwendet worden. Ebenso wie im analytischen Ansatz wurden die Proben bei 100.000 xg, 1 h bei 4 °C zentrifugiert und somit eine Trennung von unlöslicher Membranfraktion und löslicher zytosolischer Fraktion erreicht.

Das Membranpellet wurde mittels SDS-PAGE (siehe Abschnitt 3.2.13) analysiert oder mit einem Glaspotter in z.B. Membran-Aufschlusspuffer für spätere Reinigungsschritte homogenisiert.

3.2.3 PNGaseF Verdau

Zur Analyse des Glykosylierungsstatus des exprimierten PrPs wurde die Amidase PNGaseF (New England Biolabs, Ipswich, USA) verwendet. PNGaseF trennt spezifisch Asparagin verlinkte Zuckerketten von Proteinen ab. Während des Zellaufschlusses wurden direkt nach dem 5.000 xg spin 9 µl des Überstandes mit 1 µl PNGaseF denaturierendem Puffer nach den Herstellerangaben für 10 min bei 99 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 2 µl NP40 und 10x G7 Reaktionspuffer sowie 1 µl PNGaseF (500 U) hinzugegeben und der Reaktionsmix auf 20 µl mit Aq. dest. aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 1h bzw. 16 h bei 37 °C. Die Reaktion wurde nach 1 h bzw. 16 h durch die Zugabe von SDS-Auftragspuffer gestoppt. Die Analyse erfolgte durch eine SDS-PAGE und anschließenden Western Blot.

3.2.4 Proteinase K Verdau von PrP

Um zu analysieren, ob in *P. pastoris* exprimiertes PrP eine Resistenz gegenüber Proteinase K aufweist, wurden PrP-GPI und PrP Δ SS einem Verdau mit Proteinase K unterzogen (Proteinase K, recombinant PCR grade, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Nach dem Zellaufschluss und dem 5.000 xg spin wurde der Überstand der Proben in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Aus diesen Ausgangslösungen wurden jeweils 20 µl Zellsuspension entnommen und auf eine MgCl₂ Konzentration von 2 mM eingestellt. Zusätzlich wurde zum Verdau noch vorhandener Nukleinsäuren 1 µl Benzonase (250 U/µl, Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt. Schließlich wurde die gewünschte Proteinase K Konzentration eingestellt. Die Proben wurden bei 37 °C, 300 rpm für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von SDS-Auftragspuffer und Inkubation bei 99 °C für 10 min. Umittelbar im Anschluss wurden die Proben mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert.

3.2.5 Probenpräparation für die Fluoreszenzmikroskopie

PrP Konstrukte wurden in 50 ml *P. pastoris* Zellkulturen, wie unter 3.2.1 beschrieben, exprimiert. Nach 24 h Expression wurden 500 µl der Zellkultur abgenommen, zum Fixieren der Zellen auf eine Konzentration von 4 % Paraformaldehyd eingestellt und 1 h bei 30 °C inkubiert. Die Probe wurde bei 3.000 xg, 5 min pelletiert und in 1 ml S-Puffer (50 mM Hepes/1,2 M Sorbitol/pH 7,4) resuspendiert. Anschließend wurde die Probe wieder pelletiert. Nach wiederholtem Resuspendieren in 500 µl S-Puffer wurden 20 µl Zymolyase100T (2,5 mg/ml, MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) hinzugegeben und für 45 min bei 30 °C inkubiert. Nach dem Verdau der Zellwand wurde die Probe zweimal mit S-Puffer gewaschen und letztlich in 100 µl S-Puffer aufgenommen. Von dieser Probe wurden 25 µl auf Poly-L-Lysin bedeckte Deckgläser gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Nach zwei nachfolgenden Waschschritten mit PBS wurden die Deckgläser mit 2 % Milchpulver in PBS für 30 min blockiert. Nach einem weiteren Waschschriff wurde die Probe für 1 h mit dem Prion-Antikörper SAF32 inkubiert (5 µg/ml SAF32 in PBS) Die Deckgläser wurden gewaschen und mit dem fluoreszenzmarkierten *goat anti mouse* Zweitantikörper IgG H&L (Cy2) (Abcam. Ab6944, 10 µg/ml in PBS) für 1 h inkubiert. Nach drei weiteren Waschschriffen wurden die *Deckgläser* invertiert auf einen Tropfen ProLong Antifade Reagent (Invitrogen, P36934) auf ein Objektträger platziert und bei 4 °C gelagert.

GFP Konstrukte wurden ebenfalls in 50 ml *P. pastoris* Zellkulturen exprimiert. Nach 24 h Expression wurden 500 µl der Zellkultur abgenommen, zum Fixieren der Zellen auf eine Konzentration von 4 % Paraformaldehyd eingestellt und 1 h bei 30 °C inkubiert. Die Probe wurde bei 3.000 xg, 5 min pelletiert und in 1 ml S-Puffer resuspendiert. Anschliessend wurde die Probe nochmals pelletiert. Nach wiederholtem resuspendieren in 500 µl S-Puffer wurden 20 µl Zymolyase100T (2,5 mg/ml, MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich) hinzugegeben und für 45 min bei 30 °C inkubiert. Nach dem Verdau der Zellwand wurde die Probe zweimal mit S-Puffer gewaschen und letztlich in 100 µl ProLong Antifade Reagent aufgenommen, da aufgrund der GFP Eigenfluoreszenz keine Antikörperfärbung durchgeführt werden musste. Von dieser Probe wurden 25 µl direkt auf Objektträger platziert und mit einem Deckglas bedeckt. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert.

3.2.6 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mittels eines konfokalen laser-scanning Mikroskopes Olympus FV1000, ausgestattet mit einem 60X UOLSAPO Objektiv N.A. 1.35 im Institut für Molekulare Physikalische Chemie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Prof. Seidel) durchgeführt. Die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörper wurden bei 488 nm angeregt und die Emission bei einer Bandbreite zwischen 500 nm-600 nm detektiert.

3.2.8 Reinigung von PrP aus *P. pastoris*

3.2.8.1 Solubilisierungsanalyse

Bei der Aufreinigung von Membranproteinen besteht der erste Schritt in der Präparation der Membranfraktionen in welcher sich die Membranproteine befinden. Dies wurde in dieser Arbeit durch differentielle Zentrifugation erreicht (zwei Zentrifugationsschritte bei 3.000 xg und 5.000 xg, anschließend ein 100.000 xg Ultrazentrifugationsschritt). PrP-GPI ist über einen GPI Anker durch zwei Fettsäureketten in der Zellmembran verankert. Um PrP-GPI aus der Zellmembran herauszulösen, wurden verschiedene Detergenzien und Puffer getestet. Die Konzentration an Membranprotein wurde auf ~5 mg/ml eingestellt. Nach Zugabe der Detergenzien wurden die Proben 1 h bei Raumtemperatur solubilisiert und anschließend einem 100.000 xg Ultrazentrifugationsschritt unterzogen. Der Überstand wurde mittels Western Blot auf die erfolgreiche Solubilisierung von PrP-GPI hin getestet.

Folgende Puffer wurden zur Solubilisierung benutzt:

1. 50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl, pH 7,5
2. 50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl, 100 mM ϵ -Aminocaprinsäure; pH 7,5
3. 10 mM Tris/HCl; 100 mM KCl; 320 mM Sucrose; pH 7,5
4. 10 mM Tris/HCl; 100 mM KCl; 320 mM Sucrose; 100 mM ϵ -aminocaprinsäure; pH 7,5
5. 150 mM Tris/HCl; 320 mM Sucrose; pH 7,5
6. 150 mM Tris/HCl; 320 mM Sucrose; 100 mM ϵ -aminocaprinsäure; pH 7,5
7. 6 M GdnHCl; 50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 100 mM NaH₂PO₄; pH 7,5

Neben den verschiedenen Puffern wurden für jeden Puffer folgende Detergenzien getestet:

- A. 1 % SDS
- B. 1 % TritonX100
- C. 1 % Tween 20
- D. 2 % Zwittergent 3-14
- E. 3 % OG (n-Octyl- β -D-Glucopyranoside)
- F. 3 % CHAPS
- G. 1,5 % NP40 (Nonoxinol 40)
- H. 1 % DOC (Natriumdesoxycholat)
- I. 1 % TritonX114
- J. Kein Detergenz (Negativkontrolle)

1 % SDS (Detergenz A) wurde in jedem Experiment als Positivkontrolle verwendet.

3.2.8.2 Immobilisierte-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)

Der in der Proteinsequenz integrierte His₇-Tag der Konstrukte PrP-GPI sowie PrP Δ SS ermöglichte die Reinigung mittels immobilisierter-Metallionen-Affinitäts-Chromatographie. Bei dieser Methode wurden Chromatographiesäulen verwendet, an deren Matrix Nitrilotriessigsäure (NTA) kovalent gebunden ist. NTA hat die Eigenschaft als Chelatligand zweiwertige Metallionen wie Ni²⁺ oder Cu²⁺ zu binden. Die zwei der sechs verbliebenen Bindestellen des Zentralatoms, in diesem Fall des Ni²⁺-Ions, weisen eine hohe Affinität zu benachbarten Histidinen (His-Tag) einer Proteinsequenz auf, wodurch spezifisch das His-getaggte Protein aus einer Proteinlösung isoliert werden kann. Zur späteren Elution des gebundenen Proteins wird meist Imidazol in Konzentrationen bis zu 500 mM eingesetzt, welches stärker als der His-Tag an das Zentralatom bindet.

Zur Reinigung der PrP-Konstrukte wurden, wie unter 3.2.2 beschrieben, frisch präparierte *P. pastoris* Zellmembran-Pellets verwendet. Nach dem 100.000 xg Ultrazentrifugationsschritt wurden die Membranpellets in einen Glaspotter überführt und homogenisiert. Die Protokolle zur Reinigung werden hier exemplarisch für Membranpellets aus einer 400 ml Zellkultur beschrieben. Für die denaturierende IMAC-Reinigung mittels GdnHCl-Puffer wurde das Membranpellet in 1/10 des Volumens der Ausgangskultur (~40 ml) 6 M GdnHCl-Reinigungspuffer homogenisiert und 1 h bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer

solubilisiert. Nach der Solubilisierung wurde die Probe ohne nachfolgenden Ultrazentrifugationsschritt auf die zuvor in GdnHCl-Reinigungspuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule (1 ml) geladen. Der Waschschrift erfolgte ebenfalls mit GdnHCl-Reinigungspuffer ohne Imidazol. Die anschließende Elution der Probe erfolgte durch Injektion von GdnHCl-Elutionspuffer (500 mM Imidazol) über einen 10 ml Gradienten von 0 % auf 100 % Imidazol. Die Flussgeschwindigkeit betrug 1 ml/min, die Temperatur während der Reinigung 4 °C.

Die IMAC-Reinigung mittels SDS-Puffer wurde durchgeführt indem das Membranpellet in 1/10 des Volumens der Ausgangskultur (~40 ml) Membran-Aufschlusspuffer (M-B-B) aufgenommen und homogenisiert wurde. Nach der Homogenisation wurde die Probe auf 1 % SDS eingestellt und 1 h bei Raumtemperatur auf einem Magnetprüher solubilisiert. Da Ni-NTA-Säulen nicht für die Verwendung von SDS ausgelegt sind und die (nicht empfohlene) maximale Konzentration mit 0,3 % SDS angegeben wird, wurde die Probe nach der Solubilisierung auf 0,1 % SDS (400 ml) mit M-B-B verdünnt. Anschließend wurde die Probe an einer Äkta Prime (GeHealthcare, Solingen, Deutschland) auf die zuvor in M-B-B äquilibrierte Ni-NTA-Säule geladen. Ab der Äquilibrierung der Säule wurde jeder Puffer auf eine Konzentration von 0,1 % SDS eingestellt. Das Beladen der Säule erfolgte bei 2 ml/min Flussgeschwindigkeit. Nach dem Beladen der Säule erfolgte die Elution durch Injektion von Membran-Aufschlusspuffer-Elution, ebenfalls eingestellt auf 0,1 % SDS. Die SDS-NiNTA-Reinigung wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, da SDS bei 4 °C nicht löslich ist.

Die gesammelten Elutionsfraktionen wurden bei 4 °C gelagert und möglichst am folgenden Tag für die rpHPLC-Reinigung verwendet.

3.2.8.3 reversed phase high performance liquid chromatography (rpHPLC)

Der zweite und letzte Reinigungsschritt erfolgte über *reversed phase high performance liquid chromatography* (rpHPLC) (HPLC 1260 Infinity, Agilent; Böblingen, Deutschland). Mit Hilfe dieses Reinigungsschrittes war es möglich, eine effektive Trennung des gewünschten Zielproteins von noch vorhandenem Fremdprotein nach der Ni-NTA-Reinigung zu erzielen. Außerdem wurde ein Austausch des IMAC-Elutionspuffers gegen Aq. dest./Acetonitril-Puffer erreicht. Ein Gemisch aus Aq. dest. und Acetonitril (ACN) kann zu einem späteren Zeitpunkt problemlos lyophilisiert werden.

Alle HPLC-Reinigungsschritte wurden an einer analytischen Zorbax SB300-C8 Säule (Agilent, Böblingen, Deutschland) durchgeführt. Als stationäre Phase diente hierbei unpolares C8-

Säulenmaterial. Die Trennung von Proteinlösungen erfolgt bei dieser Methode über die unterschiedliche Hydrophobizität verschiedener Proteine und somit über unterschiedlich starke Interaktion mit dem hydrophoben Säulenmaterial. Über einen Gradienten mit steigender Acetonitrilkonzentration sinkt die Polarität der mobilen Phase was zur Elution weniger polarer Proteine führt

Die Flussgeschwindigkeit bei Verwendung dieser Säule beträgt 1 ml/min. Maximal 100 µl Probenvolumen wurden je HPLC-Lauf injiziert.

Der verwendete Aq. dest./Acetonitril-Gradient ist in Abbildung 9 dargestellt.

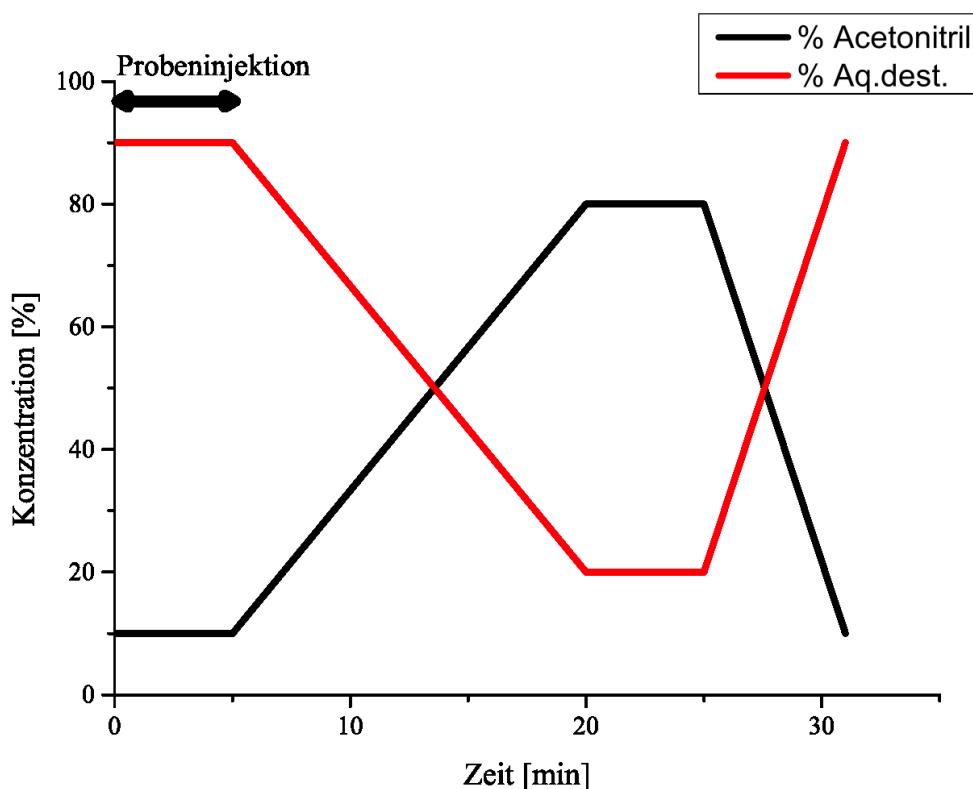


Abbildung 9: Verwendetes Chromatographieprogramm zur HPLC-Reinigung von PrP^ΔSS sowie PrP-GPI. In rot ist die Konzentration (%) an Aq. dest., in schwarz die Konzentration (%) an Acetonitril dargestellt. Die Probeninjektion erfolgte innerhalb der ersten fünf Minuten. Die Flussgeschwindigkeit betrug durchgehend 1 ml/min.

3.2.9 Lyophilisierung des PrP

PrP-Proben, welche nach dem HPLC-Schritt in einem Acetonitril/Aq. dest.-Gemisch vorlagen, wurden in 2 ml Reaktionsgefäßen oder 12 ml Reaktionsgefäßen über Nacht in einer Vakuumentrifuge mit Kühlfalle (SpeedVac RVC 2-18, Lyophile LT105, Christ, Osterode, Deutschland) lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde bei 4 °C, luftdicht verschlossen, gelagert.

3.2.10 Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung

PrP-Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes (Formel 2) über die Absorption aromatischer Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm berechnet. Zur Bestimmung wurde ein Spektralphotometer (Jasco V-650, Gross-Umstadt, Deutschland oder Nanodrop ND2000, Peqlab, Erlangen, Deutschland) verwendet. Mit bekanntem Extinktionskoeffizienten war es möglich die Konzentration zu bestimmen. Für PrP-GPI wurde dabei die Sequenz von PrP^ΔSS als Grundlage genommen, da das genaue Gewicht der Glykosylierungen und des GPI-Ankers nicht bekannt waren. Aus diesem Grund wurde von einem Molekulargewicht von 24.192 Da und einem Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{280} = 62.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ausgegangen (berechnet mittels expasy – protparam, <http://web.expasy.org/protparam/>).

$$E_{\lambda} = \lg \left(\frac{I_0}{I_1} \right) = \epsilon_{\lambda} \times c \times d$$

Formel 2: Lambert-Beer'sches Gesetz

I_1 : Intensität des transmittierten Lichtes (W/m^2)

I_0 : Intensität des eingestrahlt Lichtes (W/m^2)

c : Stoffmengenkonzentration (mol/l)

d : Schichtdicke (m)

ϵ_{λ} : dekadischer, molarer Extinktionskoeffizient (m^2/mol)

3.2.11 Zirkulardichroismus Spektroskopie

Die Bestimmung der Sekundärstrukturanteile eines Proteins wurde mittels CD (Zirkulardichroismus)-Spektroskopie durchgeführt. Diese Methode basiert auf der unterschiedlichen Absorption von rechts bzw. links zirkular polarisiertem Licht durch optisch

aktive Moleküle. Der Unterschied der Absorption zwischen beiden Polarisierungsrichtungen ($\Delta A = A_L - A_R$) ist die gemessene Größe und wird in Elliptizität (Θ) angegeben.

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

Formel 3: Berechnung der Elliptizität

λ = Wellenlänge $\varepsilon_{L/R}$ = Extinktionskoeffizient der links- bzw. rechtspolarisierten Komponente

c = Konzentration d = Schichtdicke der Küvette

Jede Proteinsekundärstruktur zeigt ein charakteristisches CD-Spektrum, da α -helikale, β -Faltblatt oder unstrukturierte Aminosäureketten je nach Wellenlänge links bzw. rechts zirkular polarisiertes Licht unterschiedliche stark absorbieren (Abbildung 10).

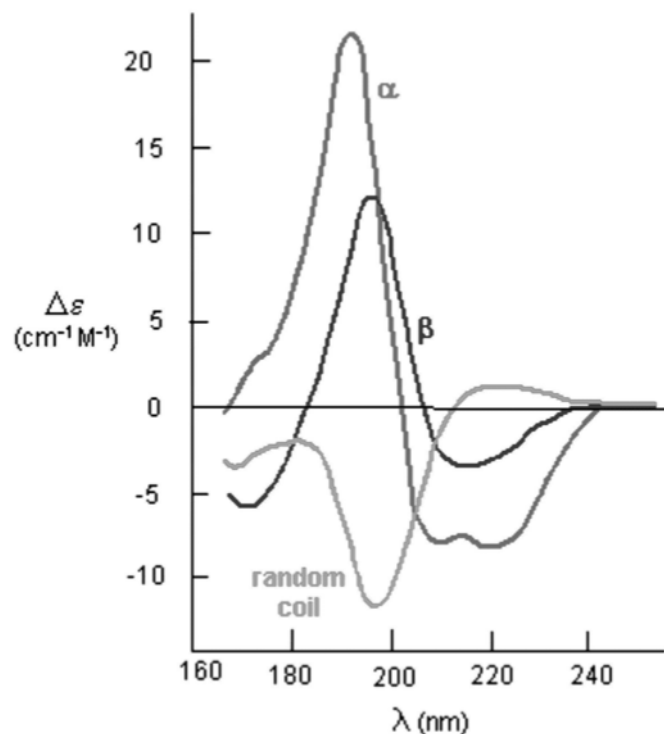


Abbildung 10: CD-Spektren bekannter Sekundärstrukturelemente

Abbildung 10 zeigt typische CD-spektren mit hauptsächlich einem Sekundärstrukturelement.

α = α -Helices, β = β -Faltblatt, „random coil“ = unstrukturierte Aminosäurekette ohne Sekundärstrukturelemente. (Brahms *et al.*, 1980).

Alle CD-Spektren dieser Arbeit wurden mit dem CD-Spektrometer Jasco-J815 (Modell J815, Jasco GmbH, Gross-Umstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Spektren wurden in 1 mm Quarzglas-Küvetten aufgenommen (Hellma, Mühlheim, Deutschland). Tabelle 9 zeigt die verwendeten Messparameter.

Tabelle 9: Verwendete Messparameter der CD-Messungen

Messparameter	Einstellung
Akkumulationen	10
Messgeschwindigkeit	50 nm/min
Auflösung	1 nm
Messbereich	190 – 260 nm
Responsezeit	1 s
Temperatur	20 °C
Schichtdicke	1 mm

Die jeweiligen Pufferspektren wurden von allen gemessenen Spektren subtrahiert und die Spektren in molare Elliptizität pro Aminosäurerest umgerechnet (Θ_{MRW}). Die Umrechnung erfolgte dabei wie folgt:

$$\theta_{MRW} = \frac{MRW \times \theta}{10 \times c \times d}$$

Formel 4: Berechnung der Elliptizität Θ_{MRW} pro AS

Θ_{MRW} = Elliptizität pro AS
c = Konzentration

MRW („mean residue weight“) = Molekulargewicht / Anzahl AS – 1
d = Schichtdicke der Küvette

3.2.12 Rekonstitution von PrP-GPI in Liposomen

Zur Analyse der Interaktion des Prion Proteins mit Liposomen mittels des GPI-Ankers, werden *raft-like* Liposomen hergestellt. Dazu werden dünne, getrocknete Lipidfilme in einem Glasgefäß erzeugt. Werden diese Lipidfilme hydratisiert, beginnen die gestapelten *lipid bilayers* zu quellen und werden fluide. Die nun hydratisierten Lipidfilme lösen sich von der Gefäßoberfläche und bilden spontan große multilamellare Vesikel (MLV). Somit wird die Interaktion der hydrophoben Lipid-Kohlenwasserstoffketten mit dem Lösungsmittel (Aq. dest.) minimiert. Die Größe der spontan gebildeten MLV kann durch externe Energiezufuhr reduziert werden, beispielsweise durch Hochdruckhomogenisation oder durch Ultraschallbehandlung. Durch diese Behandlung entstehen die so genannten kleinen unilamellaren Vesikel (SUV) mit einem Durchmesser von 50 nm–300 nm (Abbildung 11). Durch Variation des Puffers, in dem MLV hergestellt werden, kann der Inhalt der späteren SUV bestimmt werden. So kann ein Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt werden, der sich nach der Präparation innerhalb der SUV

befindet. Anschließend kann durch Größenausschlusschromatographie der freie Fluoreszenzfarbstoff im verbleibenden Puffer von den SUV's abgetrennt werden.

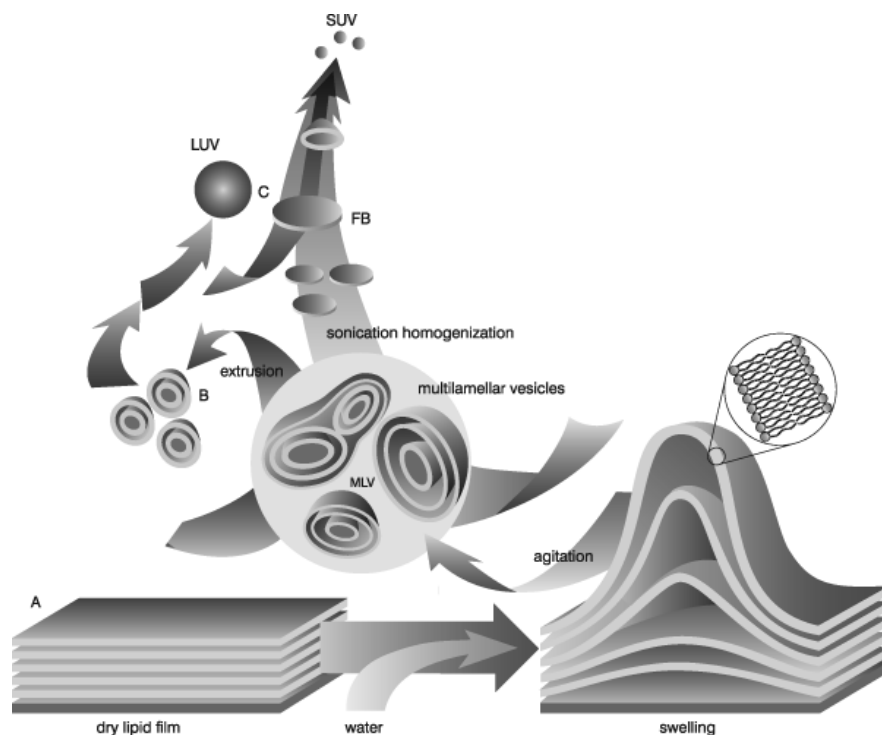


Abbildung 11:
Schematischer
Mechanismus der
Vesikelbildung:

Werden Lipidfilme hydratisiert kommt es zur spontanen Bildung von MLV. Die Größe dieser Strukturen kann durch Energiezufuhr unter Bildung von SUV reduziert werden. Abbildung aus (Vanniasinghe *et al.*, 2009)

3.2.12.1 Präparation kleiner unilamellarer Vesikel (SUV)

Zur Herstellung von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUV) wurden 300 µl der *raft-like* Lipidlösung in ein konisches Glasgefäß überführt. Es ist dabei darauf zu achten, dass die Lipidlösung in Chloroform gelöst vorliegt und Chloroform Weichmacher aus Plastik löst welche später eine gewisse Eigenfluoreszenz aufweisen können. Deshalb wurden zur Entnahme der Lipidlösung Mikroglasspipetten (Brand GmbH & Co.; Wertheim; Deutschland) benutzt. Das Lösungsmittel wurde zunächst im Stickstoffstrom abgedampft und dabei darauf geachtet, dass die Lipidlösung möglichst großflächig verteilt wird. Anschließend wurde das Glasgefäß für 1 h in einem Rotationsverdampfer im Vakuum inkubiert, um Lösungsmittelreste vollständig zu entfernen. Der nun vorhandene dünne Lipidfilm wurde mit 1 ml einer 300 µl Carboxyfluoresceinlösung für 1 h im Ultraschallbad inkubiert. Die so entstandenen MLV wurden für 30 min mit einer Ultraschall-Nadelsonde bei einer Leistung von 30 Watt und einer Frequenz von 0,5 s behandelt (SONOPLUS ww3200, BANDELIN, Berlin, Deutschland) und somit SUV generiert.

3.2.12.2 Trennung von Liposomen und Farbstoff

Die Trennung der Liposomen von dem noch im Puffer befindlichen freien Fluoreszenzfarbstoff wurde durch Größenausschusschromatographie bewerkstelligt. Als Säulenmaterial diente Sephadex G-50 fine (Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland), aufgefüllt auf eine Säulenhöhe von ca. 15 cm. Die Säule wurde mit Aq. dest. gespült und mit CBS-Puffer äquilibriert. Die zuvor hergestellten SUV wurden auf das Säulenmaterial aufgetragen und nach dem Einlaufen der farbigen SUV-Lösung wurde die Säule vorsichtig mit CBS-Puffer gespült. Während der Chromatographie trennen sich SUV mit eingeschlossenem Farbstoff als orange gefärbte Bande deutlich von dem langsamer laufenden freien Farbstoff ab, wodurch die SUV als separate Bande gesammelt werden konnten (ca. 1 ml Volumen SUV-Lösung). Die SUV wurden bei 4 °C gelagert und noch am selben Tag verwendet.

3.2.12.3 Rekonstitution von PrP in Liposomen

Rekonstitutionsexperimente von CHO-PrP^C in Liposomen wurden bereits in Vorarbeiten durchgeführt (Elfrink, 2005; Gruening, 2010). Das dort verwendete Protokoll wurde leicht modifiziert übernommen. In dieser Arbeit wurden PrP und Liposomen immer in einem Verhältnis von 1:80.000 eingesetzt. Grundlage ist die Annahme, dass das gesamte eingesetzte Lipid in der SUV-Liposomenfraktion der Größenausschusschromatographie vorhanden ist. Die *raft-like* Lipidmischung hat ein aus allen Einzelkomponenten berechnetes Molekulargewicht von 613,3 Da (Tabelle 3). Für das molare Verhältnis von 1:80.000 wurde zur Berechnung der benötigten Lipidmenge das durchschnittliche Molekulargewicht von 613,3 Da zu Grunde gelegt.

Beispiel: Bei Verwendung von 300 µl Lipid-Stammlösung wurden 7050 nmol Lipid verwendet. Das Volumen der SUV-Liposomenfraktion betrug 1 ml. Das bedeutet dass, pro µl eine Konzentration von 7,05 nmol/µl vorlag. Da in vorherigen Arbeiten mit CHO-PrP^C von einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 33 kDa ausgegangen wurde (inklusive Glykosylierungen und GPI-Anker), wurde in dieser Arbeit ebenfalls 33 kDa als Molekulargewicht von PrP-GPI vorausgesetzt (Nur in diesem Rekonstitutionsexperiment um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten). Um ein molares Verhältnis von PrP-GPI zu Liposomen zu erhalten, müssen 5 µl PrP-GPI (70 ng/µl Ausgangskonzentration / 2 pmol/µl Endkonzentration) mit 113 µl SUV-Liposomenmischung gemischt werden.

Zur Rekonstitution von PrP-GPI in den SUV-Liposomen, wurden Protein und Liposomen für 30 min bei 30 °C und 650 rpm gemeinsam inkubiert.

3.2.12.4 Dichtegradientenzentrifugation

Zur Trennung von Liposomen und nicht rekonstituiertem Protein wurde eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde die PrP-Liposomenprobe auf 30 % Saccharose mit einer 50 % Saccharosestammlösung eingestellt (w/w)(zu den ca. 115 µl Probe wurden ca. 173 µl 50 % Saccharoselösung hinzugegeben). Diese Probe wurde in Ultrazentrifugations-Polyallomergefäße (Beckmann, Palo Alto, USA) überführt und mit je 200 µl 20 %, 15 %, 10 % und 5 % Saccharoselösung überschichtet (w/w). Nach der Zentrifugation für 3 h bei 4 °C und 135.000 xg (TLS-55 Rotor, Beckmann Optima TM Ultrazentrifuge, Palo Alto, USA) wurden jeweils 200 µl Fraktionen abgenommen. Das im Zentrifugationsröhrchen befindliche Pellet wurde in 200 µl SDS-Auftragspuffer aufgekocht. Jeweils 150 µl der 200 µl Fraktionen wurden per Dot-Blot untersucht. Zusätzlich wurden 40 µl der 200 µl Fraktionen auf ihre Fluoreszenz und somit die Position der Liposomen im Gradienten hin untersucht (3.2.12.5).

3.2.12.5 Nachweis der Liposomenfraktionen

Da die hergestellten Liposomen eine Carboxyfluoresceinlösung enthielten, konnte jede Fraktion im Fluoreszenzspektrometer (Infinite M200Pro, Tecan, Männedorf, Schweiz) auf die Anwesenheit von Liposomen untersucht werden. Da Carboxyfluorescein in den Liposomen gequencht vorliegt, wurden zu den 40 µl Probe jeweils 5 µl einer 10 %igen TritonX100 Lösung hinzupipettiert um die Liposomenmembran zu permeabilisieren. Die Fluoreszenzintensität der Fraktionen wurde anschließend bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Detektionswellenlänge von 520 nm gemessen.

3.2.13 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen wurde die denaturierende, diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Laemmli angewendet (Laemmli, 1970). Als Elektrophoreseapparatur diente hierbei das „Mini Protean Tetra Cell System“ von Biorad (München, Deutschland). Es wurden 15 %ige Trenngele zwischen vertikalen Gelplatten gegossen und das Trenngel mit einer schmalen Schicht Isopropanol überzogen. Nach der Auspolymerisation des Gels wurde die Isopropanolschicht entfernt und eine 5 %ige Sammelgelschicht auf das Trenngel gegossen. Die fertigen, auspolymerisierten Gele wurden bis zu zwei Wochen bei 4 °C, feucht im Kühlschrank gelagert.

Proteinproben für die SDS-PAGE wurden mit einem 4fach SDS-Autragspuffer versetzt und 10 min bei 99 °C aufgeköcht. Im Anschluss erfolgte eine kurze Zentrifugation (<5 s). Die Gelelektrophorese wurde bei konstanten 200 V, 45 min durchgeführt. Die Abschätzung des Molekulargewichts im Gel sichtbarer Banden erfolgte durch den Vergleich zu je 5 µl Proteinstandard (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas, Kanada).

3.2.13.1 Nachweis von Proteinen mittels Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau

In dieser Arbeit wurde neben der Methode der Silberfärbung (3.2.13.2) die Methode der Coomassie-Färbung mit den beiden Farbstoffen Coomassie R-250 sowie G-250 zur Anfärbung von Proteinen in PAA-Gelen (Polyacrylamid-Gele) angewendet. Durch Coomassie-Färbung können Proteinbanden bis zu einer Nachweisgrenze von 100 ng–500 ng sichtbar gemacht werden. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel einmal in 50 ml Aq. dest. gewaschen und anschließend für 15 min in 100 ml Coomassie Färbelösung inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Gel zweimal mit je 50 ml Aq. dest. gewaschen und für 30 min mit ausreichend Aq. dest. bedeckt in der Mikrowelle bei voller Leistung erhitzt. Danach wurde das Gel für mehrere Stunden in 200 ml-300 ml Coomassie Entfärbelösung bis zum gewünschten Grad der Entfärbung inkubiert.

3.2.13.2 Nachweis von Proteinen mittels Silberfärbung

Die Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen erfolgte mit dem PageSilver Silver Staining Kit von Fermentas nach den Angaben des Herstellers. Proteinbanden bis zu einer Nachweisgrenze von 0,1–2 ng Protein können laut Herstellerangaben nachgewiesen werden.

3.2.14 Western-Blot und Immunologischer Proteinnachweis

3.2.14.1 Dot Blot

Beim Verfahren des Dot-Blots werden Proteine unter Vakuumeinfluss auf eine Nitrocellulose-Membran (Pure Nitrocellulose Blotting Membrane, PALL Life Sciences, Dreieich, Deutschland) übertragen. Es wurde die Apparatur *Dot Blot 96 Complete* (DHM96, Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Der Aufbau bestand aus der unteren Auffangkammer, einem 96-Loch Aufsatz, 2 Lagen in Blotting Puffer getränktem Whatman Papier (Whatman 3MM Chr, GeHealthcare, Solingen, Deutschland), der in Blotting Puffer aktivierten Nitrocellulose Membran und dem 96-Loch Probenbehälter, welcher mit der unteren Auffangkammer verschraubt wurde. In die entsprechenden Wells der 96-Loch Platte wurden die Proben pipettiert und die nicht genutzten, freien Wells jeweils mit 100 µl Aq.dest aufgefüllt. Durch Anlegen von Vakuum wurden die Proben durch die Nitrocellulosemembran gesogen und somit die Proteine auf die Membran übertragen.

3.2.14.2 Semi-Dry Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden die Proteine des Polyacrylamid-Gels auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Hierzu wurde ein *semi-dry* Western Blot nach dem Schema in Abbildung 12 durchgeführt. Die Durchführung erfolgte in einer Trans Blot Turbo Transfer System Apparatur von Biorad bei 25 V und 1 A für 30 min.

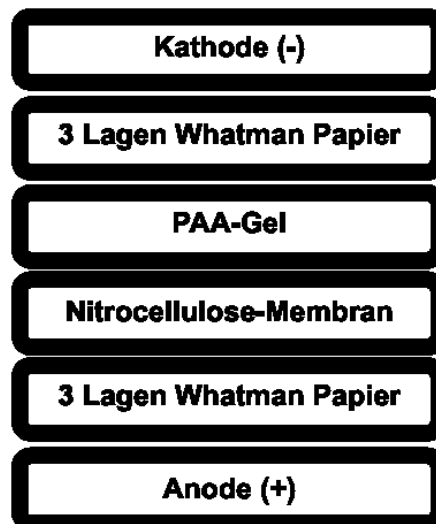


Abbildung 12: Schematischer Aufbau eines *semi-dry* Western Blots

Als Filterpapier wurden jeweils 3 Lagen in Blotting Puffer getränktes Whatman Papier verwendet.
PAA-Gel: Polyacrylamid-Gel.

3.2.14.3 Immunologischer Proteinnachweis

Nach dem Dot oder Western Blot wurde die Nitrocellulosemembran zur Absättigung der noch verbliebenden, unspezifischen Bindestellen für 45 min in 5 % Milchpulver (in TBS-T) geblockt. Nach Dekantieren des Milchpulvers wurde die Membran zweimal 5 min mit TBS-T gewaschen bevor die Inkubation mit dem jeweiligen Erstantikörper für >1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C erfolgte. Alle verwendeten Antikörper sind in Tabelle 4 ersichtlich. Als Detektionsantikörper wurde ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Zweitantikörper verwendet. Die Inkubation der Membran mit dem Zweitantikörper erfolgte für 1 h bei RT. Zur Reduzierung des Hintergrundes wurde die Membran dreimal 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Detektion des Zweitantikörpers erfolgte durch die Oxidation von Luminol nach der Zugabe der Detektionslösung (SuperSignal West Pico, Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA) und wurde mittels Biolumineszenzimager (LAS-3000 Imager, FujiFilm, Düsseldorf, Deutschland) detektiert.

3.2.15 Festkörper-NMR Analyse von membrangebundenem PrP

Zur Expression und Präparation einer PrP-GPI Probe, die in der Hefe-Plasmamembran mittels des GPI-Ankers verankert ist, wurde das Konstrukt Syrian Hamster (SHa)-PrP verwendet. Dieses Konstrukt verfügt über keinen His-Tag zur Reinigung, sondern besteht lediglich aus der natürlich vorkommenden PrP-Sequenz des Syrischen Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*) inklusive beider Signalsequenzen (C- und N-terminaler) (siehe Abbildung 23). Das membranverankerte PrP wurde dann mittels Festkörper-NMR nachgewiesen.

Zur Herstellung der NMR-Probe wurden 25 ml YPD Medium (mit 200 µg/ml Zeocin zur Selektion) mit *P. pastoris*-Zellmaterial des Konstrukts SHa-PrP inokuliert und über Nacht bei 30 °C, 220 rpm inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden 200 ml YPD Medium auf eine OD₆₀₀ von 1 mit der ÜN-Kultur angeimpft und 24 h bei 30 °C, 220 rpm inkubiert. Nach 24 h wurde nochmals 0,5 % Glycerin als Kohlenstoff-Quelle hinzugegeben, um eine möglichst hohe Zelldichte zu gewährleisten und die Probe weitere 24 h inkubiert. Nach der zweitägigen Wachstumsphase wurden die *P. pastoris*-Zellen abzentrifugiert und in 200 ml Minimal Medium (MMY) aufgenommen. Um sicherzustellen, dass sämtliche Kohlenstoff-Quellen aufgebraucht waren und somit eine vollständige ¹³C-Markierung zu gewährleisten, wurde die Probe 2 h bei 30 °C, 220 rpm in Minimalmedium „ohne“ Methanol inkubiert. Erst nach diesem Inkubationsschritt ohne Kohlenstoff-Quelle erfolgte die Zugabe von 0,5 % ¹³C-markiertem Methanol, wodurch die heterologe Proteinexpression, gesteuert durch den Alkoholoxidase-Promoter, gestartet wurde. Nach 24 h Expression wurden die Zellen abzentrifugiert, einmal in 100 ml Aq. dest. gewaschen und nochmals pelletiert. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Präparation gelagert.

Anschließend wurde das Zellpellet wie unter Abschnitt 3.2.2 beschrieben aufgeschlossen und das Membranpellet präpariert. Das Membranpellet wurde mit 40 ml Membran-Aufschlusspuffer (50 mM Tris-HCl/150 mM NaCl/30 % Glycerin/pH 7,4) in einem 50 ml Glaspotter homogenisiert. Aus Vorversuchen war bekannt, dass PrP-GPI nicht durch milde Detergentien aus der Hefe-Plasmamembran solubilisiert werden kann. Dieser Umstand konnte genutzt werden, um möglichst viele Membranproteine aus der Membran zu entfernen, mit Ausnahme des PrP-GPI. Durch diesen zusätzlichen Schritt können in milden Detergenzien lösliche, eventuell ebenfalls ¹³C-markierte Fremdproteine aus der Membran solubilisiert und somit die Reinheit des ¹³C-PrP-GPI in der Plasmamembran erhöht werden. Hierdurch sollten in NMR-Spektren weniger nicht PrP-spezifische Signale detektiert werden. Die Probe wurde auf je 0,5 % NP-40, DOC und Triton X100 eingestellt und 1 h bei RT auf einem Magnetprüher

solubilisiert. Nach dem Solubilisierungsschritt wurde nochmals ein 100.000 xg Ultrazentrifugationsschritt für 1 h bei 4 °C durchgeführt. Der Solubilisierungsüberstand, der im Normalfall nach einer Solubilisierung das gewünschte Zielprotein enthält, wurde in diesem Fall verworfen und das erhaltene („vorgereinigte“) Membranpellet weiterverwendet. Ab diesem Zeitpunkt wurde die Probe möglichst bei 4 °C gelagert.

Ein 3,2 mm Festkörper-NMR-Rotor wurde mit dem so gewonnenen „vorgereinigten“ Membranpellet befüllt und im Forschungszentrum Jülich (Institute of Complex Systems (ICS-6), Research Centre Jülich, Deutschland) vermessen. Die Festkörper-NMR Experimente wurden an einem 14.1 T Agilent Spectrometer, ausgerüstet mit einem 3,2 mm Triple-Resonanz (^1H , ^{13}C , ^{15}N)-Probenkopf, bei $8 \text{ kHz} \pm 3 \text{ Hz}$ MAS durchgeführt. Ein 2D-(^{13}C - ^{13}C)-PDSD-Spektrum (Szeverenyi, 1982) wurde bei einer Temperatur von 0 °C mit einer Mischzeit von 20 ms, 94 Inkrementen und 352 Transienten pro Inkrement aufgenommen. Die Temperatur wurde mit Nickelocen kalibriert (Heise *et al.*, 2001). Das Kühlgas wurde auf eine Temperatur gesetzt, die in einer Proben temperatur von $0 \text{ °C} \pm 2.5 \text{ °C}$ resultierte. Alle chemischen Verschiebungen wurden extern auf Adamantan referenziert. ^1H - und ^{13}C -90° Feldstärken betragen 83.0 kHz bzw. 45.5 kHz. Für heteronuklearen Transfer wurde Breitband (^1H - ^{13}C) SPECIFIC-CP (Baldus, 1998) verwendet. Während indirekter Evolutionsphase und FID-Akquisition wurde mit 83.0 kHz SPINAL entkoppelt (Bennett, 1998). FIDs wurden mit NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995) unter Verwendung exponentieller Gewichtungsfunktionen mit und ohne linearer Vorhersage in der indirekten Dimension prozessiert und mit Sparky 3.114 (T. D. Goddard and D. G. Kneller, University of California, San Francisco) analysiert.

4. Ergebnisse

Der Ergebnisteil dieser Arbeit ist in zwei Teilbereiche gegliedert. Der erste Teil (Abschnitt 4.1-4.6) befasst sich mit der Klonierung der verschiedenen PrP- und GFP-Konstrukte, mit der Expression von PrP und GFP in *P. pastoris* und der Charakterisierung des exprimierten PrP. Dabei wurde das exprimierte PrP untersucht bezüglich Lokalisation in der Hefezelle, Glykosylierungsstatus und dem Vorhandensein eines Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Ankers mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, Proteinase K und PNGaseF Verdauung sowie dem Vergleich zum löslichen Modellprotein GFP.

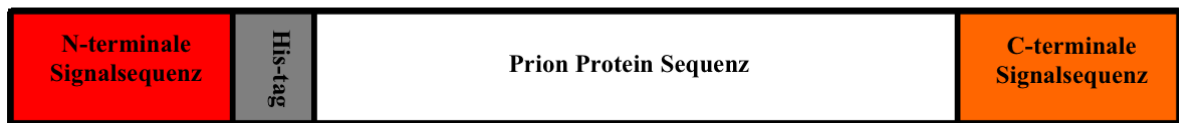
Der nachfolgende, zweite Teil (Abschnitt 4.7-4.11) umfasst die Etablierung der Reinigung des in *P. pastoris* exprimierten PrPs sowie erste strukturelle Analysen mittels verschiedener biophysikalischer Methoden wie CD-Spektroskopie oder Festkörper-NMR-Spektroskopie.

4.1 Klonierung

4.1.1 PrP-GPI

Als erstes Konstrukt zur Expression von PrP in *P. pastoris* wurde PrP-GPI kloniert. Dieses Konstrukt besteht aus der N- und C-terminalen SHa-PrP spezifischen Signalsequenz, sowie einem His₇-Tag zwischen der N-terminalen Signalsequenz und der PrP-Proteinsequenz, schematisch in Abbildung 13 dargestellt.

PrP-GPI



28936 kDa / 262 AS vor Prozessierung

23990 kDa / 217 AS / pI 9.58 nach Prozessierung

MANLSYWLLALFVAMWTDVGLCHHHHHHHHGKKRKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGTW
GQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAG
AVVGLGGYMLGSAMSRPMMHFGNDWEDRYRENMNRYPNQVYYRPVDQYNNQNNFVHDCVNITI
KQHTVTTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCTTQYQKESQAYYDGRSSAVLFSPPVILLISFLIFLMVG*

Abbildung 13: Schematische Darstellung des Konstrukts PrP-GPI

Durch die farblichen Markierungen sind die verschiedenen Bereiche des Konstrukts hervorgehoben. In **rot** ist die N-terminale Signalsequenz, in **grau** der His₇-Tag, in **weiss** die PrP Sequenz und in **orange** die C-terminale Signalsequenz sichtbar. Die Angabe „vor“ und „nach“ Prozessierung bezieht sich auf das exprimierte Protein direkt nach der Translation mit Signalsequenzen bzw. nach der posttranslationalen Modifikation ohne die Signalsequenzen (nicht berücksichtigt sind Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen)

AS: Aminosäuren; pI: Isoelektrischer Punkt

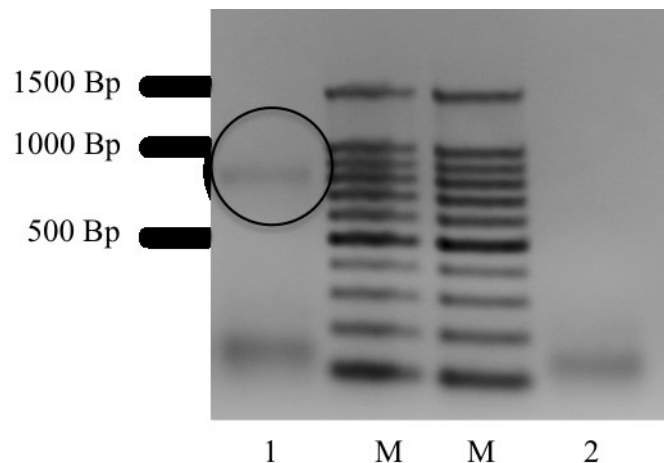


Abbildung 14: 1,5 %iges Agarosegel nach erfolgter PCR.

Als Größenstandard wurde der 100 Bp Marker „PerfectSize 100 bp XL Ladder“ von 5Prime verwendet (M). In Spur 1 ist das PCR Produkt aufgetragen, in Spur 2 befindet sich die Wasserkontrolle.

Abbildung 14 zeigt auf der Höhe der 800 Bp Markerbande in der Spur 1 eine Bande auf der erwarteten Höhe von ~809 Bp. Die Kontrollprobe, mit Aq. dest. als *template* in Spur 2, zeigt keine Produktbande.

Die resultierenden Banden mehrerer PCR-Ansätze wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des GeneJet Gele Extraction Kits präpariert.

Das Insert wurde nun einer restriktionsendonukleatischen Behandlung mit je 1 μ l der Restriktionsendonukleasen *ApaI* und *EcoRI* für 1 h bei 37 °C unterzogen. Nach dem Restriktionverdau wurde der Reaktionsansatz mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits aufgereinigt. Nach der Konzentrationsbestimmung wurde das gereinigte Insert mit dem zuvor ebenfalls *EcoRI/ApaI* verdauten und dephosphorylierten Expressionsvektor pPICzA ligiert. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor betrug hierbei 4:1. Die Ligationsreaktion wurde über Nacht bei 25 °C durchgeführt und nachfolgend durch eine zehnminütige Inkubation bei 65 °C gestoppt. 5 μ l des Ligationsansatzes wurden für die Transformation von *E. coli* BL21(DE3)pLysS Zellen verwendet. Je 50 μ l und 200 μ l des Transformationsansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit 25 μ g/ml Zeocin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 5 Kolonien wurden anschließend über Nacht bei 37 °C, 200 rpm in 5 ml LB-Medium (mit 25 μ g/ml Zeocin) inkubiert und die Plasmide mit Hilfe des GeneJET Plasmid Miniprep Kits isoliert. Nach einem Testverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *ApaI* (Abbildung 15) wurden die Plasmide, die das Insert enthielten, zum Sequenzieren verschickt. Abbildung 15 zeigt die erwartete ~801 Bp große Insert Bande in Spur 2, sowie das resultierende 3,3 kB große pPICzA Plasmid.

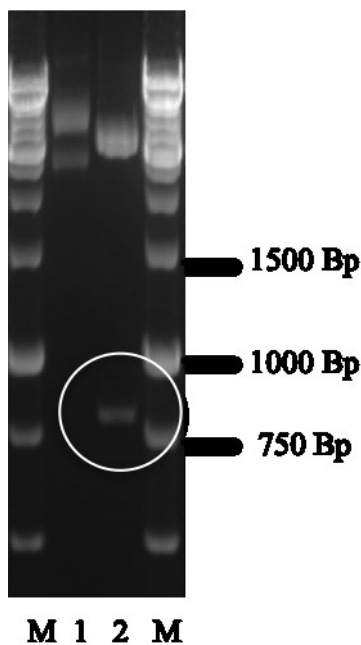


Abbildung 15: Restriktionsverdau des Expressionsvektors pPICzA-PrP-GPI.

Mit M ist der 1 kB DNA Marker (Fermentas) gekennzeichnet;

In Spur 1 ist der restringierte Leervektor pPICzA,

In Spur 2 das restringierte Plasmid pPICzA-PrP-GPI aufgetragen.

4.1.2 Umklonierung der synthetisch hergestellten Konstrukte GFP-GPI/PrP-GPI-V

Die beiden Konstrukte GFP-GPI, sowie PrP-GPI-V wurden durch Invitrogen life technologies synthetisiert. GFP-GPI wurde dabei im Vektor p-MA-T (Ampicillin Resistenz), PrP-GPI-V im Vektor pMK-RQ (Kanamycin Resistenz) synthetisiert.

PrP-GPI-V



30.252 kDa / 273 AS vor Prozessierung

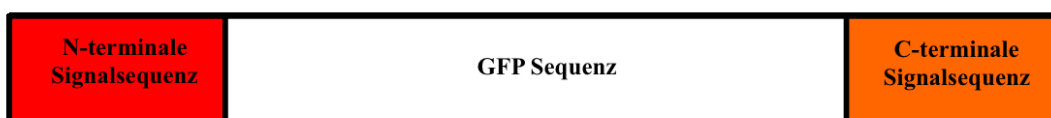
25.910 kDa / 234 AS / pI 9.58 nach Prozessierung

MANLSYWLLALFVAMWTDVGLCHHHHHHHHHSSGHIEGRHKRKP KGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQ
GGGTWQPHGGGWQPHGGGWQPHGGGWQPHGGGWQGGGTHNQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAG
AVVGGLGGYMLGSAMSRPMMHFGNDWEDRYRENMNRYPNQVYRVPDQYNNQNNFVHDCVNITIKQHTV
TTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCTTQYQKESQAYYDGRSSAVLFSSPPVILLISFLIFLMVG

Abbildung 16: Schematische Darstellung des Konstrukts PrP-GPI-V

Durch die farblichen Markierungen sind die verschiedenen Bereiche des Konstrukts hervorgehoben. In rot ist die N-terminale Signalsequenz, in grau der His₁₀-Tag, in hellgrau die Faktor X Schnittstelle, in weiss die PrP Sequenz und in orange die C-terminale Signalsequenz sichtbar. Die Angabe „vor“ und „nach“ Prozessierung bezieht sich auf das exprimierte Protein direkt nach der Translation mit Signalsequenzen bzw. nach der posttranslationalen Modifikation ohne die Signalsequenzen (nicht berücksichtigt sind Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen)
AS: Aminosäuren; pI: Isolektrischer Punkt

GFP-GPI



31974 kDa / 285 AS vor Prozessierung

27028 kDa / 240 AS / PI 5.58 nach Prozessierung

MANLSYWLLALFVAMWTDVGLCMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTT
GKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEKFDLTVNRIE
LKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDN
HYLSTQSAISKDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYKSSAVLFSSPPVILLISFLIFLMVG

Abbildung 17: Schematische Darstellung des Konstrukts GFP-GPI

Durch die farblichen Markierungen sind die verschiedenen Bereiche des Konstrukts hervorgehoben. In rot ist die N-terminale Signalsequenz, in weiß die GFP Sequenz und in orange die C-terminale Signalsequenz sichtbar. Die Angabe „vor“ und „nach“ Prozessierung bezieht sich auf das exprimierte Protein direkt nach der Translation mit Signalsequenzen bzw. nach der posttranslationalen Modifikation ohne die Signalsequenzen (nicht berücksichtigt sind Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen). In blau ist ein zusätzlich eingefügtes Serin dargestellt (Bestandteil der PrP Sequenz) um die Prozessierung der C-terminalen Schnittstelle sicherzustellen.
AS: Aminosäuren; pI: Isolektrischer Punkt

Da beide Konstrukte über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* sowie *ApaI* verfügen, konnten sie wie das Konstrukt PrP-GPI in den Expressionsvektor umkloniert werden. Dazu wurden jeweils 2 µg Plasmid-DNA in einem 20 µl Restriktionsansatz mit je 1 µl der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *ApaI* eingesetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden auf einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt und die entsprechenden Banden (870 Bp für das Konstrukt GFP-GPI; 834 Bp für das Konstrukt PrP-GPI-V) aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des GeneJet Gele Extraction Kits gereinigt. Wie in Abschnitt 4.1.1 für das Konstrukt PrP-GPI beschrieben wurden die gereinigten Inserts nach der Konzentrationbestimmung in die Ligationsreaktion eingesetzt mit dem zuvor ebenfalls *EcoRI/ApaI* verdauten und dephosphorylierten Expressionsvektor pPICzA. Nach erfolgreicher Transformation in *E. coli* wurden die Plasmide aus fünf Übernachtskulturen präpariert. Nach einem Testverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *ApaI* (Abb. 18) wurden die Plasmide, welche das Insert trugen, zum Sequenzieren verschickt. Abbildung 18 zeigt die erwartete ~834 Bp große Insert Bande in Spur 1 für PrP-GPI-V, sowie das resultierende 3,3 kB große pPICzA Plasmid, sowie die ~870 Bp große Insert Bande in Spur 4 für GFP-GPI.

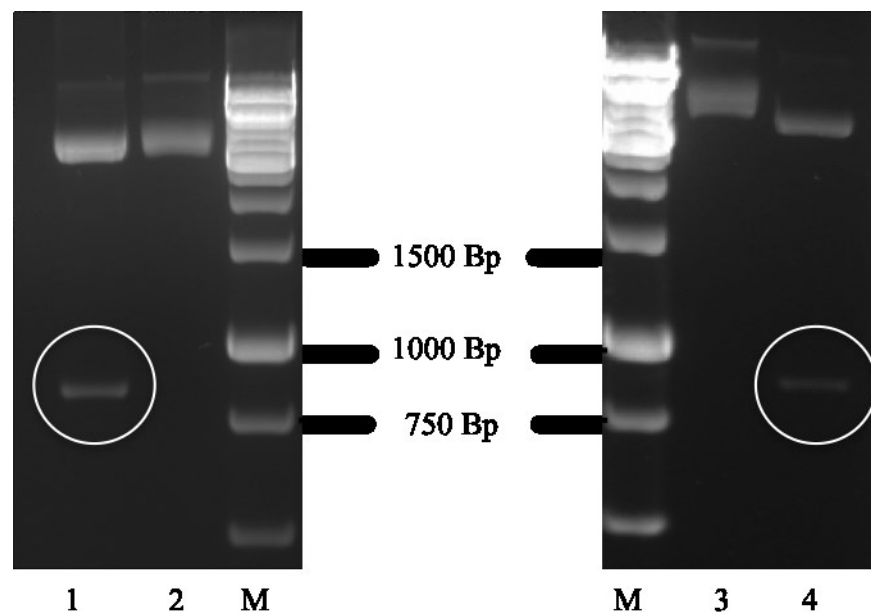


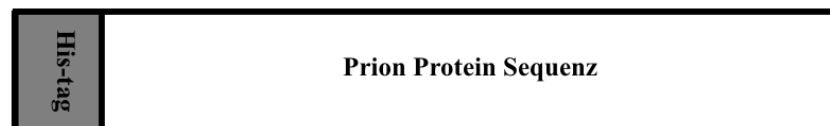
Abbildung 18: Restriktionsverdau der Expressionsvektoren pPICzA-PrP-GPI-V und pPICzA-GFP-GPI mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* / *ApaI*.

Mit M ist der 1 kB DNA Marker (Fermentas) gekennzeichnet; In Spur 1 ist das restringierte Plasmid pPICzA-PrP-GPI-V, in Spur 2 der restringierte Leervektor pPICzA, in Spur 3 nochmals der restringierte Leervektor pPICzA und in Spur 4 das restringierte Plasmid pPICzA-GFP-GPI aufgetragen.

4.1.3 PrPASS/GFPASS

Zur Klonierung der beiden Konstrukte Pr Δ SS sowie GFP Δ SS (Abbildung 19/Abbildung 20) die beide über keine Signalsequenzen verfügen, wurden die beiden Plasmide pPICzA-PrP-GPI (4.1.1) und pPICzA-GFP-GPI (4.1.2) als Template verwendet.

PrPASS



24121 kDa / 218 AS / pI 9.58 nach Prozessierung

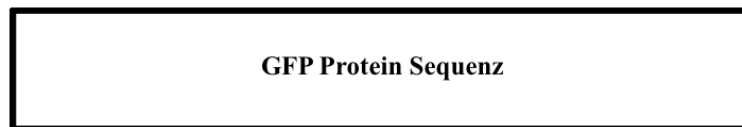
MHHHHHHHGGKKRPKPGGWNTGGSRYPGQSPGGNRYPPQGGGTWQPHGGGWGQPHGGGWGQP
HGGGWGQPHGGGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAMSRP
MMHFGNDWEDRYRENMNRYPNQVYRVPDQYNNQNNFVHDCVNITIKQHTVTTTTKGENFTETD
IKIMERVVEQMaCTTQYQKESQAYYDGRRS

Abbildung 19: Schematische Darstellung des Konstrukts PrPASS

Durch die farblichen Markierungen sind die verschiedenen Bereiche des Konstrukts hervorgehoben. In grau ist der His₇-Tag und in weiss die PrP Sequenz sichtbar.

AS: Aminosäuren; pI: Isoelektrischer Punkt

GFPASS



26941 kDa / 239 AS / pI 5.58 nach Prozessierung

MVSKGEELFTGVVPIVELDGDVNGHKFSVSGEGEDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLYG
VQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDG
NILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHYL
STQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKS

Abbildung 20: Schematische Darstellung des Konstrukts GFPASS

In weiss ist die GFP Sequenz dargestellt.

AS: Aminosäuren; pI: Isoelektrischer Punkt

Die PCR Reaktion wurde mit den Primerpaaren Pr Δ SS und GFP Δ SS wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben durchgeführt. Die PCR Produkte wurden auf einem 1,5 %igen Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 21). Die zu erwartenden Bandengrößen sind für das Konstrukt GFP Δ SS ~740 Bp und für Pr Δ SS ~677 Bp. Die Abbildung zeigt in Spur 1 und 4 jeweils die erwarteten PCR-Produkt Banden für Pr Δ SS und GFP Δ SS. In Spur 2 und 3 sind jeweils die Negativkontrollen (Aq. dest.) aufgetragen.

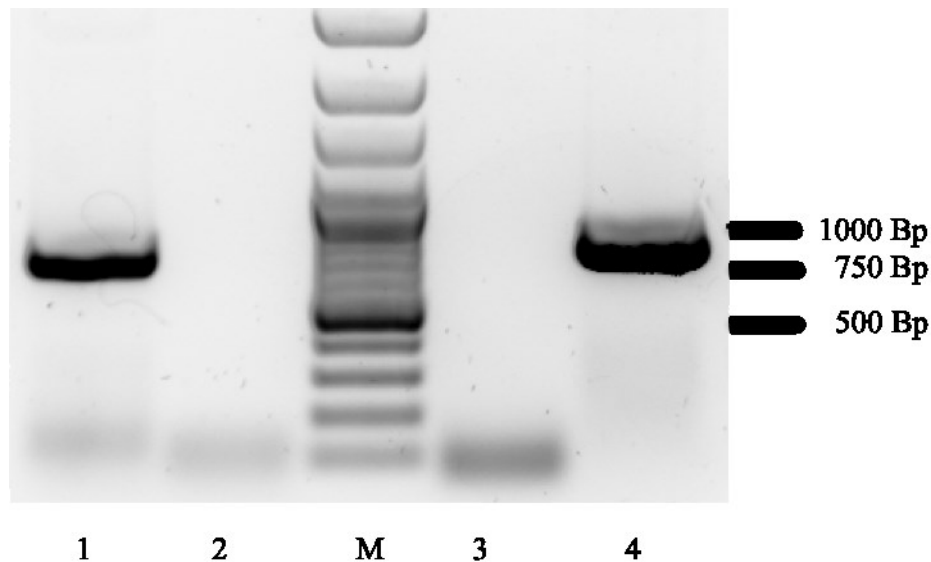


Abbildung 21: 1,5 %iges Agarosegel nach erfolgter PCR.

Als Größenstandard wurde der GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder von Fermentas verwendet.

Spur 1 und 4 zeigen die PCR-Produkte für PrP Δ SS und GFP Δ SS. In Spur 2 und 3 sind jeweils die Negativkontrollen aufgetragen.

Die aus der PCR resultierenden Banden in Spur 1 und Spur 4 wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des GeneJet Gele Extraction Kits gereinigt. In den Spuren der beiden Negativkontrollen, Spur 2 und Spur 3, ist kein Produkt sichtbar.

Die restriktionsendonukleatische Behandlung, Ligation mit dem Expressionsvektor pPICzA, Transformation in *E. coli*, sowie die Kultivierung und Plasmidpräparation wurde wie unter 4.1.2 für GFP-GPI/PrP-GPI-V beschrieben durchgeführt. Nach einem Testverdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *ApaI* (Abbildung 22) wurden die positiv für der Insert getesteten Plasmide zum Sequenzieren verschickt. Abbildung 22 zeigt die erwarteten ~732 Bp (PrP Δ SS) und ~669 Bp (GFP Δ SS) großen Insert Banden in Spur 2 und 4, sowie das resultierende 3,3 kB große pPICzA Plasmid.

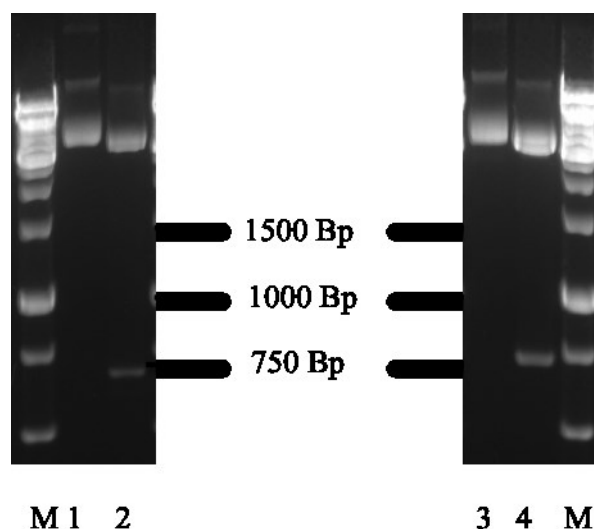


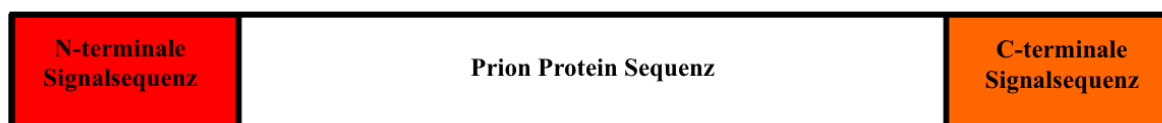
Abbildung 22: Restriktionsverdau der Expressionsvektoren pPICzA-PrPASS und pPICzA-GFPASS mit *EcoR I* / *Apa I*.

Mit M ist der 1 kB DNA Marker (Fermentas) gekennzeichnet; In Spur 1 ist der verdaute Leervektor pPICzA, in Spur 2 das Plasmid pPICzA-PrPASS, in Spur 3 nochmals der verdaute Leervektor pPICzA und in Spur 4 das verdaute Plasmid pPICzA-GFPASS aufgetragen.

4.1.4 SHaPrP

Das Konstrukt SHaPrP (Abbildung 23) wurde durch die Firma MWG eurofins operon synthetisch hergestellt und direkt in den Expressionsvektor pPICzA kloniert, so dass dieses Konstrukt direkt verwendet werden konnte. Das Plasmid pPICzA-SHaPrP wurde bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Sha-PrP



27.910 kDa / 254 AS vor Prozessierung

23.577 kDa / 215 AS / pI 9.58 nach Prozessierung

**MANLSYWLLALFVAMWTDVGLCKKRPKPGGWNTGGSRYPGQGSPGGNRYPPQGGGTWGQPHGGG
WGQPHGGGWGQPHGGGWGQPHGGGWGQGGGTHNQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGG
GGYMLGSAMSRPMMHFGNDWEDRYRENMNRYPNQVYYRVPVDQYNNQNNFVHDCVNITIKQHTV
TTTTKGENFTETDIKIMERVVEQMCTTQYQKESQAYYDGRSSAVLFSSPPVILLISFLIFLMVG**

Abbildung 23: Schematische Darstellung des Konstrukts SHaPrP

Durch die farblichen Markierungen sind die verschiedenen Bereiche des Konstrukts hervorgehoben. In **rot** ist die N-terminale Signalsequenz, in **weiss** die PrP Sequenz und in **orange** die C-terminale Signalsequenz sichtbar. Die Angabe „vor“ und „nach“ Prozessierung bezieht sich auf das exprimierte Protein direkt nach der Translation mit Signalsequenzen bzw. nach der posttranslationalen Modifikation ohne die Signalsequenzen (nicht berücksichtigt sind Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen); AS: Aminosäuren; pI: Isoelektrischer Punkt

4.2 Expression von PrP in *P. pastoris*

4.2.1 PrP-GPI

Die Klonierung des Konstrukts PrP-GPI in den *P. pastoris* Expressionsvektor pPICzA und die darauffolgende Transformation des linearisierten Plasmids ermöglichten die Expression von PrP mit Hilfe des Methanol-induzierbaren Alkoholoxidase Promotors (AOX). Die Expression erfolgte in mehreren Schritten, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. In Abbildung 24 ist die Expressionskontrolle des Konstrukts PrP-GPI mittels eines Western Blots zu sehen. Des Weiteren wurden zur zellulären Lokalisation des Prion Proteins Proben der präparierten Membranfraktion, des löslichen Überstands und des Kulturmediums genommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abbildung 24). Dabei wurde die Membranfraktion mit Hilfe von differenzieller Zentrifugation vom löslichem Überstand abgetrennt.

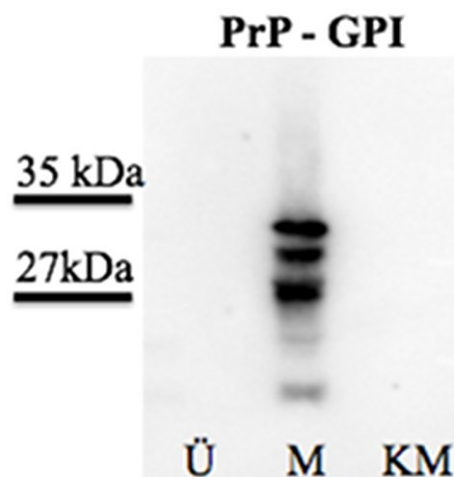


Abbildung 24: Expressionskontrolle und Überprüfung der zellulären Lokalisation durch Western Blot des Konstrukts PrP-GPI.

Ü: löslicher Überstand, M: unlösliche Membranfraktion, KM: Kulturmedium nach der Expressionsphase.

Deutlich erkennbar sind drei immunoreaktive Hauptbanden in der Spur der unlöslichen Membranfraktion zwischen der 27 kDa und 35 kDa Bande des Proteinstandards. 15 % PAA-Gel, Erstantikörper SAF 32, 15 µl aufgetragene Probe je Spur.

Weder im Kulturmedium (KM) noch im löslichen Fraktion (Ü) nach dem 100.000 xg Zentrifugationsschritt ist ein immunreaktives Signal zu erkennen. Dagegen zeigt die unlösliche Membran-Fraktion (M) drei deutliche Banden in der Größenordnung zwischen 27 kDa und 34 kDa, in der modifiziertes PrP auch erwartet werden würde. Ebenso ist eine schwächere Bande unterhalb der 27 kDa Bande sichtbar, welche evtl. auf Abbruchfragmente hindeute könnten. Anhand der Western Blot Analyse konnte die Expression von PrP-GPI in *P. pastoris* verifiziert werden. Die Lokalisation in der Membranfraktion, sowie das für

posttranslational modifiziertes PrP typische Dreibandmuster deuten auf eine korrekte posttranslationale Prozessierung des PrP hin.

4.2.2 PrP-GPI und PrP Δ SS

Zur Kontrolle der korrekten Prozessierung von PrP-GPI wurde das Prion Protein Konstrukt ohne C- und N-terminale Signalsequenzen (PrP Δ SS) exprimiert, aufgeschlossen und im Vergleich zu PrP-GPI mittels Western Blot analysiert. Abbildung 25 zeigt in der Spur der Membranfraktion für PrP-GPI drei immunreaktive Banden im Molekulargewichtsbereich von 27 kDa bis 35 kDa. PrP Δ SS hingegen zeigt nur eine immunreaktive Bande bei ~27 kDa. Dies deutet auf eine korrekte posttranslationale Prozessierung von PrP-GPI sowie PrP Δ SS hin, da in letzterem Konstrukt keine Signalsequenzen vorhanden sind und somit auch keine posttranslationale Modifikation stattfinden sollte. Die Signale für PrP-GPI und PrP Δ SS sind beide in der unlöslichen Membranfraktion lokalisiert.

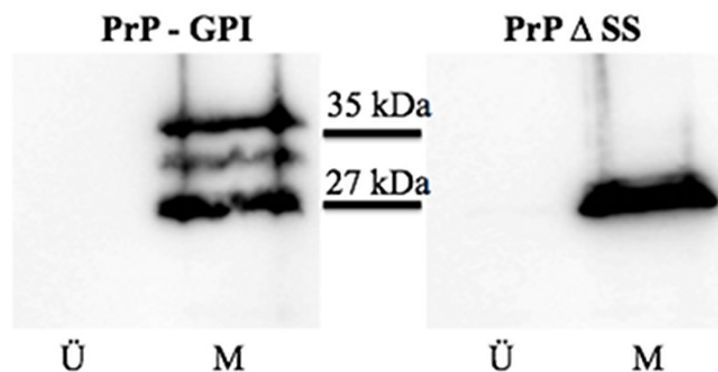


Abbildung 25: Expressionskontrolle und Vergleich der zellulären Lokalisation von PrP Δ SS und PrP-GPI durch Western Blot.

Ü: löslicher Überstand, M: unlösliche Membranfraktion. PrP Δ SS zeigt im Vergleich zu PrP-GPI eine deutliche immunreaktive Bande auf der Höhe von knapp 27 kDa in der Membranfraktion.

15 % PAA-Gel, Erstantikörper SAF 32, 15 μ l aufgetragene Probe je Spur.

4.2.3 Vergleich aller PrP Konstrukte

Um einen Vergleich aller exprimierten PrP Konstrukte zu ermöglichen, die posttranslationale Prozessierung zu analysieren, sowie durch Größenvergleich der verschiedenen Konstrukte evtl. Rückschlüsse auf die Existenz des GPI Ankers zu erhalten, wurden alle Konstrukte mittels SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot analysiert

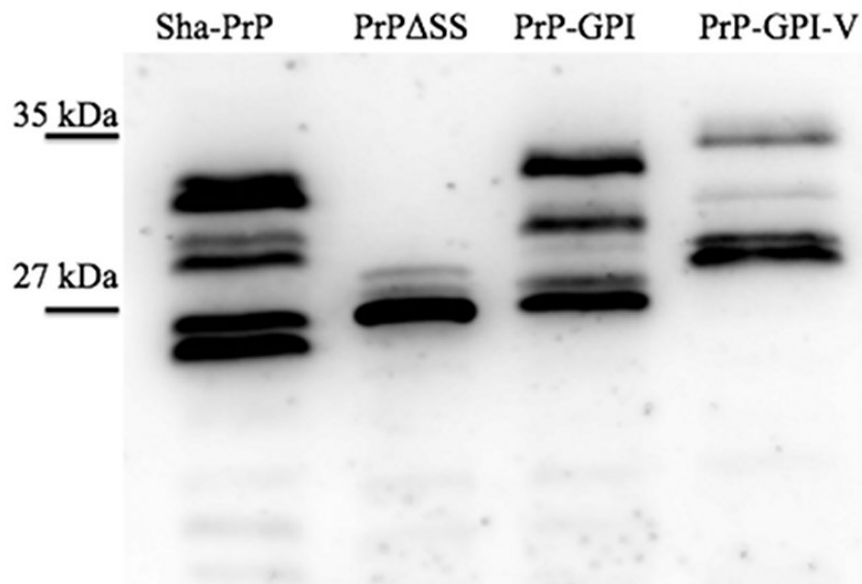


Abbildung 26: Expressionskontrolle und Vergleich aller PrP Konstrukte mittels Western Blot

Proben von jedem PrP Konstrukt wurden nach dem 5.000 xg Zentrifugationsschritt unmittelbar im Anschluss an den Zellaufschluss genommen. 15 % PAA-Gel, Erstantikörper SAF 32, 15 μ l aufgetragene Probe je Spur.

Abbildung 26 zeigt das unterschiedliche Laufmuster der verschiedenen Konstrukte in der SDS-PAGE (bezogen auf die unterste, vermutlich unmodifizierte Bande). Deutlich zu sehen ist, dass PrPΔSS im erwarteten Molekulargewichtsbereich von \sim 27 kDa zu detektieren ist und im Vergleich zu allen anderen Konstrukten keine zusätzlichen, zu höheren Molekulargewichten verschobenen, Banden aufweist. Weiterhin läuft PrPΔSS geringfügig unterhalb der untersten Bande von PrP-GPI, welches wiederum ein deutlich niedrigeres Laufverhalten zeigt als PrP-GPI-V. Der Laufunterschied von PrP-GPI und PrP-GPI-V ist durch den verlängerten His₁₀-Tag und die FaktorX Schnittstelle ebenfalls erwartet. Auffällig ist dass alle Konstrukte welche über Signalsequenzen verfügen zumindest im Bereich der untersten, vermutlich unglykosylierten Bande, Doppelbanden aufweisen (SHa-PrP, PrP-GPI, PrP-GPI-V). Im Fall von SHaPrP weisen alle drei Isoformen Doppelbanden auf. Da PrPΔSS und PrP-GPI beide, mit Ausnahme der Signalsequenzen bei PrP-GPI, über dieselbe Aminosäuresequenz verfügen, gibt der geringfügige Laufunterschied im Bereich der unteren 27 kDa Bande einen Hinweis auf einen

angefügten GPI-Anker. Weiterhin ist in Abbildung 26 zu sehen dass das Intensitätsverhältnis der vermuteten Glykosylierungen nicht bei jedem Konstrukt identisch ist.

4.3 Glykosylierungsanalyse von PrP

Um zu überprüfen und zu Bestätigen dass das beobachtete Dreibandemuster, mit Ausnahme von PrP Δ SS, in Abbildung 24–Abbildung 26 auf die Anwesenheit von unterschiedlich glykosylierten Isoformen von PrP zurückzuführen ist, wurde das Konstrukt PrP-GPI einem PNGaseF Verdau unterzogen. Peptide N-Glykosidase F (PNGaseF) schneidet spezifisch Oligosaccharide, welche an Asparagin gebunden sind. Ohne den Zusatz von PNGaseF ist nach 16 h Inkubation nach wie vor das PrP-GPI spezifische Dreibandemuster erkennbar (Abbildung 27). Nach 1 h Inkubation mit PNGaseF ist eine deutliche Abnahme der obersten, voraussichtlich doppelt glykosylierten Bande erkennbar, resultierend in einer stärker intensiven untersten, vermutlich unglykosylierten Bande. Nach 16 h Inkubation mit PNGaseF sind die beiden immunoreaktiven oberen Banden nicht mehr sichtbar. Die Abnahme der Intensität der oberen beiden Banden und die resultierende, intensivere unterste Bande bestätigen somit ein aus 3 Isoformen bestehendes Glykosylierungsmuster des exprimierten PrP-GPI und somit auch der anderen beiden Konstrukte, SHaPrP sowie PrP-GPI-V, da diese nach der Expression ein identisches Dreibandemuster aufweisen.

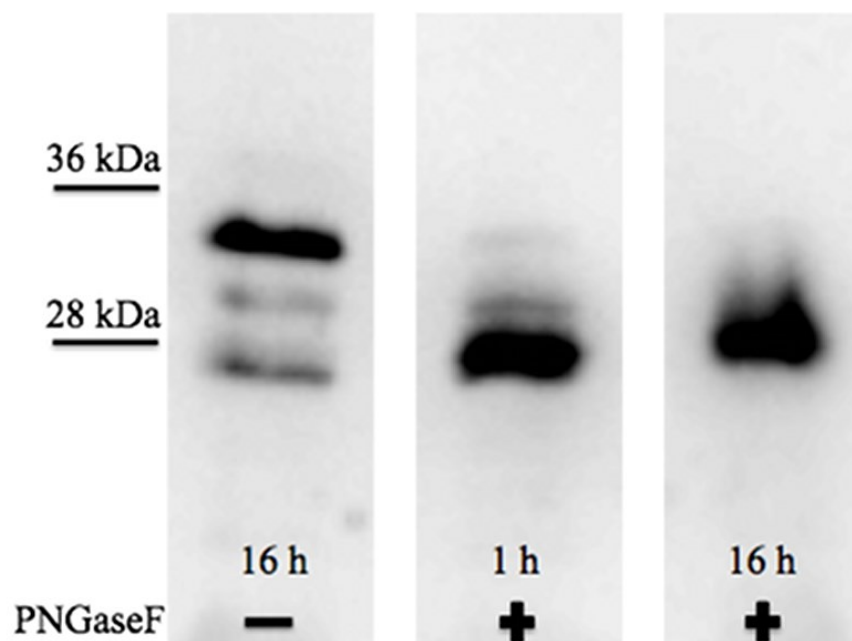


Abbildung 27: Glykosylierungsanalyse von PrP-GPI exprimiert in *P. pastoris*.

Zelllysate nach dem 5.000 xg Zentrifugationsschritt wurden ohne PNGaseF oder 1 h respektive 16 h mit PNGaseF inkubiert, um Asparagin-verlinkte Glykosylierungen abzutrennen. 15 % PAA-Gel, Erstantikörper SAF 32, 30 µl aufgetragene Probe je Spur.

4.4 Proteinase K Verdau von PrP

Nach der erfolgreichen Expression von PrP, welches drei verschiedene Isoformen zeigt und glykosyliert exprimiert wird, wurde nun ein Proteinase K Verdau durchgeführt. Durch den Proteinase K Verdau sollte verifiziert werden, dass es sich bei dem exprimierten PrP um die nicht infektiöse „zelluläre“ Isoform (PrP^C) des Prion Proteins handelt und nicht Charakteristika der infektiösen „scrapie“ Isoform PrP^{Sc} aufweist. Eine besondere Eigenschaft von PrP^{Sc} ist die partielle Resistenz gegenüber dem Verdau mit Proteinase K. Dabei wird nur der N-terminale Bereich des PrP^{Sc} (Aminosäure 23–89) abgebaut, der restliche Teil des Proteins bleibt hingegen intakt und wird in der Literatur PrP27-30 genannt (Prusiner *et al.*, 1983). PrP^C hingegen weist keine Resistenz gegenüber Proteinase K auf und wird vollständig degradiert.

Für den Proteinase K Verdau wurde anstatt des standardmäßig eingesetztem SAF32 Prion-Antikörper der 6H4 Prion-Antikörper verwendet, da das Epitop des SAF32-Antikörpers in dem Bereich liegt, welcher durch Proteinase K degradiert wird und somit auch nicht die resistente Form PrP27-30 detektieren könnte. Der Antikörper 6H4 hat sein Epitop im Bereich der Aminosäuren 144–152 und kann somit auch die verkürzte Form von PrP detektieren.

Nach 1 h der Inkubation bei 37 °C mit Proteinase K wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS-Auftragspuffer und zehnminütiges Erhitzen auf 99 °C gestoppt. Unmittelbar im Anschluss wurde das Ergebnis mit einer SDS-PAGE und Western Blot überprüft (Abbildung 28).

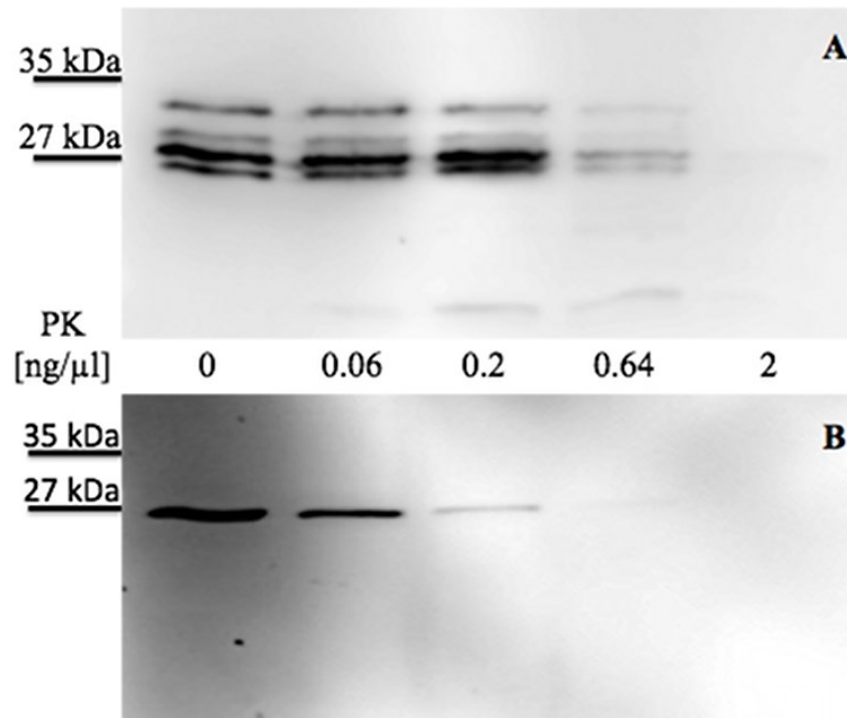


Abbildung 28: Proteinasen K-Analyse der exprimierten Konstrukte PrP-GPI und PrPΔSS

In Teil A der Abbildung wurden jeweils gleiche Konzentrationen PrP-GPI mit fünf verschiedenen Proteinasen K-Konzentrationen für 1h bei 37 °C inkubiert. Teil B zeigt ebenfalls gleiche Konzentrationen PrPΔSS, die ebenfalls mit verschiedenen Proteinasen K-Konzentrationen inkubiert wurden.

15 % PAA-Gel, Erstantikörper 6H4, 20 μl aufgetragene Probe je Spur.

Abbildung 28 zeigt deutlich die Abnahme der immunoreaktiven Banden beider Konstrukte mit zunehmender Konzentration der Proteinasen K. Ab einer Konzentration von 2 ng/μl Proteinasen K konnte unter diesen Bedingungen kein PrP mehr nachgewiesen werden. Ebenso wurde keine verkürzte, resistente Form (PrP²⁷⁻³⁰) detektiert. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich um nicht PK-resistentes PrP^C handelt und keine PrP^{Sc}-spezifischen Charakteristika aufweist.

Um die oben genannten Rückschlüsse nochmals zu bestätigen, wurde ein weiterer Proteinasen K Verdau durchgeführt, in dem neben PrP-GPI und PrPΔSS ebenfalls eine Probe von mit Scrapie infiziertem Hirnhomogenat mit Proteinasen K inkubiert wurde. Hierbei wurde nur eine Proteinasen K Konzentration gewählt (50 ng/μl) welche typischerweise zur Diskriminierung zwischen PrP^C und PrP^{Sc} eingesetzt wird (Ma *et al.*, 1999; Prusiner, 1998). Abbildung 29 zeigt deutlich, dass beide Konstrukte PrP-GPI als auch PrPΔSS nach Inkubation mit Proteinasen K keine immunoreaktive Banden zeigen, wohingegen die Positivkontrolle mit PrP^{Sc} eine deutliche, im Vergleich zum Ausgangsmaterial zu niedrigerem Molekulargewicht hin verschobene Bande zeigt (PrP²⁷⁻³⁰).

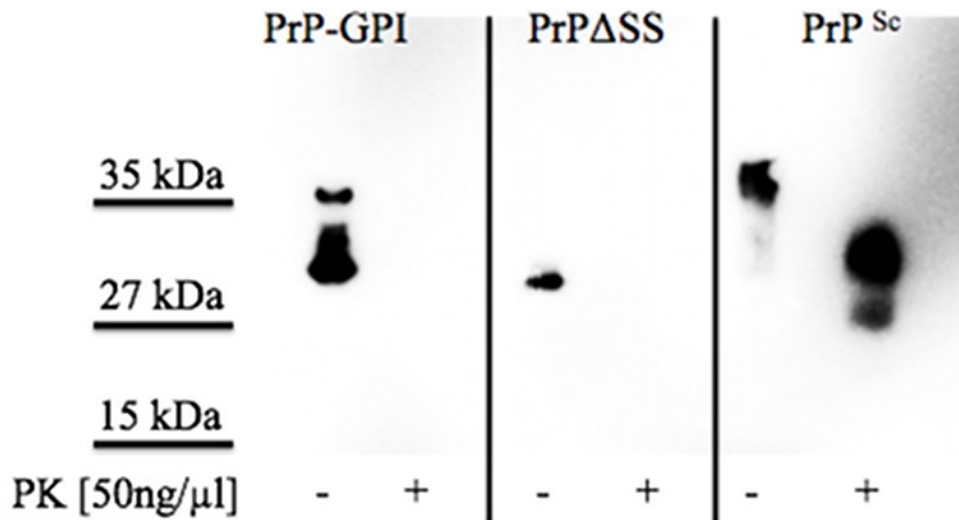


Abbildung 29: Proteinase K-Analyse der exprimierten Konstrukte PrP-GPI und PrP Δ SS im Vergleich zu einer Probe Scrapie-infizierten-Hirnhomogenates.

Im linken Bereich der Abbildung befindet sich das Konstrukt PrP-GPI, im mittleren Bereich das Konstrukt PrP Δ SS und rechts die Positivkontrolle, PrP^{Sc}. Als Proteinase K-Konzentration wurde ausschließlich 50 ng/ μ l PK eingesetzt. Da diese Analyse innerhalb des S3 Sicherheitslabores durchgeführt wurde, musste ein Biorad *ready to use Gel* benutzt werden (Mini-PROTEAN TGX Gel 12 %). Das Gel wurde bei 120 V 1 h gefahren. Dies erklärt die geringfügig unterschiedlichen Laufhöhen der Proteine im Vergleich zu den selbstgegossenen 15 % PAA-Gelen.

4.5 Expression von GFP in *P. pastoris*

Nach der Überprüfung der erfolgreichen Expression der PrP-Konstrukte, dem Verifizieren der Glykosylierungen und der PK-Sensitivität sollte nun überprüft werden, ob PrP-GPI durch die posttranslationale Modifikation mittels eines GPI-Ankers in der Membranfraktion lokalisiert ist. Dies wurde durch den indirekten Nachweis des GPI-Ankers an den Konstrukten PrP-GPI und dem Modellprotein GFP-GPI im Vergleich zu PrP Δ SS sowie GFP Δ SS (ohne Signalsequenzen) durch differenzielle Zentrifugation und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Um die richtige Prozessierung der SHa-PrP spezifischen Signalsequenzen zu überprüfen und einen Hinweis für die Existenz des GPI-Ankers zu bekommen wurde das lösliche Protein GFP mit und ohne Signalsequenzen in *P. pastoris* exprimiert. GFP ist ein 27 kDa großes Modellprotein welches nicht aggregiert und sich somit für die Überprüfung der korrekten Prozessierung der Signalsequenzen anbietet, da GFP allein im löslichen Überstand zu finden sein sollte (GFP Δ SS), GFP mit PrP-Signalsequenzen (GFP-GPI) jedoch über einen GPI-Anker in der Membranfraktion lokalisiert sein sollte.

GFP-Konstrukte wurden wie die PrP-Konstrukte in *P. pastoris* exprimiert.

Um zu zelluläre Lokalisation beider GFP-Konstrukte zu überprüfen, wurden nach der Expression Zellysate einer differentiellen Zentrifugation unterzogen um jeweils die Membranfraktion (M) von dem löslichen Überstand (Ü) abzutrennen. Das Ergebnis der Analyse ist im Western Blot in Abbildung 30 dargestellt.

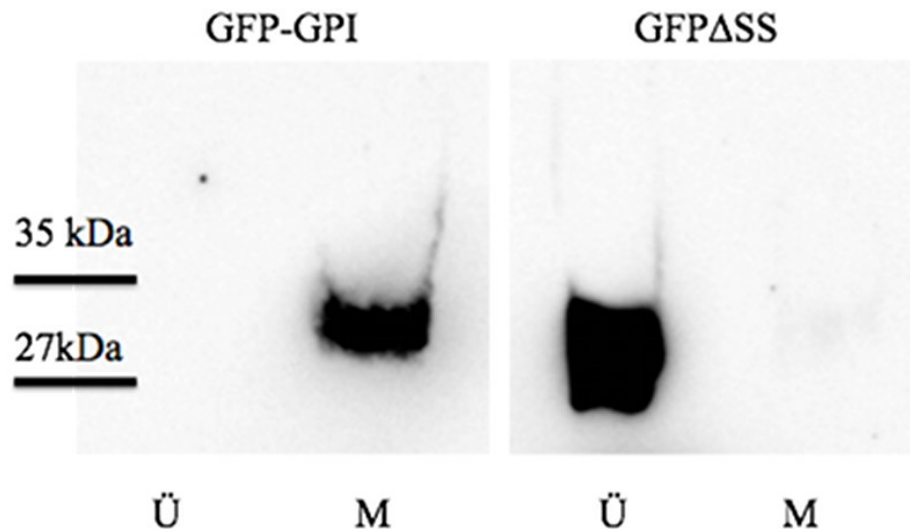


Abbildung 30: Expressionskontrolle und Vergleich der zellulären Lokalisation von GFP-GPI und GFP Δ SS. Ü: löslicher Überstand nach 100.000 xg Zentrifugation, M: unlösliche Membranfraktion nach 100.000 xg Zentrifugation. Links in der Abbildung ist das Konstrukt GFP-GPI, rechts das Konstrukt GFP Δ SS zu sehen. 15 % SDS-Page, Erstantikörper anti-GFP, 15 μ l Probe in jeder Spur aufgetragen.

Wie in Abbildung 30 gezeigt, war die Expression beider GFP-Konstrukte in *P. pastoris* erfolgreich. Nach differentieller Zentrifugation zur Trennung von löslichem Zellüberstand und unlöslichem Membranpellet zeigte GFP-GPI ein deutliches immunreaktives Signal in der Membranfraktion wohingegen GFP Δ SS nur ein Signal in der löslichen Fraktion aufwies. Weiterhin kann ein Unterschied im Laufverhalten beobachtet werden. Die GFP-GPI-Bande ist zu einem geringfügig höheren Molekulargewicht verschoben, was als ein Anzeichen für den zusätzlich am Protein verankerten GPI Anker zu werten ist.

4.6 Fluoreszenzmikroskopie zur Analyse der zellulären Lokalisation

Um weitere Informationen bezüglich der zellulären Lokalisation der exprimierten Proteine zu erhalten und die Existenz des GPI Ankers nachzuweisen, wurde die Methode der (Immun-) Fluoreszenzmikroskopie angewendet. Dazu wurden nach der Proteinexpression Zellproben

genommen und mit Paraformaldehyd (finale Konzentration 4 %) fixiert. Mittels Zymolyase100T wurde die Zellwand verdaut, so dass Spheroblasten entstanden, die lediglich durch ihre Plasmamembran vom umgebenden Milieu abgegrenzt sind. Im Falle der GFP Proben, welche über eine intrinsische Fluoreszenz verfügen, wurden die Spheroblasten direkt auf Objektträgern fixiert und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Anders als die GFP Konstrukte mussten die PrP Proben mittels Immunfluoreszenz analysiert werden.

Dazu wurden die Spheroblasten auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen fixiert und ähnlich wie beim Western Blot mit Erst- und Zweitantikörpern behandelt. Nach der Blockierung der unspezifischen Bindestellen mit 2 % Milchpulver in PBS, wurden die Proben mehrmals gewaschen und mit dem Erstantikörper (SAF32) für 1 h inkubiert. Nach dem darauffolgenden Waschschrift folgte eine einstündige Inkubation mit dem fluoreszenzmarkierten Zweit-Antikörper *goat-anti-mouse IgG H&L (Cy2)*. Nach wiederholtem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen kopfüber mit einem Tropfen ProLong Gold Antifade Reagent auf einem Objektträger fixiert und anschließend immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert.

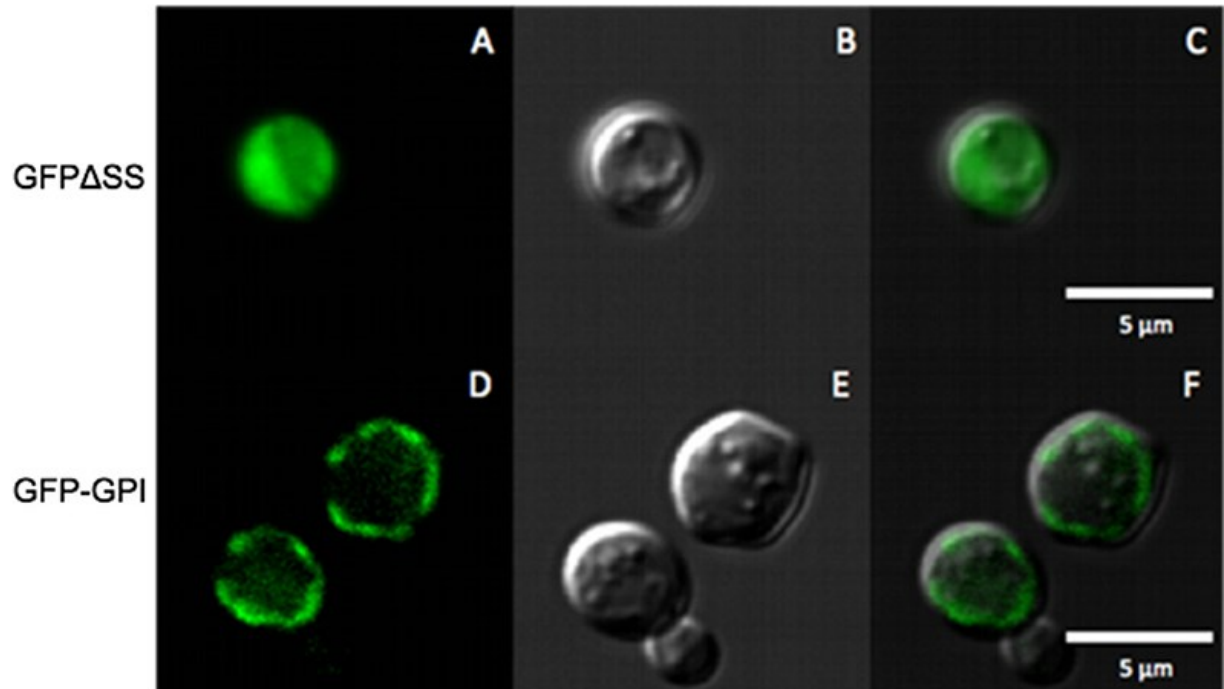


Abbildung 31: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der zellulären Lokalisation von GFPΔSS und GFP-GPI.
A: Fluoreszenzbild von GFPΔSS, B: korrespondierendes DIC (Differentialinterferenzkontrast) image, C: overlay von Fluoreszenzbild und DIC image
D: Fluoreszenzbild von GFP-GPI, E: korrespondierendes DIC (Differentialinterferenzkontrast) image, F: overlay von Fluoreszenzbild und DIC image
Scalebar = 5 μm

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte die Lokalisation der beiden GFP Konstrukte deutlich veranschaulicht werden (Abbildung 31). Während GFP Δ SS eine gleichmäßige Verteilung über die gesamte Hefezelle aufweist (Abbildung 31 A und C), ist GFP-GPI größtenteils ringförmig am äußeren Rand der Zelle lokalisiert. Bild D und F zeigt deutlich ein Fluoreszenzsignal am äußeren Zellrand, welches auf eine Lokalisation von GFP-GPI in der Zellmembran hinweist, während im Inneren der Zelle keine oder bedeutend weniger Fluoreszenz erkennbar ist. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie der PrP Konstrukte dargestellt.

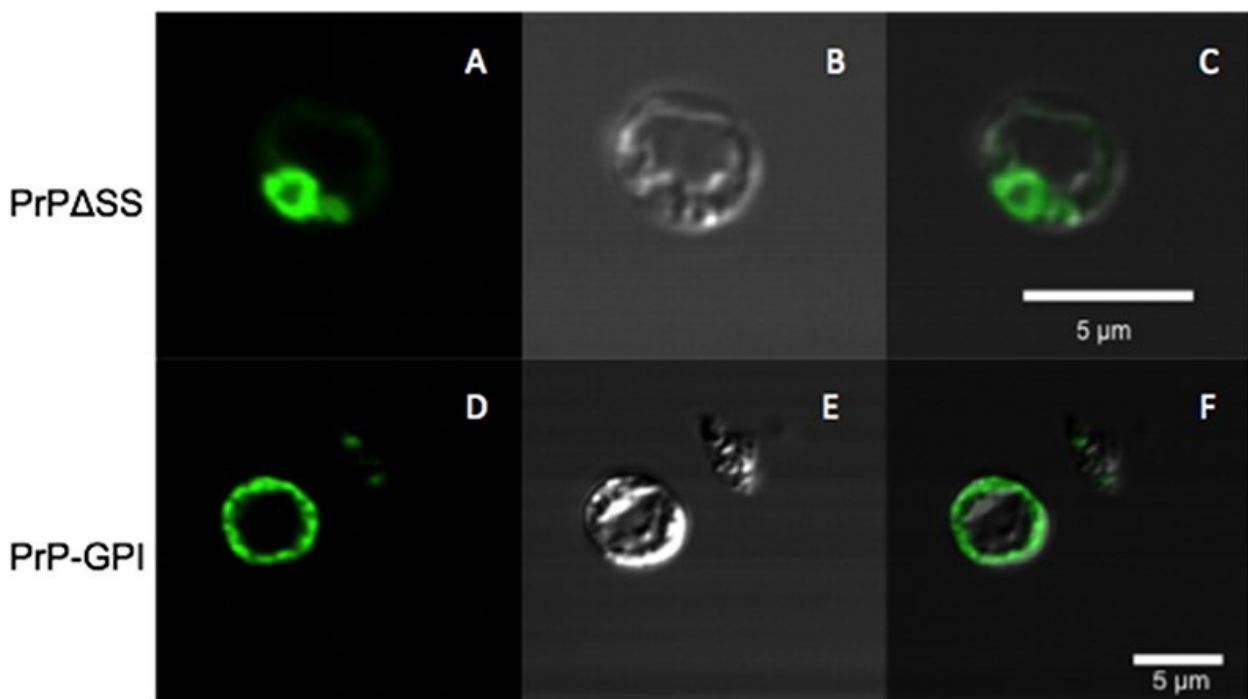


Abbildung 32: Immunfluoreszenzmikroskopische Analyse der zellulären Lokalisation von PrP Δ SS und PrP-GPI.

A: Immunfluoreszenzbild von PrP Δ SS, B: korrespondierendes DIC (Differentialinterferenzkontrast) image, C: overlay von Immunfluoreszenzbild und DIC image
 D: Immunfluoreszenzbild von GFP-GPI, E: korrespondierendes DIC (Differentialinterferenzkontrast) image, F: overlay von Immunfluoreszenzbild und DIC image
 Scalebar = 5 μ m

Ähnlich wie in Abbildung 31 D und F befindet sich PrP-GPI ringförmig um die Zelle herum angeordnet im Bereich der Zellmembran (Abbildung 32 D und F). Durch die N- und C-terminale Signalsequenzen sollten die beiden Konstrukte GFP-GPI und PrP-GPI mit einem GPI Anker modifiziert und anschließend durch intrazellulären Transport zur äußeren Zellmembran geleitet werden. Durch die ringförmige Struktur am äußeren Rand der Hefezelle wurde dies bestätigt. Somit wurden die Signalsequenzen korrekt erkannt, das Protein prozessiert und das *trafficking* erfolgreich durchgeführt.

Anders als das Konstrukt GFP Δ SS, welche eine gleichmäßige Verteilung von GFP innerhalb der Zelle aufweist (Abbildung 31 A und C) und auch nach differentieller Zentrifugation im löslichen Überstand zu finden ist (Abbildung 30) ist PrP Δ SS weder im löslichen Überstand nach differentieller Zentrifugation lokalisiert, noch weist es nach Immunfluoreszenzanalyse eine gleichmäßige Verteilung über die Hefezelle auf (Abbildung 32 A und C). PrP Δ SS zeigt ein starkes, immunreaktives Signal im Fluoreszenzbild auf, welches sich an einer, distinkten Position am äußeren Rand der Hefezelle befindet. Es ist keinerlei Fluoreszenzsignal im Zellinneren detektierbar.

4.7 Reinigung des PrP aus *P. pastoris*

4.7.1 Solubilisierungsanalyse

Die Solubilisierungsanalyse von präparierten Zellmembranen wurde durchgeführt wie unter 3.2.8.1 beschrieben. Tabelle 10 stellt die Ergebnisse der Solubilisierungsanalyse zusammen.

Tabelle 10: Schaubild der verschiedenen Kombinationen von Puffer und Detergenz zur Solubilisierung von PrP-GPI aus Zellmembranen.

1. 50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl, pH 7,5
2. 50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl, 100 mM ϵ -aminocaprinsäure; pH 7,5
3. 10 mM Tris/HCl; 100 mM KCl; 320 mM Sucrose; pH 7,5
4. 10 mM Tris/HCl; 100 mM KCl; 320 mM Sucrose; 100 mM ϵ -aminocaprinsäure; pH 7,5
5. 150 mM Tris/HCl; 320 mM Sucrose; pH 7,5
6. 150 mM Tris/HCl; 320 mM Sucrose; 100 mM ϵ -aminocaprinsäure; pH 7,5
7. 6 M GdnHCl; 50 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; 100 mM NaH₂PO₄; pH 7,5

Detergenz	Puffer						
	1	2	3	4	5	6	7
SDS	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✗
TritonX100	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓
Tween 20	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓
Zwittergent	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓
OG	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓
CHAPS	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓
NP40	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓
DOC	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓
TritonX114	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓
Ohne Detergenz	✗	✗	✗	✗	✗	✗	✓

Es war nicht möglich, unter nicht-denaturierenden Pufferbedingungen, mit einer der getesteten Detergenzien nach der Solubilisierung und anschließendem Ultrazentrifugationsschritt immunreaktive PrP-Signale im Western Blot zu detektieren. Eine Ausnahme stellt 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) dar, welches in den getesteten Puffern 1-6 PrP-GPI aus der Membran solubilisieren und in Lösung halten kann. Eine Solubilisierung von PrP mittels 1% SDS in denaturierendem GdnHCl-Puffer war nicht möglich, da es nach Zugabe von SDS zur Bildung einer zähflüssigen, nicht-pipettierbaren Lösung kam. Alternativ zu den getesteten Detergenzien war es möglich, durch die Wahl eines denaturierenden Puffers (6 M GdnHCl), PrP-GPI aus der Membran zu solubilisieren.

Beispielhaft für die Resultate der möglichen Kombinationen von verschiedener Pufferbedingungen und Detergenzien sind in Abbildung 33 und Abbildung 34 zwei Western Blots dargestellt. Abbildung 33 zeigt das Ergebnis der Solubilisierung mit Puffer 5 (150 mM Tris/HCl; 320 mM Sucrose, pH 7,5) und Abbildung 34 zeigt das Ergebnis nach Solubilisierung mit dem denaturierenden Puffer 7 (6 M GdnHCl, 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl; 100 mM NaH₂PO₄; pH 7,5).



Abbildung 33: Western Blot der Solubilisierung von 5 mg/ml Ganzzellmembranen aus *P. pastoris* mit nativem Puffer.

Verwendeter Puffer: 150 mM Tris/HCl; 320 mM Sucrose, pH 7,5. Aufgetragen wurde nur der lösliche Überstand nach Ultrazentrifugation.

Verwendete Detergenzien: +: SDS; 2: TritonX100; 3: Tween20; 4: Zwittergent; 5: OG; 6: CHAPS; 7: NP40; 8: DOC; 9: TritonX114 10: Ohne Detergenz

15 % PAA-Gel, Erstantikörper SAF32, 12 µl Probe aufgetragen

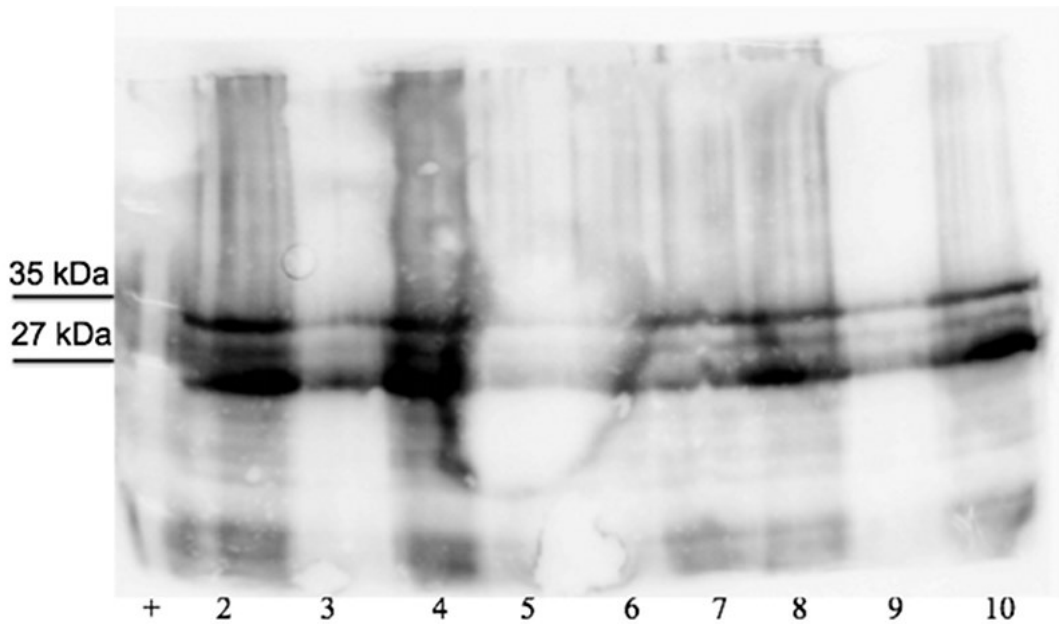


Abbildung 34: Western Blot der Solubilisierung von 5 mg/ml Ganzzellmembranen aus *P. pastoris* mit denaturierendem Puffer.

Verwendeter Puffer: 150 mM Tris/HCl; 320 mM Sucrose, pH 7,5. Aufgetragen wurde nur der lösliche Überstand nach Ultrazentrifugation.

Verwendete Detergenzien: +: SDS; 2: TritonX100; 3: Tween20; 4: Zwittergent; 5: OG; 6: CHAPS; 7: NP40; 8: DOC; 9: TritonX114 10: Ohne Detergenz

15 % PAA-Gel, Erstantikörper SAF32, 12 µl Probe aufgetragen

In Puffer 5 ist kein PrP-spezifisches Signal detektierbar, mit Ausnahme der Probe mit 1 % SDS. Dieses Ergebnis ist stellvertretend für alle anderen nicht-denaturierenden Puffer. Bei Verwendung von denaturierendem GdnHCl Puffer konnte bei allen verwendeten Detergenzien (außer bei SDS, s.o.) ein PrP-spezifisches Signal detektiert werden.

Die beiden hier gezeigten Möglichkeiten, PrP-GPI zu solubilisieren und zu reinigen sind somit die Verwendung des denaturierenden Detergenz SDS (1 %) oder aber die Verwendung eines denaturierenden Hochsalzpuffers mit 6 M GdnHCl. Hochsalzpuffer mit 6 M GdnHCl wird häufig verwendet, um in *E. coli* exprimiertes, rekombinantes PrP aus *inclusion bodies* (Einschlußkörperchen) zu reinigen.

4.7.2 Metallchelate - Affinitätschromatographie

Der erste Reinigungsschritt nach der Solubilisierung von PrP bestand in einer Metallchelate-Affinitätschromatographie (*immobilised metal affinity chromatography*, IMAC). Da alle exprimierten Proteine über einen His-tag verfügten, konnte die Reinigung über eine Ni-NTA Säule erfolgen. Bereits in vorherigen Arbeiten wurde rekombinantes, mit einem His-Tag

versehene recPrP(90-231) in *E. coli* exprimiert und erfolgreich denaturierend durch IMAC aufgereinigt. (Luers, 2013; Panza, 2009; Stöhr, 2007). Aus diesem Grund wurde zuerst das bereits etablierte Reinigungsprotokoll mit dem ebenfalls unmodifizierten Volllänge-PrP(23-231)(PrP Δ SS) getestet. Die Reinigung wurde, wie in Abschnitt 3.2.8.2 beschrieben, durchgeführt. Die Flussrate während der Reinigung lag bei 1 ml/min. Nach Äquilibration der Säule mit GdnHCl-Reinigungspuffer wurden 40 ml des Membransolubilisates injiziert. Nach der Probeninjektion und dem Beladen der Säule ging die Absorption_{280 nm} auf das Anfangsniveau zurück. Abbildung 35 zeigt für alle folgenden Reinigungen einen exemplarischen IMAC-Lauf mit PrP Δ SS unter denaturierenden Bedingungen. Im Anschluss an das Beladen der Säule erfolgte die Elution mit GdnHCl-Elutionspuffer in einem Gradienten über 30 ml von 0 % auf 100 % GdnHCl-Elutionspuffer (0 mM Imidazol auf 500 mM Imidazol). Der im Chromatogramm sichtbare zweite Peak entspricht dem Elutionspeak (ab ~70 min). Das Absorptionsplateau nach dem Elutionspeak ist der Imidazol-Eigenabsorption bei 280 nm geschuldet, die bei einer maximalen Konzentration von 500 mM im Elutionspuffer ~200 mAu beträgt.

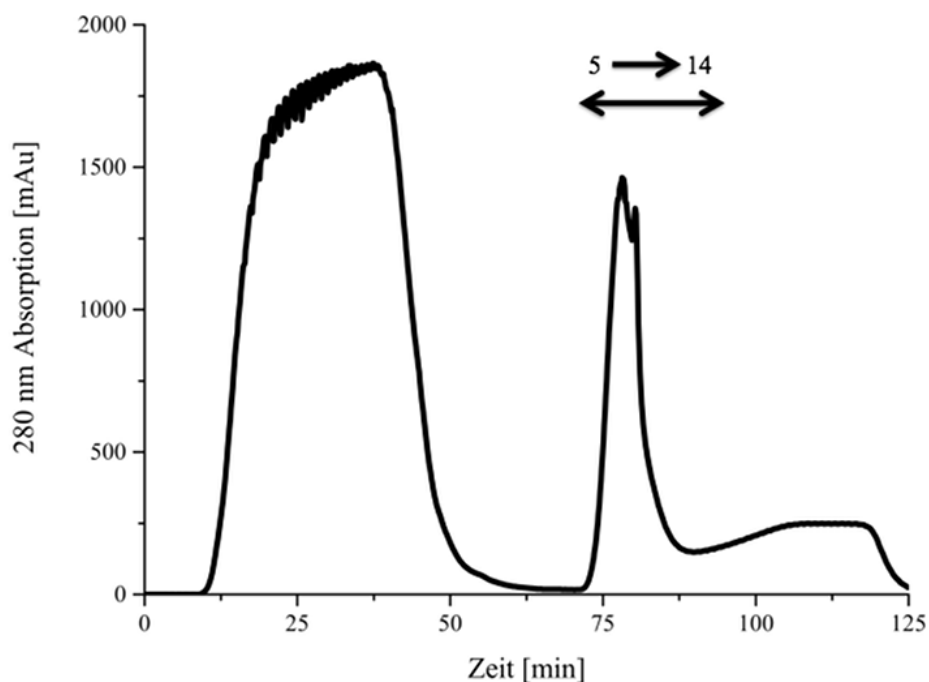


Abbildung 35: Exemplarisches Chromatogramm eines Ni-NTA IMAC-Laufs (GdnHCl-Puffer)

Aufgetragen ist die gemessene Absorption bei 280 nm gegen die Zeit während der Ni-NTA-Chromatographie. Der erste Peak zwischen 10 min und 50 min zeigt den Probenauflauf, der zweite Peak zwischen 70 min und 85 min zeigt die Elution der mit der Ni-NTA-Säule interagierenden Proteine. Die Pfeile kennzeichnen die Elutionsfraktionen 5 bis 14, die in nachfolgenden Abbildungen analysiert wurden.

Die Analyse der Elutionsfraktionen 5-14 erfolgte über SDS-PAGE mit nachfolgender Analyse mittels Coomassiefärbung sowie eines Western Blots. Das Coomassie-gefärbte PAA-Gel in Abbildung 36 zeigt, dass zu Beginn der Elution über die Fraktionen 6 bis 8 eine dominante Bande in der Größenordnung von ~ 70 kDa zu erkennen ist. Ab Fraktion 9 bis hin zur letzten Fraktion 14 ist eine weitere deutlich dominante Bande im Bereich von 27 kDa erkennbar, die im Bereich des erwarteten Molekulargewichts von PrP Δ SS liegt. Neben dieser dominanten Bande bei 27 kDa sind noch leichte Verunreinigungen sichtbar. Die Präsenz der dominant sichtbaren Bande deutet auf eine erfolgreiche Reinigung von PrP Δ SS per IMAC hin. Zur Verifizierung wurde mit denselben Fraktionen ein Western Blot durchgeführt, der in Abbildung 37 dargestellt ist.

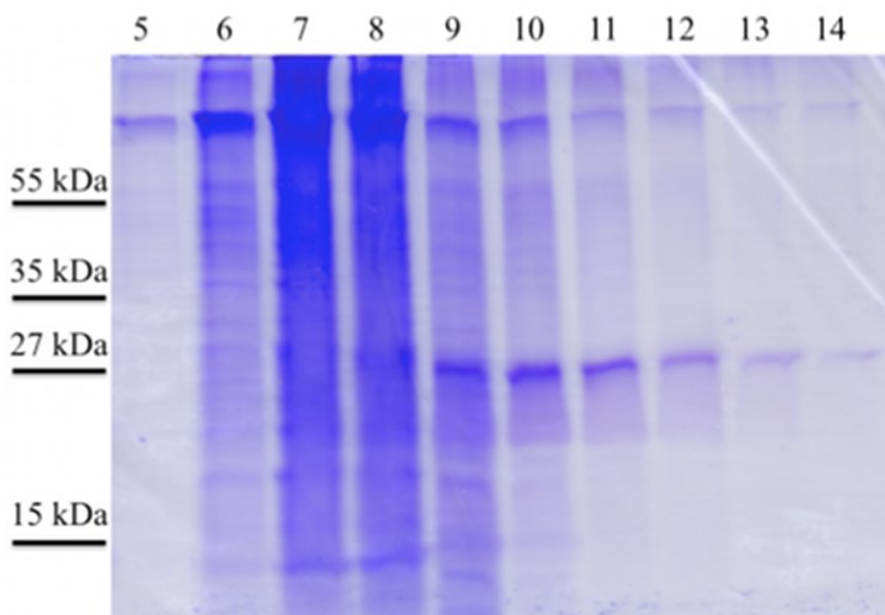


Abbildung 36: Coomassie gefärbtes PAA-Gel der Ni-NTA Reinigung von PrP Δ SS

Die Abbildung zeigt die Coomassie gefärbten Elutionsfraktionen 5 bis 14 der PrP Δ SS-Probe.

Deutlich erkennbar ist der Effekt der Aufreinigung anhand der dominanten Bande bei ~ 27 kDa in den Fraktionen 9 bis 14.

15 % PAA-Gel, jeweils 25 μ l Probe aufgetragen.

In Abbildung 37 ist der entsprechende Western Blot der Elutionsfraktionen zu sehen, der eine deutlich immunoreaktive Bande auf der Höhe von 25-27 kDa zeigt. Die Höhe der Banden ist identisch mit den in Abbildung 36 sichtbaren Coomassie-gefärbten Banden. Neben den immunoreaktiven Signalen bei ~ 27 kDa sind noch schwächere Signale bei ~ 17 kDa und ~ 50 kDa erkennbar, wobei es sich um Abbruchfragmente bzw. PrP-Dimere handeln könnte. Somit konnte gezeigt werden, dass die denaturierende Ni-NTA-Aufreinigung des Konstrukts PrP Δ SS, exprimiert in *P. pastoris*, in Anlehnung an vorhergehende Arbeiten ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden konnte.

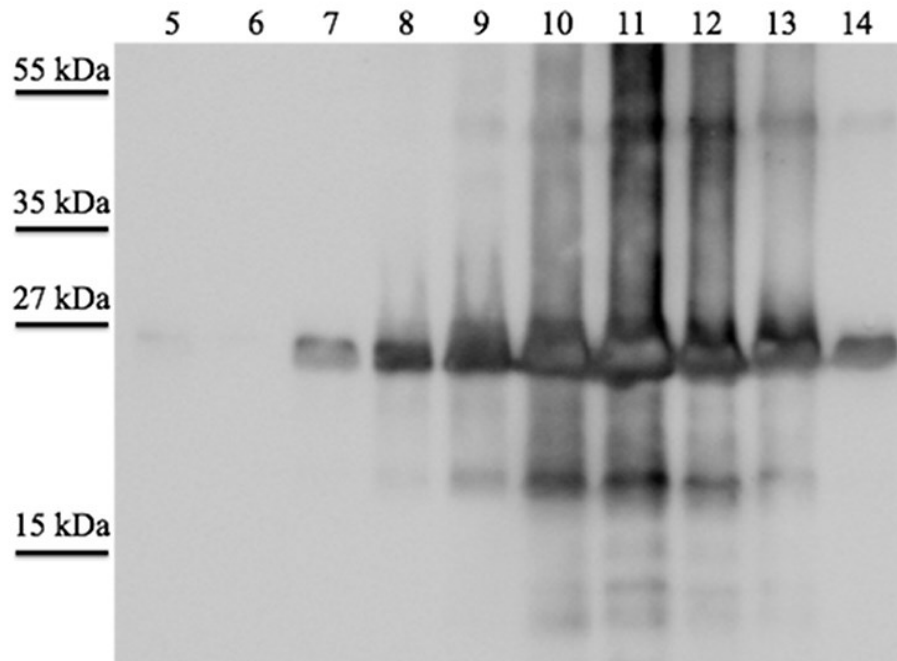


Abbildung 37: Western Blot der Ni-NTA-Elutionsfraktionen des Konstrukts PrPASS

Die Abbildung zeigt die Western Blot Analyse der Elutionsfraktionen 5 bis 14 der PrPASS-Probe. Deutlich erkennbar ist das starke immunreaktive Signal bei 27 kDa, beginnend in Fraktion 7 bis Fraktion 14. 15 % PAA-Gel, Erstantikörper SAF32, jeweils 12 μ l Probe aufgetragen.

Nach der erfolgreichen Reinigung von unmodifizierten PrPASS wurde nun dasselbe Aufreinigungsprotokoll für das posttranslational modifizierte Konstrukt PrP-GPI angewendet. Die IMAC-Reinigung wurde, wie vorhergehend für das Konstrukt PrPASS beschrieben, durchgeführt. Nach dem Probenauftrag und dem Waschen der Ni-NTA-Säule bis die Ausgangsabsorption wieder erreicht wurde, erfolgte die Elution mit GdnHCl-Elutionspuffer. Die Analyse der Reinigung erfolgte wie zuvor per SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung und Western Blot. Abbildung 38 zeigt das Coomassie-gefärbte PAA-Gel der Elutionsfraktionen. Im Gegensatz zu den Elutionsfraktionen des Konstrukts PrPASS ist hier deutlich zu sehen, dass keine merkliche Reinigung erzielt werden konnte. Anders als für das unmodifizierte PrPASS ist keine dominante Bande in dem erwarteten Bereich von 27 kDa bis zu 35 kDa sichtbar. Weiterhin erkennbar ist eine Vielzahl von weiteren, unspezifisch gebundenen Proteinen. Abbildung 39 zeigt den Western Blot der PrP-GPI Elutionsfraktionen. Hier sind im erwarteten Bereich von 27 kDa bis zu 35 kDa immunreaktive Banden erkennbar, jedoch im Vergleich zu den Elutionsfraktionen von PrPASS fallen diese deutlich schwächer aus und die im Western Blot sichtbaren Banden lassen sich nicht mit Sicherheit den Banden des Coomassie-gefärbten PAA-Gels zuordnen. Aufgrund der mangelnden IMAC-Reinigung von PrP-GPI unter den zuvor für PrPASS verwendeten Bedingungen musste das Reinigungsprotokoll für die posttranslational modifizierte Variante des PrPs modifiziert werden.

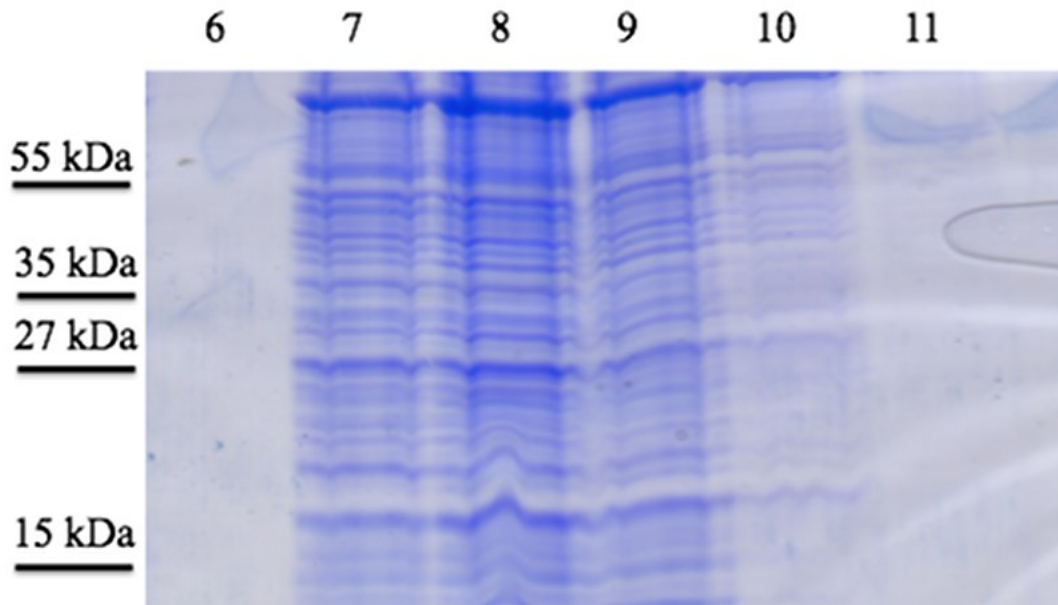


Abbildung 38: Coomassie gefärbtes PAA-Gel der Ni-NTA Reinigung von PrP-GPI
Die Abbildung zeigt die Coomassie-gefärbten Elutionsfraktionen 6 bis 11 der PrP-GPI Probe.
15 % PAA-Gel, jeweils 25 µl Probe aufgetragen

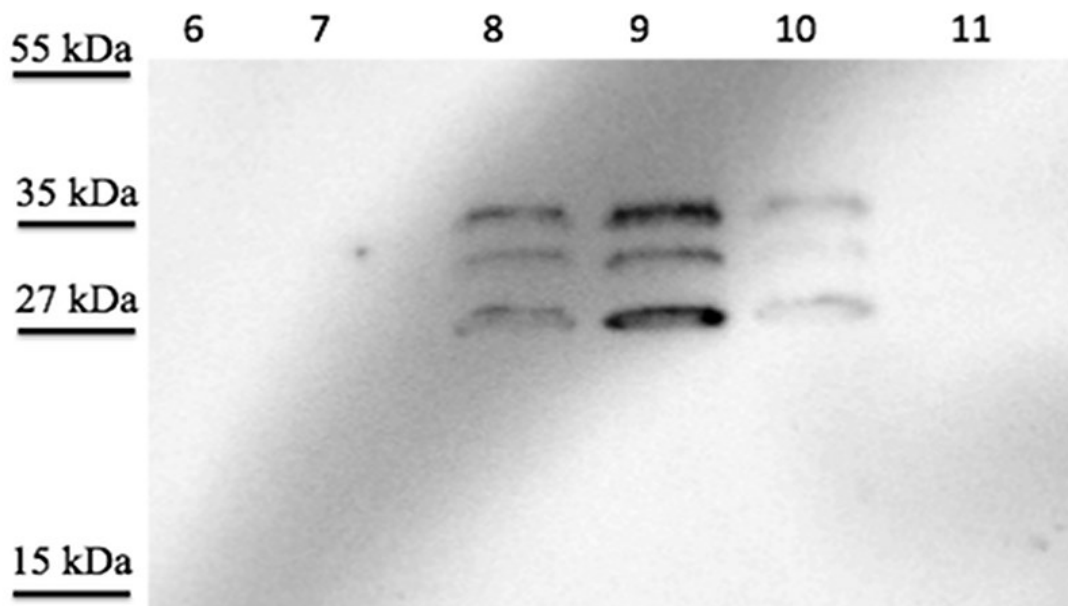


Abbildung 39: Western Blot der Ni-NTA-Elutionsfraktionen des Konstrukts PrP-GPI
Die Abbildung zeigt die Western Blot Analyse der Elutionsfraktionen 6 bis 11 der PrP-GPI Probe.
In Fraktion 8 bis 10 sind jeweils drei schwache, immunreaktive Banden im Bereich zwischen 27 kDa und 35 kDa erkennbar.
15 % PAA-Gel, Erstantikörper SAF32, jeweils 12 µl Probe aufgetragen.

Durch die Solubilisierungsanalysen in Abschnitt 4.7.1 konnte gezeigt werden, dass posttranslational modifiziertes PrP-GPI mittels milder Detergenzien nicht aus der Membranfraktion herausgelöst wird, sondern lediglich unter Einwirkung denaturierender Agenzien wie GdnHCl oder SDS solubilisiert und in Lösung gehalten werden kann. Aus diesem

Grund wurde als nächster Schritt ein SDS-basiertes IMAC-Reinigungsprotokoll für das Konstrukt PrP-GPI getestet. Die Reinigung erfolgte wie exemplarisch unter 3.2.8.2 beschrieben. Nach der Homogenisierung des Membranpellets in 5 ml Membran-Aufschlusspuffer, erfolgte die Solubilisierung durch Einstellen der Probe auf 1 % SDS und Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer. Nach der Solubilisierung erfolgte die Verdünnung der Probe auf eine SDS-Konzentration von 0,1 % SDS mit Membran-Aufschlusspuffer. Nach dem Beladen der Säule und dem Rückgang der Absorption auf das Anfangsniveau erfolgte die Elution der an die Säule gebundenen Proteine über einen Gradienten von 0 mM auf 500 mM Imidazol (Membran-Aufschlusspuffer-Elution).

Abbildung 40 zeigt die Analyse der gesammelten Elutionsfraktionen nach dem IMAC-Lauf.

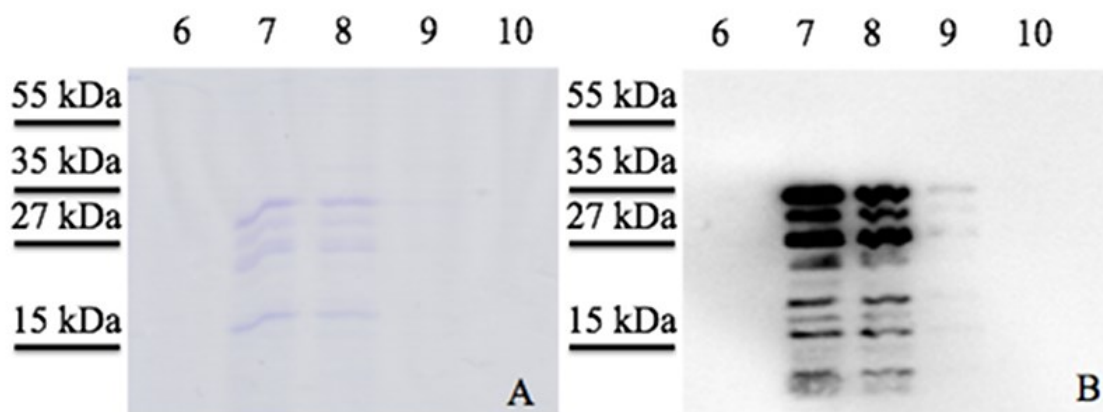


Abbildung 40: Analyse der Elutionsfraktionen der SDS-IMAC Reinigung von PrP-GPI.

(A) zeigt das Coomassie-gefärbte PAA-Gel, (B) den entsprechenden Western Blot der Elutionsfraktionen. Fraktion 7 und 8 zeigen sowohl im Coomassie-gefärbten Gel als auch im Western Blot eindeutige Banden in der erwarteten Größenordnung zwischen 27 kDa und 35 kDa. Es ist eine eindeutige Korrelation zwischen den Positionen der Banden in Abbildung 40 A und B erkennbar.

15 % PAA-Gele, Erstantikörper SAF32, 25 µl Probenvolumen (A), 12 µl Probenvolumen (B)

Deutlich erkennbar sind distinkte Banden in den Fraktionen 7 und 8 (Abbildung 40 A), welche im Bereich der erwarteten Größenordnung für PrP-GPI liegen (27 kDa–35 kDa). Auch der Western Blot (Abbildung 40 B) zeigt immunreaktive Banden, die mit den Positionen der Banden des Coomassie-gefärbten Gels übereinstimmen. Neben dem erwarteten Dreibandemuster sind ebenfalls schwache Banden im niedermolekularen Bereich von 12 kDa bis 17 kDa sichtbar. Diese sind ebenfalls an den entsprechenden Positionen des Coomassie-gefärbten Gels sichtbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass es sich ebenfalls um PrP-spezifische Banden handelt und nicht um noch vorhandene Verunreinigungen. Eventuell deutet dies auf Abbruchfragmente während oder nach der Expression hin. Neben den sichtbaren PrP-GPI-spezifischen Banden sind keine weiteren Verunreinigungen erkennbar, was auf einen hohen Reinigungseffekt hindeutet. Da keine Banden unspezifisch an der Säule gebundener

Proteine in den Elutionsfraktionen sichtbar sind, ist die IMAC-Reinigung mit SDS im Gegensatz zu der vorher durchgeführten IMAC-Reinigung mit GdnHCl eine geeignetere Methode für die Reinigung von posttranslational modifizierten PrP-GPI.

4.7.3 Reversed phase high performance liquid chromatography

Um die nach dem ersten Reinigungsschritt (4.7.2) noch vorhandenen Verunreinigungen abzutrennen, sowie einen Pufferwechsel durchzuführen, wurde die Methode der *reversed phase high performance liquid chromatography* (rpHPLC) angewendet. Die verwendete C8 Zorbax SB300 Säule (Agilent) wurde mit 3 Säulenvolumen 90 % Aq. dest./ 10 % ACN äquilibriert. Ein Schema des Ablaufs einer HPLC-Reinigung bezüglich der verwendeten Pufferkonzentrationen ist in Abbildung 9 dargestellt. Nach einer 5 minütigen Äquilibrierungsphase der Säule, während der stark hydrophile Proteine sowie nicht bindende Puffersubstanzen von hydrophoberen, an die Säule bindenden Proteinen abgetrennt werden, wurde die ACN-Konzentration über 15 min auf 80 % erhöht. Während dieser Phase eluieren Proteine mit steigender Hydrophobizität. Nach 26 min erfolgte die Reäquilibrierung der Säule auf 10 % ACN/ 90 % Aq. dest..

Zuerst wurde das Konstrukt PrP Δ SS per rpHPLC gereinigt. Abbildung 41 zeigt zwei übereinanderliegende Chromatogramme der Elutionsfraktionen 8 und 10 der PrP Δ SS Ni-NTA-Elution (Abbildung 36).

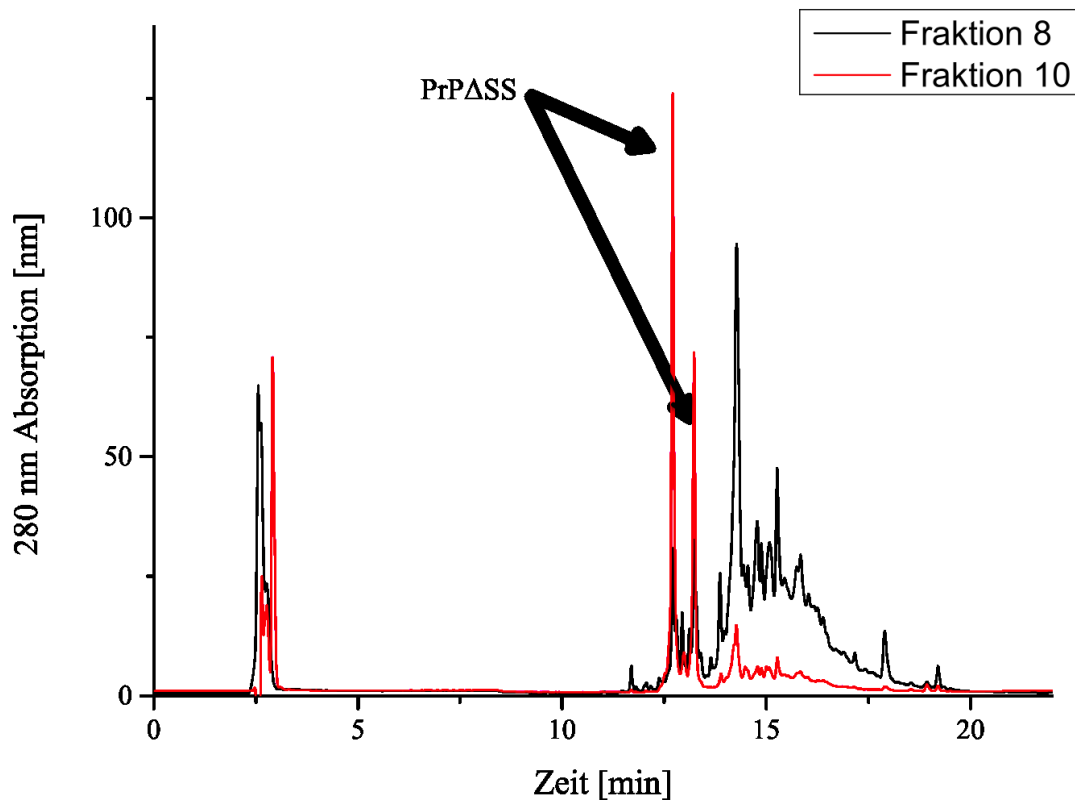


Abbildung 41: Chromatogramm der HPLC-Läufe unterschiedlicher Elutionsfraktionen nach der Ni-NTA-Reinigung des Konstrukts PrPASS.

In schwarz dargestellt ist das Chromatogramm der Elutionsfraktion 8, in rot dargestellt das Chromatogramm der Elutionsfraktion 10. Mit zunehmender Reinheit der injizierten Probe sind deutlich weniger unspezifische Peaks im Chromatogramm sichtbar. Probeninjektion jeweils 20 μ l.

Es ist zu erkennen, dass die Reinigung einer frühen Elutionsfraktion (8) im Vergleich zu dem einer späteren Elutionsfraktion (10) deutliche Unterschiede zeigt. Das Chromatogramm von Fraktion 8 zeigt ein breites Spektrum an Peaks über einen Bereich der Retentionszeit von ~11 min bis ~20 min, wohingegen Fraktion 10 deutlich weniger Peaks aufweist, von denen zwei Peaks bei Retentionszeiten von 12,7 min bis 13,3 min als deutlich prominente Peaks hervortreten. Dies korreliert mit dem Bandenmuster in Abbildung 36 welches für Fraktion 8 noch viele andere Banden aufweist, in Fraktion 10 jedoch nur noch wenige Verunreinigungen neben PrPASS. Die Aufspaltung in 2 Peaks könnte auf das Vorliegen von PrP mit oxidierter bzw. reduzierter Disulfidbrücke hindeuten, wobei der erste Peak der oxidierten Form, der zweite Peak der reduzierten Form entspricht. Dies wurde bereits in vorhergehenden Arbeiten beobachtet (Luers, 2013; Stöhr, 2007). Die Analyse per Coomassie-gefärbten PAA-Gel (Abbildung 42 A) und Western Blot (Abbildung 42 B) der beiden vereinigten Peaks bei 12,7 min und 13,3 min zeigt, dass nach HPLC Reinigung nur noch eine PrP-spezifische Proteinbande vorhanden ist. Ebenso die massenspektrometrische Analyse bestätige ein

durchschnittliches Molekulargewicht von ~24 kDa für Proben beider Peaks (siehe Anhang). Es sind nach HPLC-Reinigung keine Verunreinigungen durch Fremdproteine mehr detektierbar.

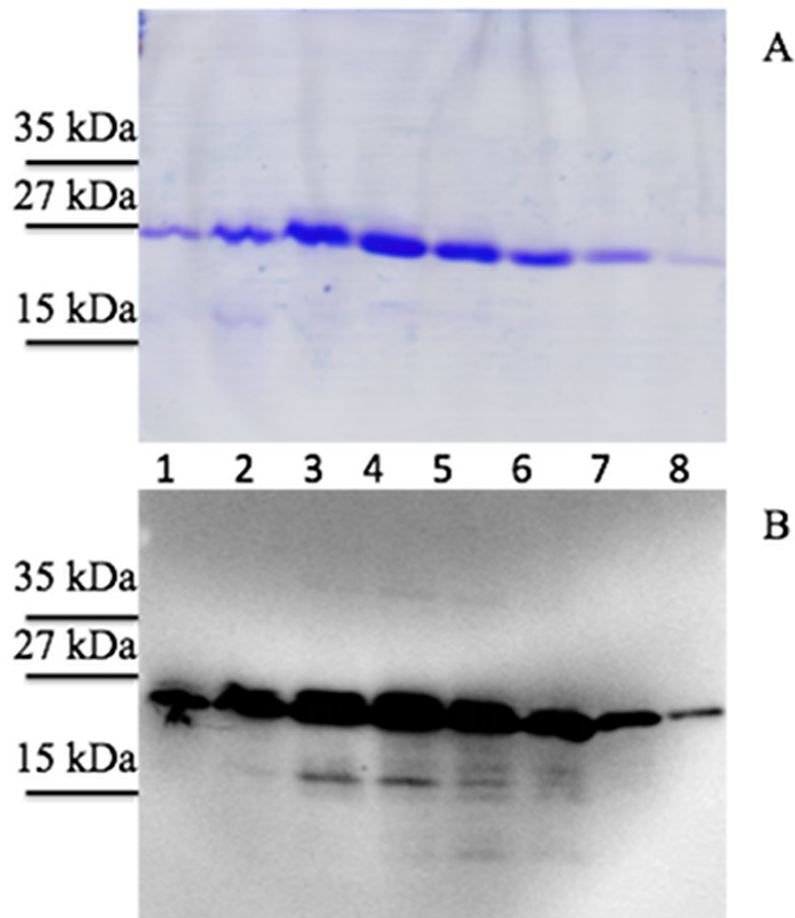


Abbildung 42: Coomassie-gefärbtes PAA-Gel und Western Blot der vereinigten Peaks bei 12,7 min und 13,3 min nach HPLC Reinigung des Konstrukts PrPASS.

Abbildung 42 A zeigt die Coomassie-Färbung, Abbildung 42 B den Western Blot der beiden vereinigten Elutionspeaks. 1-7 steht für gesammelte Proben aus 7 aufeinanderfolgenden HPLC-Läufen. 15 % PAA-Gele, Erstantikörper SAF32, 25 μ l Probenvolumen (A), 12 μ l Probenvolumen (B)

Nach der Reinigung des Konstrukts PrPASS mittels rpHPLC folgte nun die Reinigung von PrP-GPI (Abbildung 40). Abbildung 43 zeigt das Chromatogramm eines Reinigungslaufes von PrP-GPI.

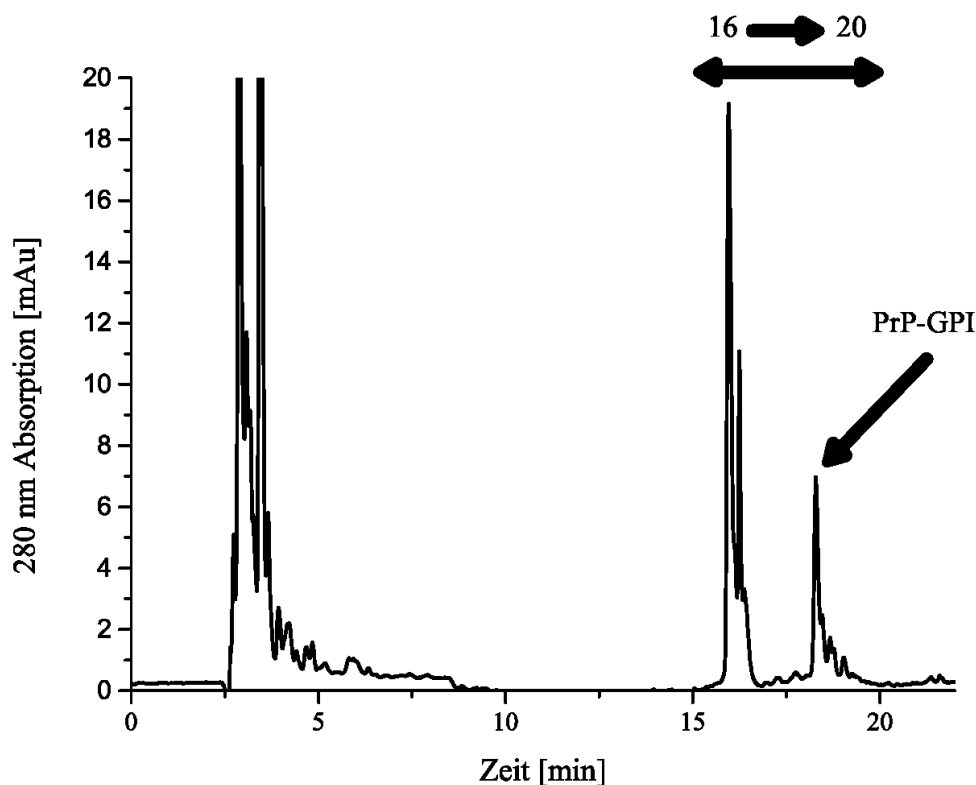


Abbildung 43: Chromatogramm eines HPLC-Läufes nach der Ni-NTA-Reinigung des Konstrukts PrP-GPI. Probeninjektion 100 μ l.

Das Chromatogramm unterscheidet sich von dem der PrP Δ SS Reinigung unter anderem in dem Punkt, dass jeder Lauf über die erhaltenen Ni-NTA-Elutionsfraktionen dasselbe, konstante Muster und 2 prominente Peakgruppen bei \sim 16 min und \sim 19 min aufweist. Bei der Analyse der unterschiedlichen Ni-NTA-Elutionsfraktion änderte sich lediglich die Intensität der Peaks, jedoch nicht das Elutionsmuster wie im Falle von PrP Δ SS. Dies liegt an der bereits reineren Probe nach dem SDS-IMAC-Lauf (Abbildung 40). Im Vergleich zur Reinigung von PrP Δ SS sind die Peaks zu höheren Retentionszeiten hin verschoben.

Um zu überprüfen in welchem Elutionspeak PrP-GPI eluiert, wurde über den Bereich von 16 min bis zu 20 min Retentionszeit in Minutenabständen Proben gesammelt und per Western Blot und Silberfärbung analysiert.

Abbildung 44 und Abbildung 45 zeigen das Ergebnis der Western Blot Analyse sowie der Silberfärbung der gesammelten Fraktionen. Hierbei wird deutlich, dass immunreaktive PrP-spezifische Banden in Fraktion 18-20 zu finden sind, mit dem stärksten Signal in Fraktion 19 (19-20 Minuten Retentionszeit). Dies wird auch durch die Silberfärbung in Abbildung 45 bestätigt. Dort ist das PrP-GPI-spezifische Dreibandmuster deutlich erkennbar. Damit befindet sich PrP-GPI in der zweiten eluierten Peakgruppe ab einer Retentionszeit von 19 min.

In der ersten Peakgruppe zwischen 15 min und 17 min sind keine PrP-spezifischen Signale mit dem Prion-Antikörper SAF32 detektierbar. Im silbergefärbten Gel sind diffuse Banden im Bereich zwischen 10 kDa und 15 kDa sichtbar, die nicht näher untersucht wurden.

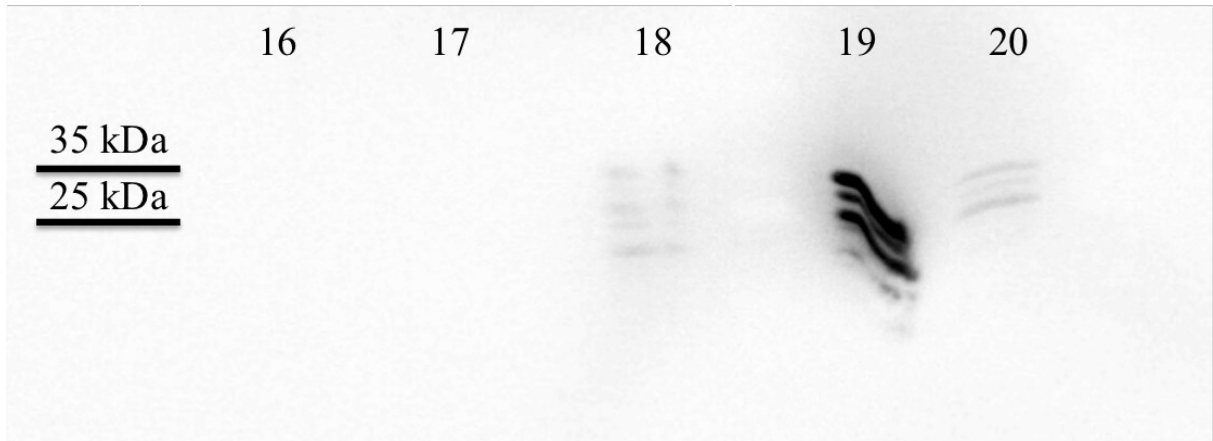


Abbildung 44: Analyse der PrP-GPI HPLC-Fractionen 16-20 durch Western Blot
15 % PAA-Gel, Erstantikörper SAF32, 25 µl Probenvolumen

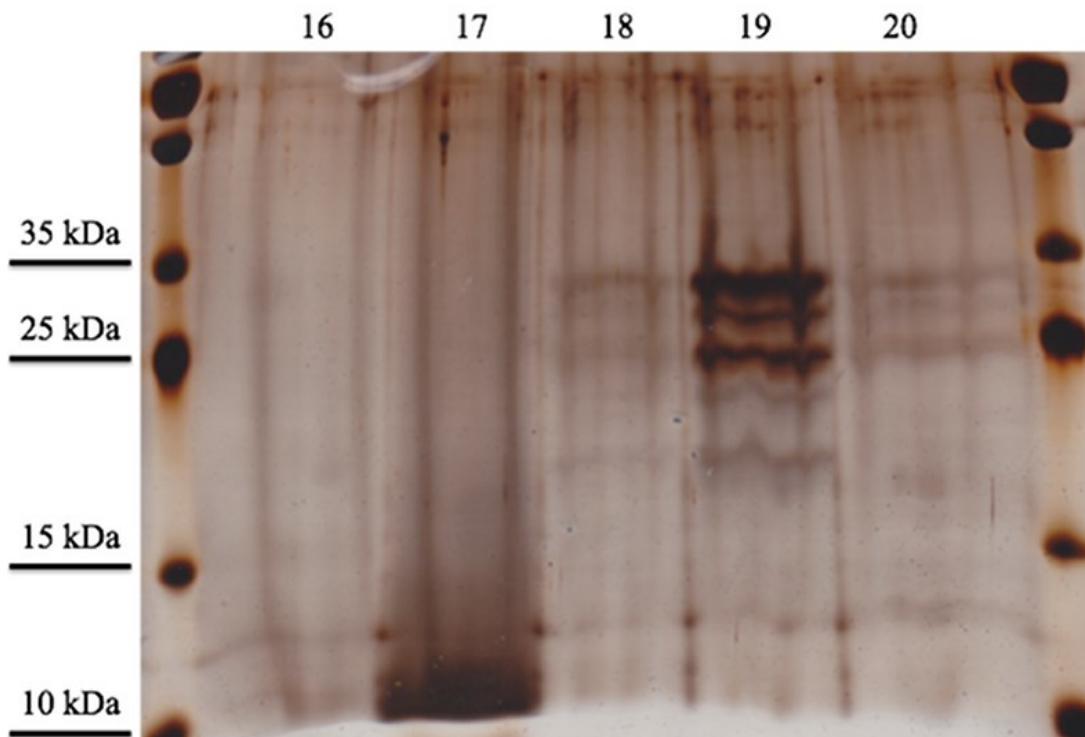


Abbildung 45: Analyse der PrP-GPI HPLC-Fractionen 16-20 durch Silberfärbung
15 % PAA-Gel, 25 µl Probenvolumen

Abbildung 46 zeigt das HPLC-gereinigte PrP-GPI auf einem Coomassie-gefärbten PAA-Gel (A) inklusive PrP-spezifischem Western Blot (B) welcher alle Coomassie-gefärbten Banden als PrP Banden identifiziert. Zusätzlich zum erwarteten Dreibandemuster sind 2 weitere Banden sichtbar.

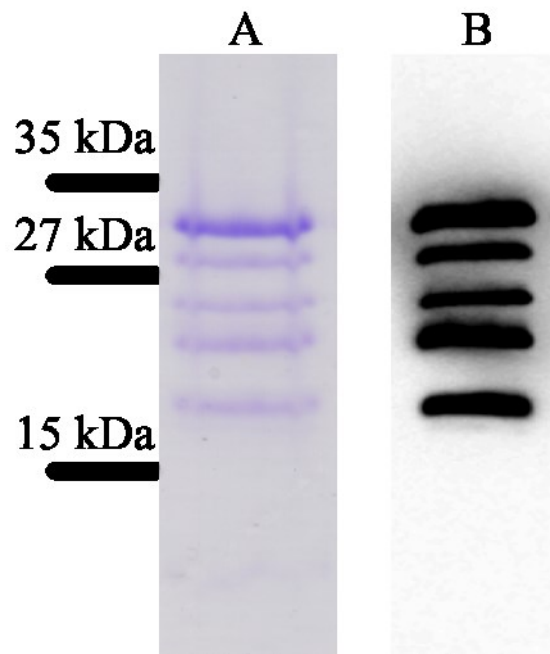


Abbildung 46: Coomassie-gefärbtes PAA-Gel und Western Blot des HPLC gereinigten PrP-GPI Konstruktes

Abbildung 46 A zeigt die Coomassie-Färbung, Abbildung 46 B den Western Blot des Konstruktes PrP-GPI nach erfolgreicher Ni-NTA und HPLC Reinigung.

15 % PAA-Gele, Erstantikörper SAF32, 25 μ l Probenvolumen (A), 12 μ l Probenvolumen (B)

4.8 Löslichkeitsscreen

Nach der Reinigung und Lyophilisierung des PrP-GPI sollte ein geeigneter Puffer gefunden werden, in dem PrP-GPI löslich ist. Als Positivkontrolle wurde hierbei 10 mM NaPi, 250 mM NaCl, pH 7,4 mit 0,1 % SDS genutzt, da dieser Puffer in vorherigen Arbeiten (Luers, 2013) erfolgreich für in *E. coli* exprimiertes PrP genutzt wurde. Des Weiteren wurden für eine erste Löslichkeitsanalyse 10 mM NaPi, pH 7,4 ohne Detergenz, CBS Puffer (pH 6), Aq. dest. (~pH 5) und Natriumacetatpuffer (NaAc)(pH 5) in Konzentrationsbereichen zwischen 1 mM und 100 mM getestet. Da es sich um einen ersten Löslichkeitstest handelte, wurden für jede Probe 250 μ l des HPLC-Eluats über Nacht an einer Gefriertrocknungszentrifuge lyophilisiert und mit 100 μ l des jeweiligen Puffers resuspendiert. Die Proben wurden für 1 h bei 30 °C und 800 rpm auf einem Schüttler inkubiert und darauf folgend für 1 h bei 100.000 xg, 4 °C

zentrifugiert um sicherzugehen, dass nach der Zentrifugation nur lösliches PrP-GPI im Überstand vorhanden ist. Von diesem Überstand wurde mittels UV-Spektroskopie die Proteinkonzentration bestimmt und diese in Abbildung 47 dargestellt.

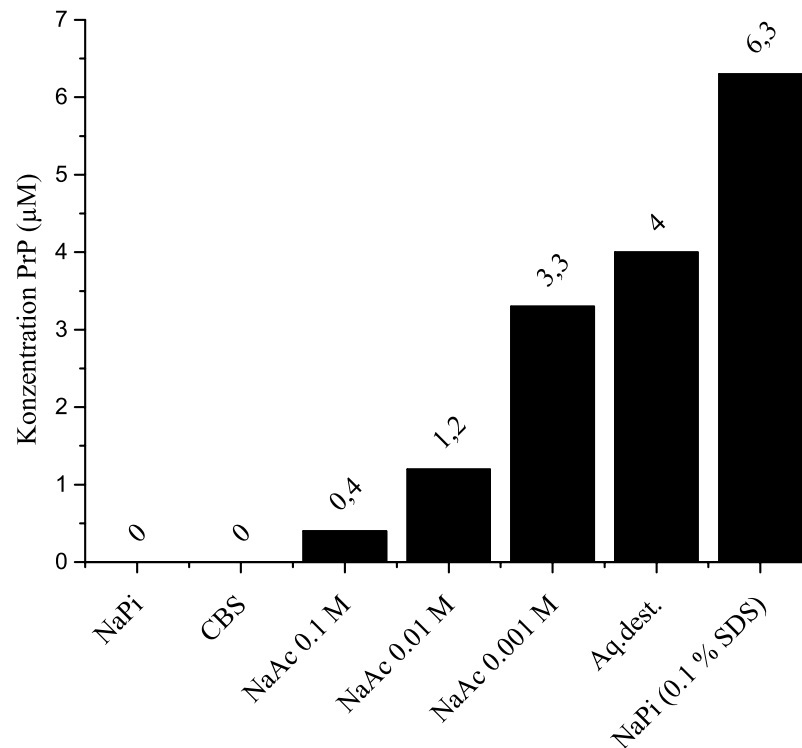


Abbildung 47: Erster Löslichkeitsscreen von PrP-GPI in verschiedenen Puffern.

Konzentrationsangaben in µM. Die pH Werte der Puffer betragen: NaPi – pH 7,4; CBS – pH 6,0; NaAc – pH 5,0; Aq. dest – pH ~ 5.

Jeweils 250 µl lyophilisierte HPLC Probe wurden in je 100 µl des jeweiligen Puffers für 60 min, 30 °C, 800 rpm resuspendiert. Nach einem 100.000 xg spin bei 4 °C wurde am Nanodrop die Konzentration des noch löslichen Überstandes bestimmt.

Abbildung 47 zeigt, dass deutliche Unterschiede in der Löslichkeit von PrP-GPI in den verwendeten Puffern bestehen. PrP-GPI weist die höchste Löslichkeit in Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % SDS auf mit 6,3 µM PrP-GPI (Im Überstand nach Zentrifugation), gefolgt von Aq. dest. mit 4 µM und 1 mM Natriumacetatpuffer mit 3,3 µM löslichem PrP. In CBS Puffer, sowie in Natriumphosphatpuffer ohne SDS konnte keine bestimmbare Proteinkonzentration gemessen werden. Auffallend ist, dass im Falle des Natriumacetatpuffers mit steigender Salzkonzentration des Puffers die Löslichkeit von 3,3 µM bei 1 mM Natriumacetat auf nur noch 0,4 µM bei 100 mM Natriumacetat drastisch abnimmt. Aus dieser ersten Löslichkeitsanalyse kann der Schluss gezogen werden, dass PrP-GPI ein gutes

Löslichkeitsverhalten in Aq. dest. zeigt, gefolgt von 1 mM Natriumacetatpuffer, sowie möglichst niedrige Salzkonzentrationen verwendet werden sollten.

Auf Grundlage des Ergebnisses des ersten Löslichkeitsscreens in Abbildung 47 wurde die maximal erreichbare Konzentration von PrP-GPI unter diesen Bedingungen bestimmt. Dazu wurden die beiden Puffer verwendet, in denen sich in der ersten Löslichkeitsanalyse PrP-GPI am besten lösen lies. Es wurden Lyophilisate aus steigendem Volumina der HPLC-Elutionsfraktionen verwendet (250 μ l, 500 μ l, 750 μ l, 1000 μ l, 1500 μ l und 3000 μ l).

In Abbildung 48 ist zu sehen, dass bis zu einer bestimmten Grenze ein linearer Zusammenhang zwischen der Konzentration an löslichem PrP in Aq. dest. bzw. NaPi (mit 0,1 % SDS) und eingesetztem Probenvolumina besteht. Mit einer Konzentration von ca. 5,7 μ M bei 250 μ l eingesetzter, lyophilisierter Probe steigt die Konzentration an löslichem PrP-GPI bei einem 6fachen Probenvolumen (1500 μ l) auch ungefähr auf den 6-fachen Wert (30 μ M) an. Bei einer weiteren Verdopplung des Probenvolumens von 1500 μ l auf 3000 μ l konnte im Falle von Aq. dest. ebenfalls noch eine Verdopplung der Konzentration an löslichem PrP-GPI auf bis zu 66 μ M PrP-GPI beobachtet werden, im Falle des NaPi Puffers ist die maximale Löslichkeit bei Verwendung eines 3000 μ l Lyophilisates bereits überschritten und die Konzentration an löslichem PrP-GPI sinkt auf einen Wert von 9,7 μ M.

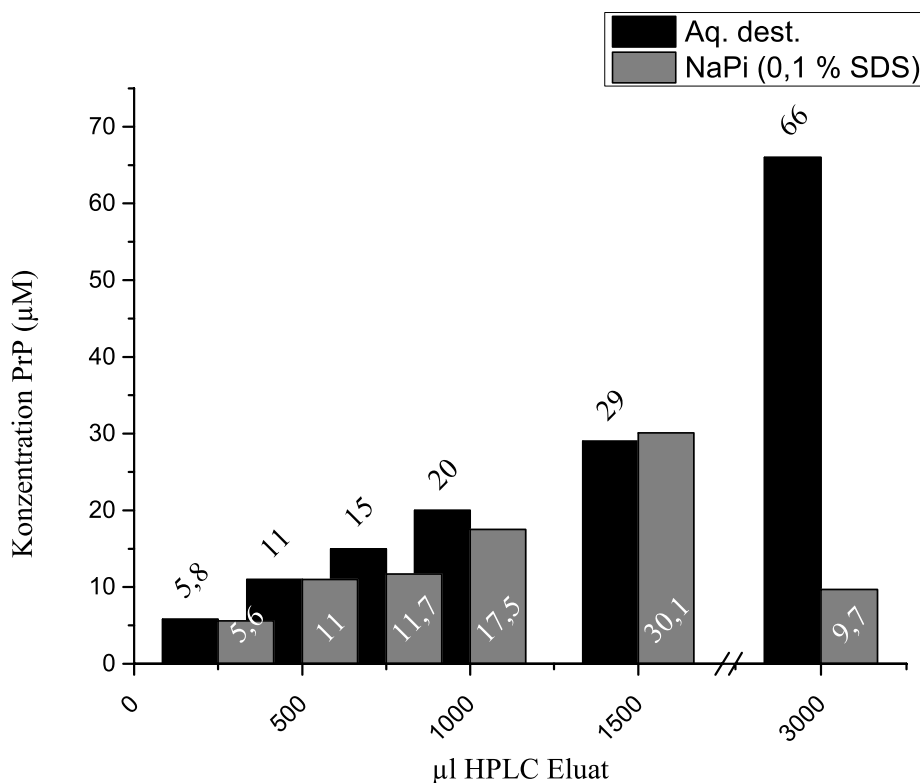


Abbildung 48: Analyse der maximalen Löslichkeit von PrP-GPI in Aq. dest. und NaPi (0,1 % SDS)
Konzentrationsangaben in μ M. Die pH Werte der Puffer betragen: NaPi – pH 7,4; Aq. dest – pH \sim 5.

Jeweils 250 μ l, 500 μ l, 750 μ l, 1000 μ l, 1500 μ l und 3000 μ l HPLC-Lyophilisat wurden in je 100 μ l des jeweiligen Puffers für 60 min, 30 °C, 800 rpm resuspendiert. Nach einem 100.000 xg spin bei 4 °C wurde am Nanodrop die Konzentration des noch löslichen Überstandes bestimmt.

Zur Überprüfung der Reinheit und eventueller Auswirkungen des verwendeten Puffers auf das gereinigte Proteins, wurde nach der Konzentrationsmessung ein Teil der löslichen PrP-GPI Probe aus NaPi Puffer und Aq. dest. abgenommen und für einen Western Blot und ein Coomassie-gefärbtes PAA-Gel eingesetzt. Für den Western Blot wurden hierbei jeweils 300 ng Protein, für das Coomassie-gefärbte Gel 1 μ g Protein verwendet. Abbildung 49 zeigt anschaulich, dass in jeder Probe, unabhängig des verwendeten Puffers dasselbe Bandenmuster zu finden ist. Neben den drei erwarteten Hauptbanden der drei Isoformen zwischen 27 kDa und 35 kDa sind im Western Blot noch weitere Banden bei niedrigerem Molekulargewicht sichtbar, die ebenfalls das typische Dreibandmuster zeigen. Dies könnten Abbruchfragmente der Proteinexpression darstellen.

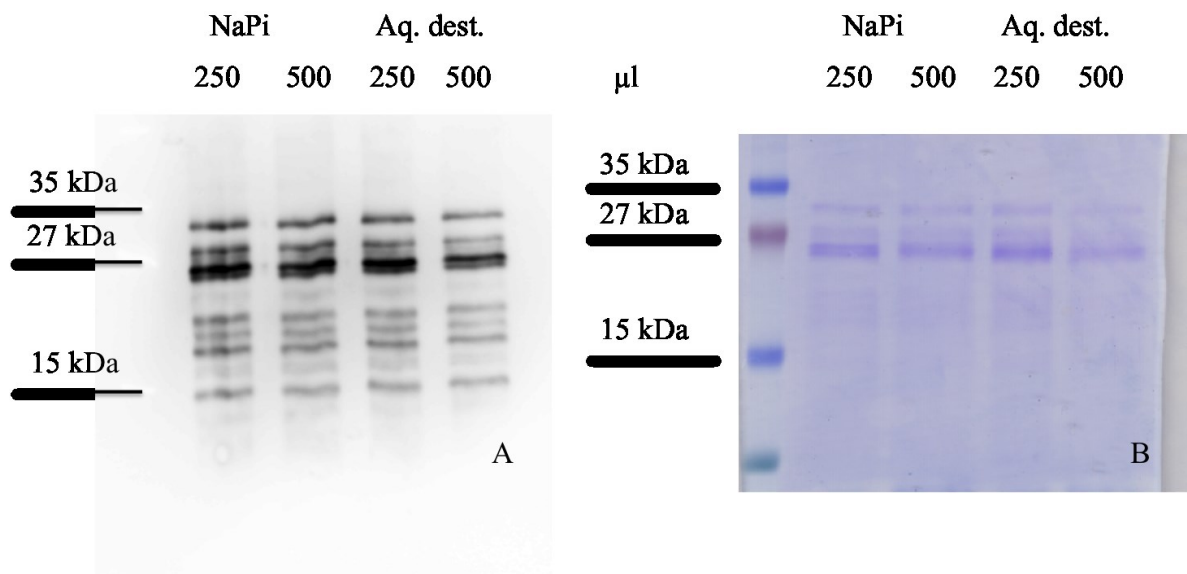


Abbildung 49: Western Blot und SDS PAGE Analyse von resuspendiertem PrP-GPI in NaPi (0,1 % SDS) und Aq. dest. aus dem Löslichkeitstest.

Aus den 250 μ l und 500 μ l Lyophilisatproben welche mit NaPi bzw. Aq. dest. resuspendiert wurden, wurden jeweils 300 ng des löslichen Überstandes für einen Western Blot (A) und 1 μ g Protein für ein coomassie-gefärbtes PAA-Gel (B) verwendet.

15 % SDS Gel, Erstantikörper SAF32 (Western Blot).

4.9 Sekundärstrukturanalyse des PrP-GPI

Um zu überprüfen, ob das gereinigte und lösliche PrP-GPI Merkmale von Sekundärstrukturen wie α -Helix, β -Faltblatt oder *random coil* aufweist, wurde die Methode der Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie angewendet. Mit dieser Methode konnten Sekundärstrukturanteile von jeweils 200 μ l PrP-GPI in den beiden Puffern, 10 mM NaPi, 250 mM NaCl, pH 7,4 sowie Aq. dest. pH~5 bei 20 °C analysiert werden. Wie in Abbildung 50 zu sehen ist, zeigen beide Proben ein Spektrum, welches für alpha-helikale Strukturanteile charakteristisch ist (Vergleich mit Abbildung 10). Das Spektrum der Probe in Aq. dest. weist ein absolutes Minimum bei ~210 nm, das der Probe in NaPi-Puffer bei ~208 nm auf. Der Nulldurchgang liegt im Falle der Probe in NaPi-Puffer bei 200 nm, im Falle der Probe in Aq. dest. bei ~202 nm. Weiterhin ist in der Probe mit NaPi-Puffer eine Schulter bei ~218 nm erkennbar. Der zu geringfügig höheren Wellenlängen hin verschobene Nulldurchgang von PrP-GPI in Aq. dest. könnte auf einen geringen β -Faltblattanteil hindeuten.

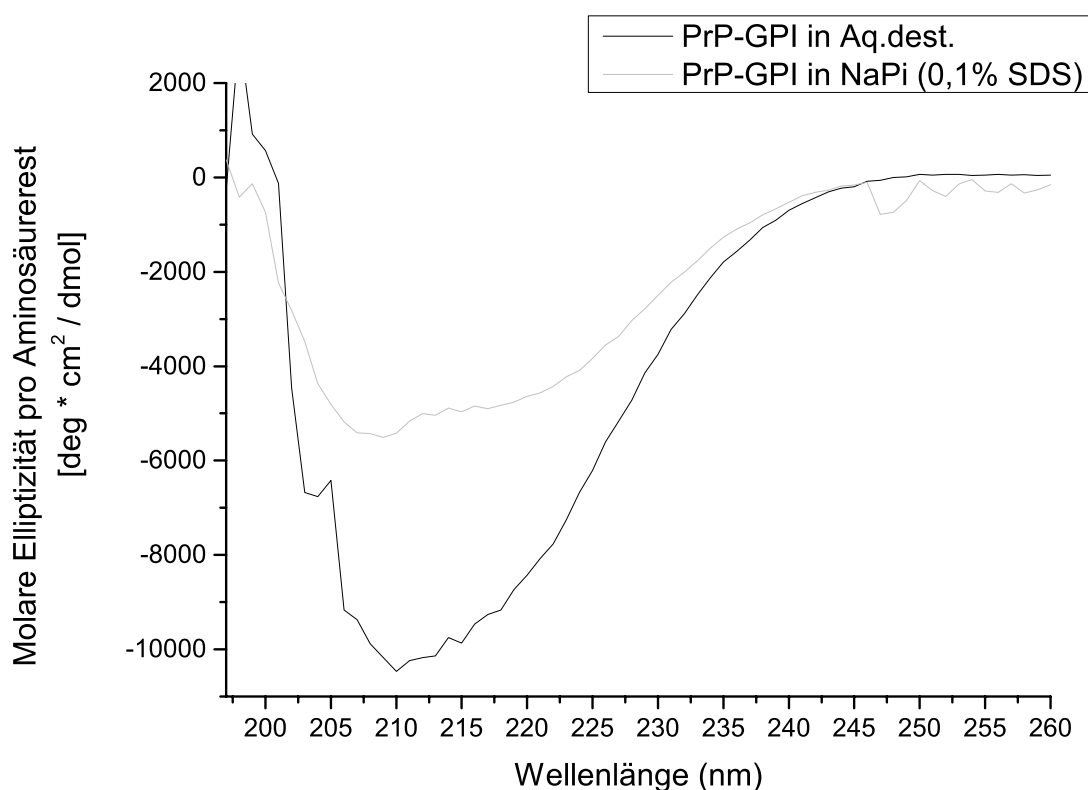


Abbildung 50: Analyse der Sekundärstruktur von PrP-GPI in zwei verschiedenen Puffern.

CD-Spektren wurden von PrP-GPI in Aq. dest (schwarze Linie) und PrP-GPI in NaPi (mit 0,1 % SDS) (graue Linie) aufgenommen, wobei die Probe eine Konzentration von ~19 μ M aufwies. Die Abbildung zeigt einen Wellenlängenbereich von 197 nm bis 260 nm. Auf der y-Achse ist die molare Elliptizität pro Aminosäurerest (Θ) dargestellt.

4.10 Rekonstitution von PrP-GPI in raft-like Liposomen

Das Prion Protein wird durch seine Signalsequenzen posttranslational modifiziert, was zur Glykosylierung und dem Anheften eines GPI-Ankers führt. Mittels des GPI-Ankers ist PrP durch 2 Fettsäureketten mit der Zellmembran in *raft-like* Domänen verbunden. Wird posttranslational modifiziertes PrP in *raft-like* Liposomen inkorporiert, ist dies ein Indiz für die Interaktion des PrP mit den Liposomen mittels GPI-Anker.

Die hier präparierten und verwendeten small unilamellar vesicles (SUV) wurden aus einer *raft-like* Lipidmischung (Tabelle 3) wie in Abschnitt 3.2.12.1 beschrieben hergestellt. Im Inneren der Liposomen befand sich eine hohe Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs Carboxyfluorescein, was zum Quenching der Fluoreszenz führt. Nach der Ultraschallpräparation der SUVs wurden diese durch Gelfiltration vom noch freien Farbstoff getrennt. Durch den in den SUVs eingeschlossenen Farbstoff konnten die Liposomen während der Gelfiltration als wandernde, orangefarbende Bande identifiziert und gesammelt werden. Die PrP-GPI Probe wurde mit bzw. ohne vorherige Inkubation mit SUV auf eine Saccharosekonzentration von 30 % eingestellt. Die Proben wurden in ein Ultrazentrifugationsröhrchen pipettiert und stufenweise mit 20 %, 15 %, 10 % und 5 % Saccharoselösung überschichtet. Nach Ultrazentrifugation bei 135.000 xg bei 4 °C wurden von oben (1, Fraktion geringster Dichte) nach unten (6, Fraktion höchster Dichte) 200 µl Fraktionen abgenommen. 150 µl jeder Fraktion wurden für den DotBlot eingesetzt. Die Lokalisation von Liposomen innerhalb des Dichtegradienten konnte durch Zugabe von TritonX100, zu jeder abgenommenen Fraktion, nachgewiesen werden. TritonX100 löst die Liposomenmembran auf und unterbindet somit den Quenchingeffekt des Carboxyfluoresceins innerhalb der Liposomen. Dies resultiert in einer deutlich höheren Fluoreszenzintensität in Fraktionen, die Liposomen beinhalten.

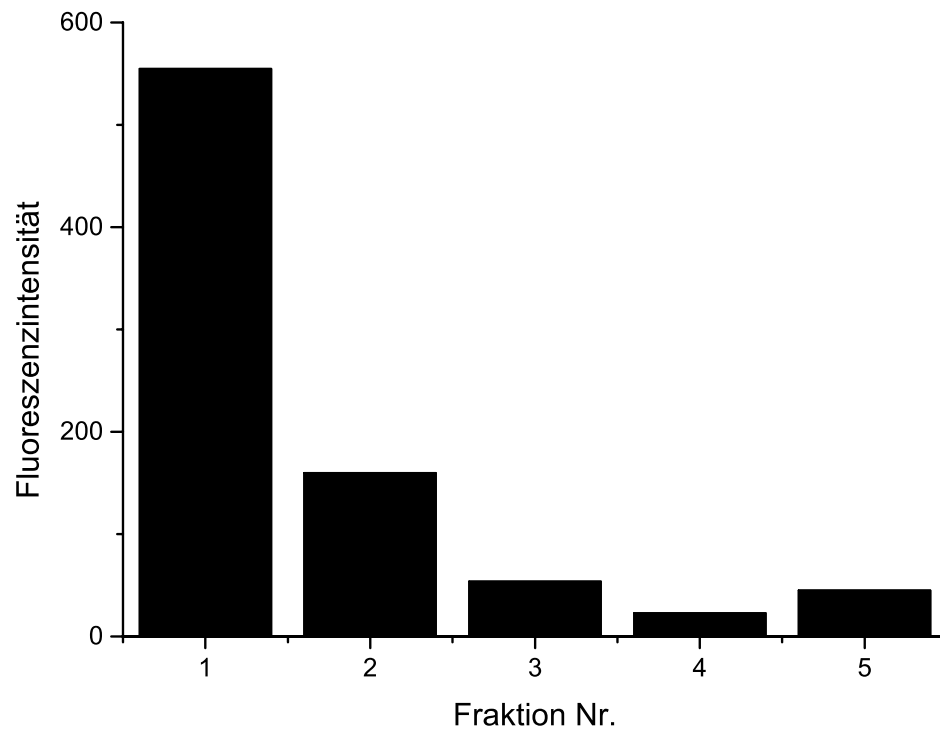


Abbildung 51: Relative Fluoreszenzintensität der Dichtegradientfraktionen nach TritonX100 Zugabe.

Zu 40 μ l Probe der Fraktionen 1-5 wurden je 5 μ l 10 %iges TritonX100 zugegeben und durchmischt. Die Fluoreszenzintensität wurde am Fluoreszenzplattenreader Infinite M200Pro bei einer Anregungswellenlänge von 320 nm und einer Detektionswellenlänge von 520 nm analysiert.

Durch Analyse der Fluoreszenzintensität konnten die Liposomen in den ersten 1-3 Fraktionen des Dichtegradienten lokalisiert werden. In den ersten beiden Fraktionen war eine deutlich orange-braune Färbung durch die Liposomen sichtbar, dies wird ebenfalls durch die Fluoreszenzintensität in den Fraktionen 1-3 in Abbildung 51 verdeutlicht. Es ist eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität von Fraktion 1 bis Fraktion 5 erkennbar. Fraktion 6 konnte auf Grund von zu geringem Probenvolumen nicht fluorimetrisch analysiert werden. Die gesamte Probe der 6. Fraktion wurde für den darauf folgenden DotBlot verwendet.

Abbildung 52 zeigt die Dot Blot Analyse aller Fraktionen des Dichtegradienten, sowie des Pellets, welches durch Auskochen des Ultrazentrifugations-Polyallomergefäßes mit SDS-Auftragspuffer erhalten wurde. Deutlich zu erkennen ist, dass in der oberen Probenreihe ohne Zugabe von Liposomen das Gesamte PrP-GPI in der Pelletfraktion zu finden ist. Die Fraktionen 1-6 des Dichtegradienten zeigen keinerlei PrP-spezifisches Signal.

Die untere Reihe zeigt das Ergebnis der PrP-GPI Probe mit Liposomen nach der Dichtegradientenzentrifugation. Hier befindet sich PrP-GPI in den ersten 3 Fraktionen, nicht wie in der oberen Reihe, in der Pelletfraktion. Die Zugabe von *raft-like* Liposomen führt zu

einer deutlichen Verschiebung und Kollokalisierung der PrP-spezifischen Signale mit den Liposomenfraktionen (Abbildung 51). Dieses Ergebnis korreliert ebenfalls mit vorherigen Ergebnissen basierend auf posttranslational modifiziertem CHO-PrP^C, sowie rekombinantem PrP^C aus *E. coli* (Elfrink, 2005; Gruening, 2010).

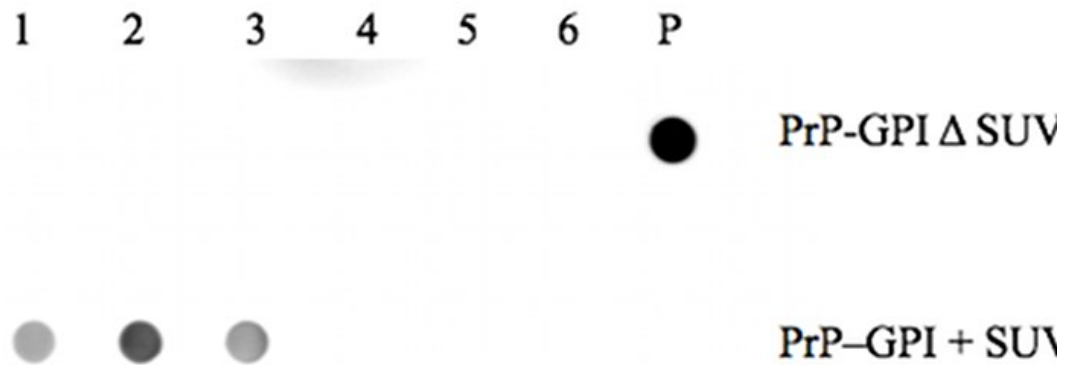


Abbildung 52: Rekonstitutionsexperiment von PrP-GPI in *raft-like* Liposomen

Rekonstitutionsexperiment von PrP-GPI in *raft-like* Liposomen im Verhältnis 1:80.000.

1 – 6 entspricht den Fraktionen des Dichtegradienten von 0 % - 30 % Saccharose. P: Pellet des ausgekochten Ultrazentrifugationsröhrchens. In der oberen Reihe wurde das Resultat nach der Dichtegradientenzentrifugation von 200 ng PrP-GPI ohne Liposomen, in der unteren Reihe von 200 ng PrP-GPI mit Liposomen analysiert.

Erstantikörper: SAF32

4.11 Festkörper-NMR-Spektroskopie von Membran-gebundenem PrP^C

Nach der Expression von ¹³C-markiertem SHa-PrP und der Präparation der Zellmembranen (siehe Kapitel 3.2.15) wurde das „vorgereinigte“ Membranpellet dazu verwendet, einen 3,2 mm Festkörper-NMR-Rotor zu befüllen. Von dieser Probe wurde ein geringer Teil in SDS-Auftragspuffer homogenisiert und per SDS-PAGE und Western Blot auf das Vorhandensein von SHa-PrP^C untersucht.

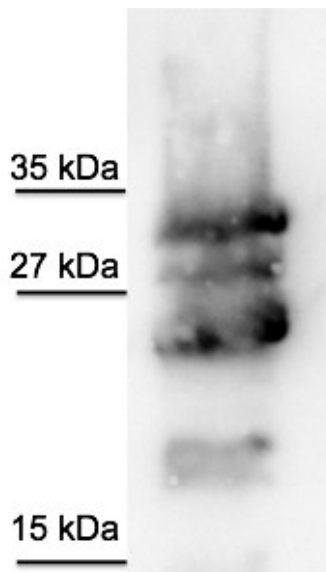


Abbildung 53: Western Blot der ¹³C-SHa-PrP Probe für Festkörper-NMR

Abbildung 53 zeigt den entsprechenden Western Blot mit dem PrP-spezifischen Dreibandemuster im Bereich von ~25 kDa bis ~33 kDa. Zusätzlich ist ein schwächeres immunorektives Signal im Bereich von ~17 kDa sichtbar, das ebenfalls nach der Testexpression (Abbildung 26) und der HPLC-Reinigung (von PrP^C-GPI)(Abbildung 40) zu sehen ist. Durch den Western Blot konnte das Vorhandensein von SHa-PrP in der Festkörper-NMR-Probe nachgewiesen werden. Die Festkörper-NMR-Messungen wurden mit Hilfe von Dr. Henrik Müller im Institut für strukturelle Biochemie (ICS-6) im Forschungszentrum Jülich durchgeführt.

Abbildung 54 zeigt ein 2D-(¹³C-¹³C)-Korrelationsspektrum, in dem Signale rigider Aminosäurereste detektiert wurden. Alle rot markierten Korrelationssignale konnten Aminosäuretyp-spezifisch zugeordnet werden. Darunter befinden sich Alaninreste (A), Serinreste (S), Threoninreste (T) und Isoleucinreste (I).

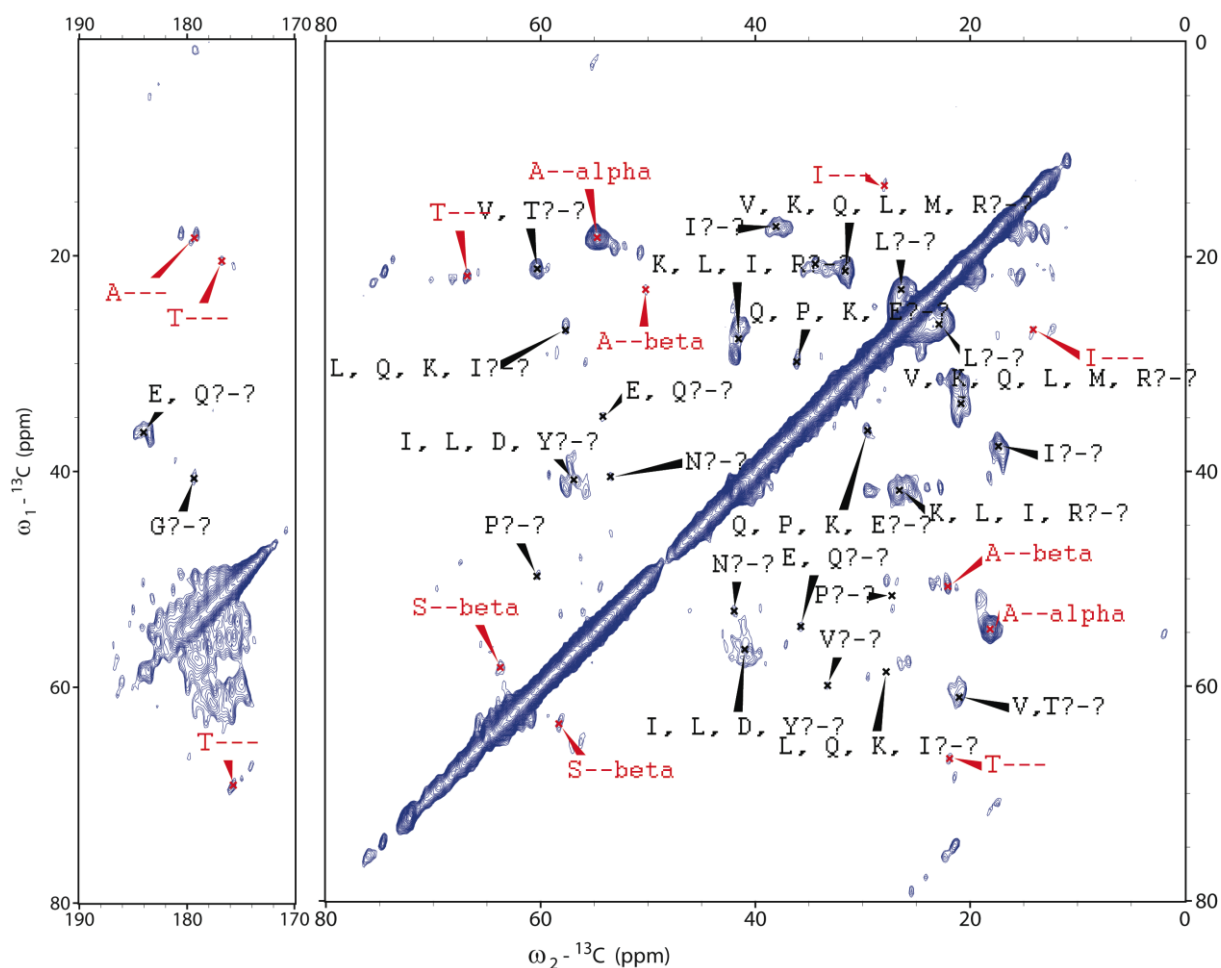


Abbildung 54: 2D-(^{13}C - ^{13}C)-Korrelationsspektrum eines vorgereinigtem PrP^C-GPI-Membranpellets.

Aufgenommen bei einer ^{13}C -Feldstärke von 150 MHz bei 0 °C und 8 kHz MAS. Rot markierte Korrelationssignale konnten Aminosäuretypen zugeordnet werden. Im Fall schwarzer Markierungen konnten die möglichen Aminosäuretypen nur eingegrenzt werden.

Basierend auf den chemischen Verschiebungen der einzelnen Korrelationssignale ist es möglich, sekundäre chemische Verschiebungen zu bestimmen (siehe Formel 5 sowie Tabelle 11). Dabei wird sich zunutze gemacht, dass die chemische Verschiebung eines jeden C_α - und C_β -Atoms von der lokalen Sekundärstruktur abhängig ist. Obwohl ein sequentiell zugeordnetes Minimum an drei aufeinanderfolgenden β -Faltblatt-Resten oder vier aufeinanderfolgenden α -helikalen Resten notwendig ist, um einer bestimmten Sequenzposition einen β -Strang (oder eine α -Helix) zuzuordnen (Wishart *et al.*, 1994), wurden die ermittelten sekundären chemischen Verschiebungen zumindest als Sekundärstruktur tendenz angesehen. Wie in Abbildung 55 dargestellt ist, weisen die Korrelationssignale der Alaninreste sekundäre chemische Verschiebungen typisch für α -helikale und β -Faltblatt-Alanine auf. Sichtbare Serinreste liegen im β -Faltblatt-typischen chemischen Verschiebungsbereich. Die schwarz markierten Korrelationssignale (Abbildung 54) konnten nicht eindeutig einem Aminosäuretyp zugeordnet werden. Die allgemein geringe Anzahl detektierter Korrelationssignale deutet auf

eine zu geringe SHa-PrP^C-Konzentration hin. Schwache Signalintensitäten in Festkörper-NMR-Spektren, die auf einem Magnetisierungstransfer mittels dipolarer Kopplungen beruhen, könnten außerdem ein Hinweis auf eine hohe Flexibilität des untersuchten Proteins sein.

$$(\Delta\delta^{13}\text{C}^\alpha) - (\Delta\delta^{13}\text{C}^\beta)$$

$$\text{mit } (\Delta\delta^{13}\text{C}^\alpha) = (\text{C}_{exp}^\alpha - \text{C}_{rc}^\alpha) \text{ und } (\Delta\delta^{13}\text{C}^\beta) = (\text{C}_{exp}^\beta - \text{C}_{rc}^\beta)$$

Formel 5: Formel zur Berechnung sekundärer chemischer Verschiebungen.

C_{exp}^α : Experimentell bestimmte chemische Verschiebung für C_α

C_{rc}^α : Random coil chemische Verschiebung für C_α

C_{exp}^β : Experimentell bestimmte chemische Verschiebung für C_β

C_{rc}^β : Random coil chemische Verschiebung für C_β

Tabelle 11: Berechnung der sekundären chemischen Verschiebungen.

Berechnungen basieren auf Formel 5. Alle Werte sind in ppm angegeben.

Werte der random coil chemischen Verschiebungen wurden bezogen von

http://www.bmrb.wisc.edu/ref_info/statful.htm

	C_{Exp}^α	C_{Exp}^β	C_{Rc}^α	C_{Rc}^β	$\delta\Delta\text{C}^\alpha$	$\delta\Delta\text{C}^\beta$	Sek. chem. Verschiebung
Ala1	54,7	18,1	53,2	19,2	4,5	-1,1	5,6
Ala2	50,7	22,1	53,2	19,1	-2,5	3	-5,5
Ser	58,3	63,5	58,7	63,7	-0,4	-0,2	-0,6

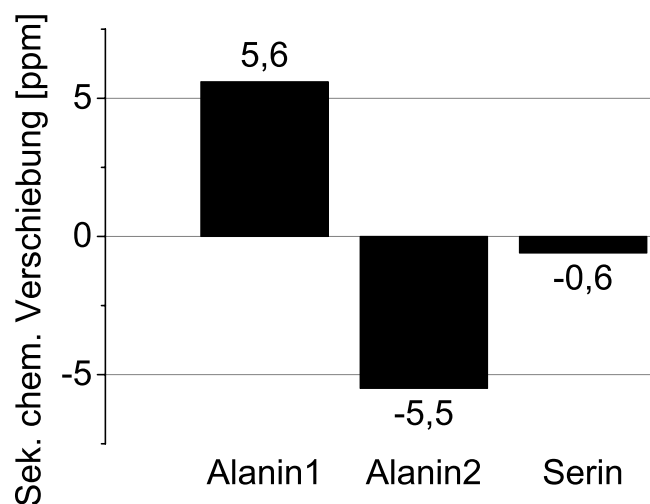


Abbildung 55: Grafische Darstellung der sekundären chemischen Verschiebungen. Positive Werte deuten auf α -helikale, negative Werte auf β -Faltblatt-Strukturelemente hin.

5. Diskussion

Das zelluläre Prion Protein (PrP^C) ist ein membran-assoziiertes Glykoprotein, welches in fast allen Geweben von Säugetieren exprimiert wird. Dabei findet die Interaktion mit der Zellmembran über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI-) Anker statt, der auf der Außenseite der Zellmembran inkorporiert ist. Für die posttranslationale Modifizierung des PrP^C, sind zwei Signalsequenzen, eine am N-terminalen und eine am C-terminalen Ende der Proteinsequenz, notwendig. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung der Expression sowie Reinigung von posttranslational modifiziertem PrP^C in dem eukaryotischen Hefe-Expressionssystem *P. pastoris*. Im Anschluss wurden erste strukturelle Analysen von PrP^C in Lösung (CD-Spektroskopie), sowie membrangebunden (Festkörper-NMR) durchgeführt und schließlich die Bindung von PrP^C an Modellmembranen untersucht.

5.1 Problematik der PrP-Expression in *E. coli*

Ein wichtiger Schritt zur molekularen Analyse des krankheitsassoziierten Umfaltungsprozesses von PrP innerhalb der TSEs ist es, hochauflösende Strukturdaten von PrP^C bzw. PrP^{Sc} zu erhalten. Mit Hilfe dieser Strukturdaten können neue Einblicke in die für den Konversionsprozess entscheidenden Bereiche des Proteins erhalten werden. Bis heute sind mehrere hochaufgelöste Strukturmodelle für PrP verschiedener Organismen veröffentlicht (Lopez Garcia *et al.*, 2000; Riek *et al.*, 1997; Zahn *et al.*, 2000). Voraussetzung für die Flüssig-NMR-Analyse ist eine hohe Konzentration an gereinigtem, löslichem PrP^C. Bisher jedoch konnte voll posttranslational modifiziertes, isotopenmarkiertes PrP^C in NMR-tauglichen Mengen nicht aufgereinigt werden. Daher wurde für die meisten Flüssig-NMR-Analysen in *E. coli* exprimiertes PrP (recPrP) verwendet, welches keine posttranslationalen Modifikationen aufweist. Ebenso wurde dieses für die meisten anderen bisher durchgeführten Experimente genutzt. Somit basiert der Großteil der bisherigen Erkenntnisse über die molekularen Charakteristika und Eigenschaften von PrP auf Analysen mit recPrP. *E. coli* als Expressionssystem besitzt gegenüber anderen Expressionssystemen entscheidende Vorteile. Neben der einfachen Handhabung und dem geringen finanziellen Aufwand, ist *E. coli* in der Lage große Mengen an recPrP zu synthetisieren. Durch Mehlhorn *et al.* wurde die Reinigung von recPrP aus *E. coli* 1996 erstmals beschrieben (Mehlhorn *et al.*, 1996). Nach der

Durchführung einer Größenausschlusschromatografie mit anschließender rpHPLC wurden, ausgehend von 100 g Proteinlysate, Proteinausbeuten von bis zu 54 mg recPrP berichtet. Dabei handelte es sich jedoch nicht um recPrP(23-231), sondern um die N-terminal verkürzte Form recPrP(90-231) (Mehlhorn *et al.*, 1996). Trotz der hohen Proteinausbeute gibt es bei der Verwendung von *E. coli* als Expressionssystem jedoch auch entscheidende Nachteile. Zum einen wird recPrP nicht in löslicher Form exprimiert, zum anderen sind posttranslationale Modifikationen wie Glykosylierungen oder die Modifizierung mittels GPI-Anker in *E. coli* nicht möglich (Vergleich zu anderen Expressionssystemen in Abschnitt 5.9). Die Einschlusskörperchen, in denen recPrP nach der Expression lokalisiert vorliegt, erleichtern die Reinigung von recPrP durch eine räumliche Trennung des Prion Proteins von *E. coli*-spezifischen Proteinen. Jedoch müssen sie denaturierend aufgereinigt werden und das Protein später rückgefaltet werden (Mehlhorn *et al.*, 1996). Weiterhin muss dafür Sorge getragen werden, dass die Disulfidbrücke (Cys¹⁷⁹-Cys²¹⁴) unter oxidativen Bedingungen während der Reinigung korrekt geschlossen wird. Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass die strukturelle Konversion an oder in der Nähe der Zellmembran stattfindet (Taraboulos *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996). Ebenso ist es nicht auszuschließen, dass eine Verankerung in der Zellmembran und damit auch eine räumliche Nähe zu zahlreichen anderen Membranproteinen einen Einfluss auf das Prion Protein aufweist (Morillas *et al.*, 1999).

5.2 Verwendung alternativer Membranverankerungen

Um dem nativen, membranverankerten Zustand von PrP^C näher zu kommen, beschäftigten sich einige Arbeitsgruppen mit Strategien zur alternativen Membranverankerung von recPrP. Dabei wurde recPrP aus *E. coli* auf chemischem Wege am C-Terminus mit einem synthetisch hergestellten GPI-Anker-Analogon kovalent verknüpft. Jedoch sind diese Methoden mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden:

- (i) Die Methoden basieren auf der Verfügbarkeit und der Zugänglichkeit einer freien Thiol-Gruppe am C-terminus des Proteins. Um dies zu erreichen muss die Proteinsequenz modifiziert werden, so dass sie nicht mehr der natürlichen Sequenz entspricht. Dies ist vor allem problematisch wenn dies im strukturell wichtigen C-terminalen Bereich des Proteins stattfindet. Durch Flüssig-NMR-Analysen wurde festgestellt, dass der C-terminale Bereich des PrP eine eindeutige Konformation

aufweist, wohingegen der N-Terminus flexibel ist (Riek *et al.*, 1997). Zudem befindet sich der C-Terminus durch die GPI-Verankerung in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran. Modifikationen im C-terminalen Bereich können die Konformation oder Membran-Protein-Interaktion beeinflussen.

- (ii) Zur Modifikation des Proteins nach der Expression müssen chemische Reaktionen zur kovalenten Verknüpfung der synthetisierten Lipid-Anker durchgeführt werden. Während dieser Reaktionen muss recPrP in Lösung gehalten und die Aggregation des recPrP verhindert werden. Dies ist problematisch, da recPrP eine starke Tendenz zur Aggregation aufweist.
- (iii) Nach erfolgreicher Modifikation muss das Protein erneut gereinigt werden, um überschüssige oder nicht vollständig verknüpfte Reaktanden zu entfernen.
- (iv) Alle artifiziell hergestellten GPI-Anker-Analoga entsprechen in ihrer Zusammensetzung und ihrem Aufbau nicht dem natürlichen GPI-Anker und können zu einem veränderten Einfluss auf die Proteinstruktur führen.

Bezüglich des IV. Punktes wurde kürzlich eine Arbeit von Schumacher *et al.*, (2010) veröffentlicht. In dieser Arbeit wird eine Methode beschrieben, einen Hefe-spezifischen GPI-Anker zu exprimieren (in der Hefe *S. cerevisiae*), diesen über eine TEV-Protease vom Wirtprotein abzuspalten und anschließend aufzukonzentrieren. Der erhaltene GPI-Anker, der über ein N-terminalen Cysteinrest verfügt, kann anschließend mit einem beliebigen Zielprotein, das eine C-terminale Carboxygruppe aufweist, unter Bildung einer Peptidbindung verbunden werden. Auf Grund der gerade erwähnten Schwierigkeiten der nachträglichen, kovalenten Verknüpfung mit Zielproteinen, kann davon ausgegangen werden, dass diese Methode zur Herstellung von isopenmarkiertem PrP, in großen Mengen, nur bedingt geeignet ist. Bezüglich einer möglichst nativen Membranverankerung geht diese Arbeit von Schumacher *et al.* in die richtige Richtung, jedoch konnten wir mit dem in dieser Arbeit etablierten *P. pastoris* Expressionssystem eine effektivere Methode zur Membranverankerung nachweisen (siehe Abschnitt 5.8 und 5.13). Durch die Verwendung der natürlichen PrP-spezifischen Signalsequenzen und der daraus resultierenden posttranslationalen Modifikation des exprimierten PrPs ist das in dieser Arbeit vorgestellte System deutlich näher am nativen Zustand als alle vorherig vorgestellten Methoden.

5.3 Einfluss des GPI-Ankers

Durch die bisher fehlende Möglichkeit, vollständig posttranslational modifiziertes PrP in großem Maßstab herzustellen, zu reinigen und hochauflösende NMR-Strukturanalysen durchzuführen, basiert derzeit der Großteil der publizierten PrP-spezifischen Analysen somit auf nicht posttranslational modifiziertem recPrP. Die posttranslationale Modifikation mit einem GPI-Anker ist jedoch von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese und somit auch für die strukturelle Konversion zu der pathogenen Form PrP^{Sc}. Durch Rogers *et al.* wurde bereits 1993 der Einfluss der GPI-Verankerung auf PrP untersucht. Es wurde eine stark verringerte PrP^{Sc}-Synthese in Scrapie-infizierten Neuroblastomazellen (ScN2a) festgestellt, wenn PrP ohne die C-terminale GPI-Signalsequenz exprimiert wird (Rogers *et al.*, 1993). Durch Taraboulos *et al.* konnte 1995 gezeigt werden, dass sich die PrP-Charakteristika durch Substitution des GPI-Ankers mit einer CD4 Transmembrandomäne verändern (Littman *et al.*, 1987; Taraboulos *et al.*, 1995). Nach Expression in ScN2a-Zellen konnte die Inhibition der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} für PrP-CD4 nachgewiesen werden, während PrP-GPI erfolgreich zu PrP^{Sc} konvertiert wurde. Ebenso wurde festgestellt, dass PrP-CD4 in ein anderes Membrankompartiment transportiert wird, das, im Gegensatz zu Cholesterol und Sphingolipidreichen *lipid rafts*, nach Behandlung mit dem Detergenz Triton X100 löslich ist. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass Gegenwart eines C-terminalen GPI-Ankers und die Lokalisierung in Cholesterolreichen *lipid rafts* von entscheidender Bedeutung für die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} ist.

Außerdem kann einzig GPI-verankertes PrP^C neurotoxische Signale in das Zellinnere weiterleiten, wohingegen durch eine CD4-Transmembranhelix verankertes PrP^C nach Zugabe β -Faltblattreicher Proteine keinen Einfluss auf die Zell-Vitalität aufzeigte (Resenberger *et al.*, 2011).

Diese Arbeiten belegen den Einfluss und Wichtigkeit des GPI-Ankers für den Konversionsprozess von PrP^C zu PrP^{Sc}, woraus die Notwendigkeit resultiert, strukturelle Untersuchungen des posttranslational modifizierten Prion Proteins inklusive seines GPI-Ankers durchzuführen, sowie hochaufgelöste NMR-Strukturdaten zu gewinnen.

5.4 Expression von posttranslational modifiziertem Prion Protein

Das größte Hindernis bezüglich der Durchführung von NMR-Strukturanalysen von PrP^C stellt die Tatsache dar, posttranslational modifiziertes PrP^C in ausreichenden Mengen herzustellen

und zu reinigen. Um die posttranslationale Modifikation des Prion Proteins sicherzustellen, werden eukaryotische Expressionssysteme genutzt, die in der Lage sind, Signalsequenzen zu erkennen und zu prozessieren. Eine der ersten angewandten Methoden war es, PrP^C/PrP^{Sc} aus tierischem Hirngewebe zu isolieren. Da PrP^C jedoch lediglich einen Anteil von 0,1 % des Gesamtproteins im zentralen Nervengewebe ausmacht, ist die Reinigung von PrP^C aus Hamstergehirnen von einer geringen Ausbeute geprägt (Riesner, 2003). Proteinausbeuten von < 5 µg PrP^C pro Gramm Hirngewebe wurden berichtet (Durchschnittliches Gewicht eines Hamstergehirns: 1 g) (Pergami *et al.*, 1996). Dies resultiert in einem unverhältnismäßig hohen Bedarf an Versuchstieren, was neben enormen Kosten und sehr hohem zeitlichem Aufwand ethische Fragestellungen aufwirft. Deshalb wurde ein Expressionssystem etabliert, das die Herstellung von vollständig modifiziertem PrP^C ermöglicht (Blochberger *et al.*, 1997). Dabei wird PrP^C in Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) bis zu 14-fach überexprimiert, wodurch Proteinausbeuten zwischen 6 µg und 10 µg PrP^C pro Gramm CHO-Zellkultur erzielt werden konnten. Allerdings ist auch dieses Expressionssystem, bezogen auf die Proteinausbeute, mit einem hohen zeitlichen und finanziellen Aufwand verbunden.

Das Hefe-Expressionssystem vereint die Vorteile der Expression in *E. coli* mit denen in eukaryotischer Zellkultur (wie CHO-Zellen). Es ermöglicht eine Proteinexpression in relativ kurzer Zeit mit geringem finanziellen und materiellem Aufwand sowie einer hohen Proteinausbeute. Darüberhinaus ermöglicht es die posttranslationale Modifikation eukaryotischer Proteine inklusive Glykosylierungen und GPI-Anker-Synthese (siehe Tabelle 13). Auch die ¹³C- und ¹⁵N-Isotopenmarkierung für spätere NMR-Untersuchungen ist möglich.

5.5 Expression des Prion Proteins in Hefen

Lediglich vier weitere Arbeitsgruppen haben bislang das Hefe-Expressionssystem dazu genutzt, Prion Protein zu exprimieren (siehe Tabelle 12). Dabei nutzten Ma *et al.* und Schumacher *et al.* die Hefe *S. cerevisiae*, Weiss *et al.* sowie Riley *et al.* dagegen die Hefe *P. pastoris*. Weiss *et al.*, (1995) analysierten verschiedene Expressionssysteme für die Expression eines Glutathione S-Transferase-PrP-Fusionsproteins. Neben der Hefe *P. pastoris* wurde das PrP-Fusionsprotein in *E. coli* sowie in bakulovirus-infizierten Insektenzellen exprimiert. Als Proteinkonstrukt wurde das Prion Protein (23-231) des syrischen Goldhamsters genutzt, welches N-terminal mit einem GST-Tag sowie der Signalsequenz der sauren

Phosphatase (*acid phosphatase*) zur Proteinsekretion versehen war. Proteinausbeuten von 2 mg/l Zellkultur konnten jedoch lediglich in letzteren beiden Expressionssystemen erzielt werden. Für PrP, welches in *P. pastoris* exprimiert wurde, wurde eine Proteinausbeute von unter 0,1 mg/l berichtet, jedoch keine Reinigung des Proteins beschrieben (Weiss *et al.*, 1995). Ebenso wurde das Protein nicht wie erwartet in das Kulturmedium sekretiert, sondern vermutlich in Folge einer Interaktion mit der Zellmembran intrazellulär detektiert.

Ma *et al.*, (1999) nutzten die Hefe *S. cerevisiae* um Maus-PrP (23-231) ohne und mit N-terminaler Signalsequenz des Hefe-Proteins Kar2 zu exprimieren. Sie konnten die erfolgreiche Expression von teilweise glykosyliertem PrP^C berichten. Erneut wurde hier das Prion Protein nach einem 250.000 xg Zentrifugationsschritt zum überwiegenden Teil in der Pellet-Fraktion detektiert und als Aggregat beschrieben (Ma *et al.*, 1999).

Schumacher *et al.*, (2010) nutzten das *S. cerevisiae*-System zur Expression des humanen Prion Proteins. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag jedoch nicht auf der Prion Protein-Expression, sondern auf der Synthese und späteren Isolierung des GPI-Ankers. Hierzu modifizierten sie die humane PrP-Sequenz mit den Signalsequenzen zweier Hefe-spezifischer Proteine, Gas1p und Kre5p, und fügten zwischen Proteinsequenz und C-terminaler Signalsequenz einen His-Tag sowie eine TEV-Protease-Schnittstelle ein. Sie schlussfolgerten eine erfolgreiche posttranslationale Modifizierung auf Basis einer immunfluoreszenzmikroskopisch bestimmten Lokalisation des Proteins an der Zellmembran. (Schumacher *et al.*, 2010).

Alle drei genannten Arbeiten weisen jedoch Unterschiede zur nativen Proteinsequenz auf. Die exprimierten Konstrukte verfügen teilweise nur über eine N-terminale Signalsequenz, nicht jedoch über die C-terminale GPI-Anker Signalsequenz (Weiss *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1999), desweiteren wurden keine natürlichen Prion Protein-spezifischen Signalsequenzen verwendet, sondern ausschließlich Signalsequenzen anderer Proteine (Schumacher *et al.*, 2010).

Riley *et al.*, (2002) nutzten *P. pastoris* um humanes PrP zu exprimieren, das über die Signalsequenzen des humanen PrPs verfügt. Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Expression und Charakterisierung von humanen PrP-Dimeren, die über ein Flag-Peptid (DYKDDDDK) miteinander verknüpft sind. PrP wurde korrekt prozessiert. Eine erfolgreiche Glykosylierung sowie die Lokalisation in der Plasmamembran konnte durch Endoglykosidase H-Behandlung und differentielle Zentrifugation gezeigt werden. Desweiteren wurden hohe Ausbeuten an PrP-Fusionsprotein berichtet (50 mg/l Fusionsprotein) (Riley *et al.*, 2002).

Tabelle 12: Auflistung der bisher publizierten PrP-Expressionen in Hefen.
SS: Signalsequenzen

	Expressionssystem	PrP-Sequenz	Signalsequenzen	Sequenzmodifikation
Weiss et al., (1995)	<i>P. pastoris</i>	Syrischer Goldhamster (SHaPrP)	N-Terminal: Pho1-SS	GST-Tag (N-Terminal)
Ma et al., (1999)	<i>S. cerevisiae</i>	Maus (moPrP)	N-Terminal: Kar2-SS	---
Riley et al., (2002)	<i>P. pastoris</i>	Human (huPrP)	N&C-Terminal: huPrP-SS	Flag-Tag (C-terminal)
Schumacher et al., (2010)	<i>S. cerevisiae</i>	Human (huPrP)	N-Terminal: Kre5p C-Terminal: Gas1p	His-Tag Flag-Tag TEV-Schnittstelle (C-Terminal)
Marbach et al., (2013)	<i>P. pastoris</i>	Syrischer Goldhamster (SHaPrP)	N&C-Terminal: SHaPrP-SS	His7-Tag (N-Terminal)

5.6 SHa-PrP exprimiert in *P. pastoris*

Auf Grund der oben genannten Ergebnisse aus dem *P. pastoris*-System wurde dieses als Grundlage für die Expression und Charakterisierung von nativem, posttranslational modifiziertem SHa-PrP gewählt.

In den meisten vorhergehenden Arbeiten wurde die ursprüngliche Aminosäuresequenz entscheidend verändert, so befindet sich das Flag-Peptid der humanen PrP-Dimere innerhalb der Prion Protein-Sequenz, zwischen Aminosäure 227 und 228 in unmittelbarer Nähe zum C-Terminus (Aminosäure 231) und somit zum GPI-Anker (Riley et al., 2002). Auch in den Arbeiten von Schumacher et al. (2010) befindet sich der His-Tag sowie die TEV-Schnittstelle zwischen der PrP-Sequenz und dem C-terminalen GPI-Anker. Da der C-Terminus jedoch auf Grund des GPI-Ankers nah an der Zellmembran lokalisiert ist und somit in Protein-Protein oder Protein-Membran-Interaktionen involviert sein kann, ist es eine kritische Stelle für die Modifikation der PrP-Aminosäuresequenz. Der N-Terminus des Prion Proteins wird jedoch als flexibel beschrieben. Daher wurden für die in dieser Arbeit etablierte Expression und Reinigung unter anderem ein PrP-Konstrukt kloniert, das am flexiblen N-Terminus zwischen der N-terminalen Signalsequenz (1-22) und dem Beginn der SHa-PrP-Sequenz (23-231) einen His7-Tag besitzt (PrP-GPI). Somit kann zum einen ausgeschlossen werden, dass der Tag am C-Terminus einen Einfluss auf die Struktur von PrP und dessen Interaktion mit der Membran aufweist, zum anderen befindet sich der Tag im Hinblick auf Festkörper-NMR-

Strukturanalysen in einem Bereich, der durch seine hohe Flexibilität in den meisten Fällen nicht detektiert und analysiert werden kann. Somit wurde in dieser Arbeit erstmals glykosyliertes und GPI-verankertes SHa-PrP exprimiert, dessen posttranslationale Modifikationen auf der Prozessierung der nativen PrP-spezifischen Signalsequenzen beruhen. Durch die nicht modifizierte oder unterbrochene Sequenz innerhalb des strukturell wichtigen C-terminalen Bereichs eignet sich das PrP-Konstrukt für weitergehende, strukturspezifische Analysen.

5.7 *Prozessierung in P. pastoris*

Die PrP-spezifischen Signalsequenzen wurden in *P. pastoris* erfolgreich erkannt und das Protein korrekt prozessiert. Die PrP-Konstrukte mit Signalsequenzen zeigten nach denaturierender Elektrophorese und folgendem Western Blot das erwartete Muster in Form von diglykosylierten, monoglykosylierten und unglykosylierten Proteinbanden (Abbildung 24). Durch die Behandlung mit der Amidase PNGaseF, welche Asparagin-verknüpfte Zuckerketten abspaltet, konnten die Glykosylierungen bestätigt werden. Das Glykosylierungsmuster ist hierbei vergleichbar mit dem von Riley *et al.* beschriebenen. Dort wird ebenfalls das Dreibandenglykosylierungsmuster nach der Prozessierung der humanen PrP-spezifischen Signalsequenzen beobachtet. Zudem scheint die Ausprägung der Glykosylierungen sehr ähnlich zu sein, was sich in einem ähnlichen Laufverhalten und Laufmuster in der SDS-PAGE niederschlägt. Die 27 kDa, d.h. unglykosylierte, PrP-Bande zeigte eine Aufspaltung in eine Doppelbande (siehe Abbildung 26). Dies wurde bereits durch Ma *et al.*, (1999) beobachtet und dadurch erklärt, dass nicht das gesamte PrP vollständig prozessiert wurde. Die 27 kDa-Bande entspricht nach dieser Deutung der prozessierten, unglykosylierten Isoform des Prion Proteins, die etwas höher laufende Bande entspricht nicht prozessiertem PrP, das nach wie vor die Signalsequenzen trägt. Dies wird auch beim Vergleich der beiden Konstrukte PrP-GPI und PrP Δ SS in Abbildung 26 deutlich. PrP Δ SS umfasst die PrP-Sequenz (23-231) ohne Signalsequenzen, wird somit nicht prozessiert und ist als eine einzige Bande in der SDS-PAGE sichtbar. PrP-GPI, welches über dieselbe Aminosäuresequenz verfügt (zuzüglich den während der Prozessierung abgespaltenen Signalsequenzen), resultiert in dem schon erwähnten Dreibandemuster (wobei sich die unterste Bande in eine Doppelbande aufspaltet). Die 27 kDa-Bande des PrP-GPI, welcher der prozessierten, unglykosylierten Bande entspricht, läuft auf derselben Höhe wie die Bande des nicht prozessierten PrP Δ SS. Der minimale Laufunterschied

hin zu höherem Molekulargewicht kann mit dem angefügten GPI-Anker erklärt werden. Somit kann die obere der 27 kDa-Doppelbande der unprozessierten Proteinsequenz des PrP-GPI-Konstrukts zugeordnet werden.

Vergleicht man die Banden des in *P. pastoris* exprimierten PrP mit denen von PrP exprimiert in CHO-Zellen fällt auf, dass posttranslational modifiziertes CHO-PrP ein höheres Molekulargewicht von 34 kDa-38 kDa aufweist im Gegensatz zu 24 kDa-34 kDa im *P. pastoris*-System. Desweiteren ist in *P. pastoris* ein deutliches, präzises Dreibandemuster erkennbar im Gegensatz zu einem diffuseren Bandenmuster von CHO-PrP^C (Blochberger *et al.*, 1997; Stohr *et al.*, 2011). Der Molekulargewichtsunterschied wurde bereits bei dem Vergleich von CHO-PrP zu PrP, isoliert aus Hamstergehirnen, von Elfrink (2005) beschrieben und beruht auf den unterschiedlichen Glykosylierungsmustern in unterschiedlichen Spezies (Elfrink, 2005). In dieser Arbeit konnte somit die posttranslationale Prozessierung und Modifikation von SHa-PrP in *P. pastoris* gezeigt werden.

5.8 Lokalisation des prozessierten Prion Proteins in der Zellmembran

Bereits Riley *et al.*, (2002) beschrieben die Lokalisation von posttranslational modifiziertem PrP in *P. pastoris*. Nach differentieller Zentrifugation konnten sie PrP in der Membranfraktion nachweisen und zogen daraus die Schlussfolgerung, dass die Membranlokalisation auf die Verankerung mittels GPI-Anker zurückzuführen ist. Wie in dieser Arbeit jedoch gezeigt wurde, ist PrP Δ SS, welches über keinen GPI-Anker verfügt, ebenso in der unlöslichen Membranfraktion lokalisiert. Dies stellt die Schlussfolgerung in Frage, dass die Membranlokalisation GPI-Anker vermittelt ist. Die Membranlokalisation nach differentieller Ultrazentrifugation von PrP-GPI, sowie PrP Δ SS deutet auf vorherige Aggregation des PrP hin. Ma *et al.* beschrieben 1999 bereits einen aggregierten PrP^{Sc}-ähnlichen, PK-resistenten Zustand, wenn PrP ohne Signalsequenz in *S. cerevisiae* exprimiert wurde. Das in *P. pastoris* exprimierte PrP weist jedoch keine Anzeichen von PK-Resistenz auf, was durch einen Proteinase K-Verdau verifiziert werden konnte (siehe Abbildung 29). Diesen Ergebnissen zufolge muss davon ausgegangen werden, dass zumindest PrP Δ SS nach differentieller Zentrifugation durch Aggregation in der Membranfraktion nachzuweisen ist. Ob die Aggregation während der Proteinexpression stattfindet, oder erst nach der Expression, z.B. durch eine zu hohe PrP-Konzentration in der Zelle, ist nicht bekannt und wurde in dieser Arbeit nicht analysiert.

Um eine eindeutige Aussage über die korrekte Prozessierung der Signalsequenzen, der damit verbundenen posttranslationalen Modifikation und dem Transport zur Zellmembran zu erhalten, wurde das grün fluoreszierende Protein als lösliches Modellprotein verwendet. Durch Western-Blot-Analyse der Lokalisation von GFP ohne bzw. mit Signalsequenzen im löslichen Überstand bzw. der unlöslichen Membranfraktion (GFP Δ SS/GFP-GPI) konnte eine korrekte Prozessierung der Signalsequenzen und eine Modifikation des GFP mittels GPI-Anker nachgewiesen werden (siehe Abbildung 30). Zusätzlich dazu zeigen Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen, dass GFP ohne Signalsequenzen im Zytoplasma der Zelle, GFP mit Signalsequenzen in der Membran von *P. pastoris*-Zellen lokalisiert ist (Abbildung 31). Auch eine Immunfluoreszenzanalyse von PrP-GPI mit Signalsequenzen zeigte dasselbe Ergebnis, eine Lokalisation von PrP an der Zellmembran (Abbildung 32). Dieses Ergebnis geht einher mit den Immunfluoreszenzanalysen von Schumacher *et al.*, (2010) die ebenfalls eine ringförmige Verteilung des prozessierten PrP in der Zellmembran nachwies. Die Immunfluoreszenzanalyse von PrP Δ SS zeigte im Gegensatz zu GFP Δ SS keine gleichmäßige Verteilung im Zytoplasma der Hefezelle, sondern eine Akkumulation von PrP an einer distinkten Position innerhalb der Zelle. Ob es sich dabei um ein spezielles Zellkompartiment handelt bedarf weiterer Analysen. Zumindest PrP Δ SS scheint somit in der Hefezelle in aggregiertem Zustand vorzuliegen. Dass es sich bei PrP-GPI anders verhält ist ein guter Hinweis darauf, dass PrP in membranverankertem Zustand eine geringere Tendenz zur Aggregation zeigt und stabiler ist. Zumindest scheint die Restriktion durch die Membranverankerung eine Aggregation von PrP-GPI zu unterbinden.

Durch diese Ergebnisse konnte belegt werden, dass das Prion Protein mit natürlichen, spezifischen Signalsequenzen erfolgreich in *P. pastoris* exprimiert werden kann. Dabei werden die Signalsequenzen erkannt und prozessiert, und PrP korrekt glykosyliert und mit einem GPI-Anker modifiziert. Die GPI-Anker-vermittelte Lokalisation des Prion Proteins in der Zellmembran konnte nachgewiesen werden.

5.9 Vergleich der Prion Protein Expressionssysteme

Durch die Etablierung der Prion Protein Expression in dem Hefesystem *P. pastoris* X-33 in dieser Arbeit können die Vorzüge bzw. Nachteile der verschiedenen, häufig genutzten PrP-Expressionssysteme vergleichend diskutiert werden (siehe Tabelle 13). Das meist verwendete Expressionssystem ist das bakterielle *E. coli*-Expressionssystem (Mehlhorn *et al.*, 1996),

gefolgt von der Expression in eukaryotischen Zelllinien, wie den CHO-Zellen (Blochberger *et al.*, 1997). Wie in Tabelle 13 dargelegt, zeichnet sich das *E. coli*-System vor allem durch seinen geringen finanziellen, sowie zeitlichen Aufwand aus. Bakterien weisen eine sehr hohe Wachstumsrate auf, so dass zwischen dem Animpfen der Hauptkultur und der Zellernte nach Induktion der Proteinexpression oftmals weniger als 24 Stunden liegen. Zudem ist die Zusammensetzung des Kulturmediums (LB-Medium) im Vergleich zum eukaryotischen Zellkulturmedium relativ simpel. Es werden keine teuren Zusätze wie nicht essentielle Aminosäuren, Natriumpyruvat, Fungizone, Nukleotidlösung usw. benötigt (Elfrink, 2005), was zu einem geringen finanziellen Aufwand des *E. coli*-Systems führt. Desweiteren ist die ^{13}C - ^{15}N -isotopenmarkierung für NMR-Strukturanalysen ein etabliertes Verfahren (Marley *et al.*, 2001; Tong *et al.*, 2012), wohingegen es in eukaryotischen Zelllinien auf Grund der komplexen Zusammensetzung des Kulturmediums eine Herausforderung darstellt (Dutta *et al.*, 2012). Im Vergleich zur Expression in *E. coli* (bis zu 50 mg recPrP aus 100 g Proteinlysat nach Kultivierung im Bioreaktor (Mehlhorn *et al.*, 1996)) ist die Ausbeute an posttranslational modifiziertem PrP^C in CHO-Zellen mit Ausbeuten von bis zu 10 µg CHO-PrP aus 1 g Zellkulturpellet um einen Faktor 50 geringer, weshalb sich CHO-Zelllinien nicht zur Expression von PrP in großem Maßstab (mg-Bereich für NMR-Analysen) eignen. Was jedoch einen entscheidenden Nachteil des *E. coli*-Systems darstellt, ist die nicht vorhandene Fähigkeit zur posttranslationalen Modifikation exprimierter Proteine, was gerade für das Prion Protein (siehe Abschnitt 5.1 und 5.3) ein wichtiges Merkmal darstellt. Dies jedoch können eukaryotische Zelllinien bewerkstelligen. Durch die Fähigkeit Signalsequenzen zu erkennen, zu prozessieren und Proteine posttranslational zu modifizieren ist das in CHO-Zellen exprimierte CHO-PrP^C deutlich näher am nativem Zustand als recPrP. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, vereint das *P. pastoris*-System die Vorteile der Expression in CHO-Zellkultur und *E. coli* und kompensiert damit die jeweiligen Nachteile der Expressionssysteme (siehe Tabelle 13). Wie *E. coli* benötigt *P. pastoris* kein komplexes Kulturmedium (siehe Abschnitt 2.3) und die ^{13}C - ^{15}N -isotopenmarkierung ist ebenfalls ein etabliertes Verfahren (Pickford *et al.*, 2004; Sugiki *et al.*, 2012). Anders als *E. coli* benötigt das hier etablierte Expressionsprotokoll in *P. pastoris* vom Animpfen der Hauptkultur bis zur Zellernte nach Proteinexpression ca. 72 Stunden. Dies ist 48 Stunden mehr als im *E. coli*-System, allerdings im Vergleich zu mehreren Wochen in der CHO-Zellkultur durchaus akzeptabel. Über dies hinaus ist *P. pastoris* in der Lage Signalsequenzen zu erkennen und zu prozessieren, was bisher den entscheidenden Vorteil der CHO-Zellkultur darstellte. Im Gegensatz zur CHO-Zellkultur konnten im *P. pastoris*-System PrP^C-Ausbeuten von 5 mg pro Liter Zellkultur erreicht werden, was einer Steigerung

an posttranslational modifiziertem PrP^C um einen Faktor 500 entspricht (bezogen auf die Ausbeute von 10 µg CHO-PrP^C aus einem Gramm CHO-Zellkultur). Dabei muss beachtet werden, dass sich die Ausbeuten nur sehr schwer vergleichen lassen, da CHO-Zellen adherent wachsende Zellen sind und nicht in Suspensionslösung wachsen. Somit stellt es einen erheblich größeren Aufwand dar 1 g CHO-Zellpellet zu generieren, als 1 l *P. pastoris*-Zellkultur. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich mit dem *P. pastoris*-System in einem erheblich kürzerem Zeitraum, mit weniger finanziellen Kosten verbunden, deutlich mehr posttranslational modifiziertes PrP^C herstellen lässt. Aufgrund der gerade genannten Vorteile und der lediglich um 48 Stunden verlängerten Kultivierungszeit gegenüber *E. coli* kann das *P. pastoris*-Expressionssystem die Nachteile der anderen beiden Systeme kompensieren.

Tabelle 13: Vergleich verschiedener PrP-Expressionssysteme

	Expression in eukaryotischen CHO-Zellen	Expression in <i>E. coli</i>	Expression in <i>P. pastoris</i>
Finanzieller Aufwand	↓ ↓	↑ ↑	↑
Zeitlicher Aufwand	↓ ↓	↑ ↑	↑
Ähnlichkeit zum humanen System	↑ ↑	↓	↑
Protein-Ausbeuten	↓ ↓	↑	↑ ↑
Isotopenmarkierung	↓	↑ ↑	↑ ↑
Posttranslationale Modifikationen	↑ ↑	↓ ↓	↑ ↑
GPI-Anker	↑ ↑	↓ ↓	↑ ↑
Glykosylierungen	↑ ↑	↓ ↓	↑

5.10 Reinigung von posttranslational modifiziertem PrP aus *P. pastoris*

Das hier etablierte Expressionssystem liefert einen guten Ausgangspunkt zur Reinigung des in *P. pastoris* posttranslational modifizierten Prion Proteins. Die PrP-Reinigung aus *E. coli* mittels His-Tag ist bereits etabliert und erfolgt, ausgehend von *inclusion bodies*, denaturierend in 6 M Guanidinhydrochlorid über eine IMAC, gefolgt von einem rpHPLC-Schritt (Luers *et al.*, 2013).

Da sowohl PrP-GPI als auch PrP Δ SS über einen N-terminalen His₇-Tag verfügen, konnte dieselbe Reinigungsstrategie, ausgehend von der zuvor präparierten Membranfraktion, genutzt werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich in *P. pastoris* exprimiertes PrP Δ SS, genauso denaturierend mittel IMAC reinigen lässt wie in *E. coli* exprimiertes PrP (Reinigung modifiziert nach Luers *et al.*, 2013). PrP-GPI hingegen zeigte lediglich eine äußerst schwache Bindung an die Ni-NTA-Säule, wenn es denaturierend mit 6 M GdnHCl gereinigt wurde. Aufgrund dergleichen Proteinsequenz kann die unzureichende Bindung von PrP-GPI an die Ni-NTA-Säule nur durch die zusätzlichen Glykosylierungen bzw. den GPI-Anker hervorgerufen werden. Obwohl die Proteinfaltung nach Expression in Hefezellen nicht bekannt ist, sich der GPI-Anker jedoch am PrP-C-Terminus befindet, ist es anzunehmen, dass der His₇-Tag durch die Glykosylierungen verdeckt wird und somit weitestgehend unzugänglich ist. Aus vorherigen Membransolubilisierungsanalysen (siehe Abschnitt 4.7.1) war bekannt, dass sich PrP-GPI nur durch 6 M Guanidiniumhydrochlorid, oder durch die Solubilisierung mit 1 % SDS aus der Zellmembran herauslösen lässt und in Lösung gehalten werden kann. Im Gegensatz zur Verwendung von Guanidiniumhydrochlorid konnte mit SDS als Detergenz erfolgreich die Reinigung von PrP-GPI gezeigt werden. PrP-GPI bindet in Gegenwart von SDS sehr spezifisch an die Ni-NTA-Säule und kann ohne sichtbare Verunreinigungen von der Säule eluiert werden (Abbildung 40). Mit Hilfe des nachfolgenden rpHPLC-Schrittes konnten die Puffersubstanzen, sowie die Detergenz vom Protein getrennt werden und reines PrP-GPI erhalten werden (Abbildung 46). Die Ausbeute an gereinigtem, posttranslational modifiziertem Prion Protein liegt bei ungefähr 5 mg PrP^C pro Liter Expressionskultur (Ein Liter *P. pastoris*-Expressionskultur resultiert in 10 g - 15 g Zellpellet). Im Vergleich zu 5 µg PrP^C aus einem Gramm Hamstergehirn bzw. 10 µg PrP^C aus einem Gramm CHO-Zellpellet ist dies eine Verbesserung um den Faktor 500-1000 (bezogen auf 1 l *P. pastoris* Expressionskultur). Bezogen auf 1 g *P. pastoris*-Zellpellet ist es eine Steigerung um den Faktor 40-80.

5.11 Auftretende Proteindegradation

In Abbildung 46 sind nach der Aufreinigung neben den erwarteten drei Proteinbanden, entsprechend der drei Isoformen, auch zwei zusätzliche Banden erkennbar. Dabei handelt es sich wahrscheinlich bei einer Bande um das vorher schon erwähnte unprozessierte Protein im Bereich von 27 kDa, bei der untersten 17 kDa-Bande jedoch ist die Herkunft unklar. Da der Nachweis mit PrP-spezifischen monoklonalen Antikörpern erfolgte, muss es sich bei der Bande

um ein Prion Protein Fragment handeln. Das Molekulargewicht von ca. 17 kDa könnte auf eine N-Terminal verkürzte PrP-Form hindeuten. Ein 17 kDa Polypeptid wurde als auftretendes Degradationsprodukt bereits beschrieben (Ma *et al.*, 1999; Taraboulos *et al.*, 1995). Die Degradation scheint dabei im Zusammenhang mit der Lokalisation in definierten Membrandomänen (*lipid rafts*) und der *turnover*-Rate zu stehen. Bei welchem Schritt der Reinigung das Polypeptid entsteht ist jedoch unklar. Eine massenspektrometrische Analyse könnte hier nähere Informationen über das degradierte PrP bereitstellen. Ma *et al.*, (1999) konnten ebenfalls niedermolekulare PrP-Banden nach Expression in *S cerevisiae* detektieren, gingen jedoch nicht näher auf diese ein. Während einiger Expressionen sind weitere niedermolekulare, PrP-spezifische Banden detektierbar (Abbildung 49). Bei diesen ist sehr deutlich das Dreibandemuster zu erkennen, welches zu niedrigerem Molekulargewicht hin verschoben ist. Es bedarf weiterer Untersuchungen um festzustellen, ob es sich bei den Banden um eine N-terminale Degradation des Proteins handelt und das Protein-Expressionsmuster aus diesem Grund zu niedrigerem Molekulargewicht hin verschoben ist. Bisher ist unklar wann und unter welchen Bedingungen die Degradationen auftreten. Es wurden verschiedene Methoden zur Vermeidung der auftretenden Proteindegradation angewendet, von der direkten Reinigung, ohne vorherige Lagerung des Zellpellets, oder unterschiedlichen Temperaturen während der Reinigung (Raumtemperatur oder 15 °C, < 10 °C ist die Reinigung auf Grund des Ausfallens von SDS nicht möglich.), jedoch blieben alle Versuche erfolglos. Eine mögliche Erklärung könnte im Zusammenhang mit der verwendeten Detergenz SDS stehen. Durch die Solubilisierung und nachfolgende Verdünnung der Probe von 1 % SDS auf 0,1 % SDS ist das Volumen der auf die Ni-NTA-Säule zu ladenden PrP-Probe sehr groß. Da SDS unter 10 °C nicht löslich ist, befindet sich PrP mehrere Stunden bei Raumtemperatur im SDS-haltigen Membran-Aufschluss-Puffer. Huang *et al.*, (2007) konnten nachweisen, dass SDS Chymotrypsin, Trypsin und Caspase-Aktivitäten induzieren kann (Huang *et al.*, 2007). Um dies näher zu untersuchen, muss jedoch vorerst festgestellt werden, ob die Degradation während der Expression oder erst nachfolgend während der Proteinreinigung auftritt.

5.12 Sekundärstrukturanalyse des Prion Proteins aus *P. pastoris*

Da die Funktion von PrP^C unbekannt ist, ist es nicht möglich, gereinigtes PrP mittels eines Aktivitätstests auf seine korrekte Funktion und Faltung zu überprüfen. Eine häufig genutzte

Methode zur Überprüfung der Sekundärstruktur von PrP ist die Zirkulardichroismusspektroskopie. Mit Hilfe dieser Methode konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das gereinigte Prion Protein nach Lyophilisierung und Aufnahme in Aq. dest. (pH ca. 5) bzw. in Natriumphosphatpuffer (10 mM NaPi, 250 mM NaCl, pH 7,4, 0,1 % SDS) ein großteils α -helikales Spektrum aufweist, was durch ein Minimum bei 208 nm und einer Schulter bei ca. 220 nm charakterisiert ist. Im Vergleich mit Ergebnissen von Stöhr *et al.*, (2011), die auf Zirkulardichroismus-Analysen von CHO-PrP^C basieren, kann ein übereinstimmendes Spektrum festgestellt werden (Stöhr *et al.*, 2011). Dabei entsprechen die hier gezeigten Spektren in Aq. dest. bzw. Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % SDS den dort beobachteten Spektren in Phosphatpuffer (pH 7,2) mit 0,05 % SDS. Sie zeigten ebenfalls ein α -helikales Spektrum des CHO-PrP^C mit einem Minima bei 208 nm und einer Schulter bei 220 nm. Bei abnehmender SDS-Konzentration zeigten sie eine Änderung des CD-Spektrums zu einem β -Faltblatt dominierten Spektrum.

Die verringerte Intensität, trotz gleicher Proteinkonzentration, des hier gezeigten CD-Spektrums der PrP-Probe in Natriumphosphatpuffer mit 0,1 % SDS im Vergleich zum PrP-CD-Spektrum in Aq. dest., kann ein Hinweis darauf sein, dass Teile des PrP in Natriumphosphatpuffer bereits aggregiert vorlagen. Somit befanden sie sich nicht mehr im Detektionsvolumen der CD-Messung, woraus die verminderte Signalintensität resultieren könnte. Um dies zu überprüfen könnte nach der CD-Messung ein Zentrifugationsschritt bei 100.000 xg durchgeführt werden, um lösliches PrP von bereits aggregiertem zu trennen. Das ein Teil des PrP in Natriumphosphatpuffer bereits aggregiert sein könnte, wird zudem durch die Ergebnisse der Solubilisierungsanalysen bestärkt (siehe Abbildung 48), in denen PrP in Aq. dest. die höchste Löslichkeit aufweist, in Natriumphosphatpuffer hingegen eine deutlich verminderte Löslichkeit zeigt.

5.13 Rekonstitution von PrP^C in Modellmembranen

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Expression und Reinigung von posttranslational modifiziertem PrP, um Ausgangsmaterial für Strukturanalysen mit membranverankertem PrP zu erhalten. Auch wenn durch Immunfluoreszenzanalysen an PrP^C und durch Verwendung von GFP als Modellprotein eindeutige Hinweise auf die korrekte Prozessierung und Funktionalität der verwendeten Signalsequenzen vorliegen, fehlt der direkte Nachweis des GPI-Ankers. Da das Prion Protein vollständig posttranslational modifiziert gereinigt werden konnte, bestand die

Möglichkeit, das Protein in Modellmembranen zu rekonstituieren. Vorhergehende Arbeiten konnten bereits die GPI-Anker-vermittelte Interaktion von CHO-PrP^C mit *raft-like*-Liposomen beschreiben (Elfrink, 2005; Elfrink *et al.*, 2007; Gruening, 2010). In den Arbeiten wurde gezeigt, dass CHO-PrP^C mit *raft-like*-Liposomen interagiert. Es wurde CHO-PrP^C mit *raft-like*-Lipiden in einem molaren Verhältnis von 1:80.000/1:45.000/1:20.000/1:0 (PrP:Lipid) inkubiert und anschließend eine Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass mit zunehmender Lipidkonzentration CHO-PrP^C in der *raft-like* Liposomenfraktion akkumuliert. Daraus wurde schlußgefolgert, dass die CHO-PrP^C-Liposomenbindung von der Stöchiometrie abhängig ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass recPrP(29-231) ohne GPI-Anker keine Bindung an *raft-like*-Liposomen aufwies (Elfrink *et al.*, 2007). Während dieser Arbeit wurde, auf den Vorarbeiten basierend, die Rekonstitution von in *P. pastoris* exprimierten PrP^C in *raft-like* Liposomen etabliert (siehe Abschnitt 4.10). Bei einem molaren Verhältnis von PrP^C zu *raft-like* Lipiden von 1:80.000 konnte nach Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation die Lokalisation von PrP^C in den Liposomenfraktionen und somit Bindung des PrP^C an den Liposomen nachgewiesen werden. PrP^C ohne die Anwesenheit von Liposomen ist hingegen nach Dichtegradientenzentrifugation vollständig in der Pelletfraktion zu finden. Unter Rücksichtnahme der vorherigen Arbeiten, die ebenfalls mit SHa-PrP^C, exprimiert in CHO-Zellen, durchgeführt wurden, kann die Bindung des PrP^C aus *P. pastoris* an *raft-like* Liposomen als GPI-Ankers vermittelt angesehen werden. Zur weiteren Bestätigung des Resultates sollte das Experiment mit PrP^{ΔSS}, ebenfalls exprimiert in *P. pastoris*, durchgeführt werden. Jedoch deuten die PrP-Liposomen-Rekonstitutionsergebnisse zusammen mit den vorherigen Immunfluoreszenzerggebnissen (PrP-Lokalisation an der Zellmembran von *P. pastoris*-Zellen) auf die Modifikation des PrP mittels GPI-Anker hin.

5.14 Festkörper-NMR-Analyse von membranverankertem PrP

Da nachgewiesen werden konnte, dass PrP^C über den GPI-Anker in der Hefe-Zellmembran inkorporiert ist, lag es nahe, direkt die Hefe-Zellmembran als Probe für eine erste Festkörper-NMR-Analyse zu nutzen. Durch die Solubilisierungsanalysen (siehe Abschnitt 4.7.1) war bekannt, dass PrP-GPI sich lediglich durch die denaturierende Detergenz GdnHCl, bzw. die anionische, ebenfalls denaturierende Detergenz SDS aus der Zellmembran lösen lässt, nicht jedoch durch andere, milde Detergenzien. Dies wurde in dieser Arbeit genutzt um ¹³C-markiertes PrP-GPI in der Zellmembran anzureichern und ein Festkörper-NMR-Spektrum

aufzunehmen. Wie gezeigt werden konnte, war es möglich, erste Signale zu detektieren, wovon einige wenige Korrelationssignale Aminosäurespezifisch zugeordnet werden konnten. Durch Analyse sekundärer chemischer Verschiebungen konnten außerdem erste Aussagen über die lokalen Sekundärstrukturmerkmale dieser Aminosäuren getroffen werden. Dabei konnten den Korrelationssignalen der zugeordneten Alanine α -helikale sowie β -Faltblatt typische sekundäre, chemische Verschiebungen zugeordnet werden, die Serine zeigten hingegen nur β -Faltblatt typische sekundäre, chemische Verschiebungen. Es wurden noch weitere Korrelationssignale detektiert, die jedoch nicht zugeordnet werden konnten.

Eine höhere PrP-GPI-Konzentration in der Zellmembran und verlängerte Messzeiten können durchaus mehr Informationen liefern. Dadurch würden alle rigiden Aminosäurereste sichtbar und man könnte deutlich mehr Korrelationssignale aminosäure-spezifisch zuordnen. Hieraus würde sich ein deutlich detaillierteres Bild hinsichtlich der Verteilung an Sekundärstrukturelementen (α -Helix – β -Faltblatt) ergeben, welches eventuell sogar mit CD-Strukturdaten verglichen werden könnte. Durch die Herstellung zusätzlicher Proben und Analyse weiterer Spektren könnte eine detaillierte Strukturanalyse von membranverankertem PrP^C durchgeführt werden.

5.15 Ausblick

Das in dieser Arbeit beschriebene und etablierte Expressionssystem für vollständig posttranslational modifiziertes Prion Protein bietet eine hervorragende Basis für die zukünftige Herstellung, Reinigung und strukturelle Charakterisierung von nativem PrP^C. Erstmals ist es möglich, GPI-verankertes, glykosyliertes PrP^C in kurzer Zeit in ausreichend großen Mengen herzustellen um effektive Strukturanalysen von membranverankertem Prion Protein durchzuführen. Das *P. pastoris*-System bietet die Möglichkeit die Vorteile der *E. coli*-Expression und der CHO-Zellkultur zu vereinen und gleichzeitig den zeitlichen und finanziellen Aufwand zu vermindern. Es können sowohl die Interaktion des glykosylierten Prion Proteins mit Modellmembranen untersucht werden, als auch mit weiteren Interaktionspartnern wie z.B. A β (Resenberger *et al.*, 2011). Weiterhin kann das so hergestellte PrP^C in Konversionsassays eingesetzt werden. Durch die hier gezeigte Bindung von PrP-GPI an Lipidvesikel (Abbildung 52) werden neue Möglichkeiten zur Analyse der Strukturmerkmale von GPI-verankertem Prion Protein eröffnet. So besteht z.B. die Möglichkeit Sekundärstrukturmerkmale von liposomenverankertem PrP-GPI mittels

Zirkulardichroismusspektroskopie zu untersuchen. Dies ist jedoch mit enormen Herausforderungen verbunden, da eine sehr hohe Proteinkonzentration in Liposomen benötigt wird. Eine andere Methode, die bereits erfolgreich zur Untersuchung mittels Flüssig-NMR-Spektroskopie von Membranproteinen angewendet wird, ist die Rekonstitution von PrP-GPI in Nanodiscs (Gluck *et al.*, 2009). In hier nicht gezeigten Vorversuchen konnten bereits erste Rekonstitutionsexperimente von PrP-GPI in Nanodiscs erfolgreich durchgeführt werden.

Von großer Wichtigkeit ist jedoch die nun entstandene Möglichkeit zur hochauflösenden NMR-Strukturanalyse von posttranslational modifiziertem PrP. Neben den *E. coli*-PrP-NMR-Strukturen (Riek *et al.*, 1996; Riek *et al.*, 1997) konnten bisher nur Hornemann *et al.*, (2004) als einzige ein 1D-¹H-NMR Spektrum von glykosyliertem, jedoch nicht GPI-verankertem Rinder-PrP aufnehmen. Mit Hilfe dieses Expressionssystems können die bisher bestehenden Hindernisse, verursacht durch zu niedrige Ausbeuten an posttranslational modifiziertem PrP^C, überwunden werden. Hieraus eröffnen sich erstmals Möglichkeiten zur Interaktionsstudie und Strukturanalyse, für welche große Mengen an vollständig modifiziertem, gereinigtem Prion Protein notwendig sind.

Literaturverzeichnis

Aguzzi A, Calella AM (2009) Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev* **89**: 1105-1152

Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* **214**: 764-766

Alper T, Haig DA, Clarke MC (1966) The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochemical and biophysical research communications* **22**: 278-284

Baldus MP, A.; Herzfeld, J.; Griffin, R. (1998) Cross polarization in the tilted frame: assignment and spectral simplification in heteronuclear spin systems. *Mol Phys* **95**: 1197-1207

Baron GS, Caughey B (2003) Effect of glycosylphosphatidylinositol anchor-dependent and -independent prion protein association with model raft membranes on conversion to the protease-resistant isoform. *The Journal of biological chemistry* **278**: 14883-14892

Bennett AR, C.; Griffiths, J.; Zhen, W.; Lansbury, P.; Griffin, R. (1998) Homonuclear radio frequency-driven recoupling in rotating solids. *J Chem Phys* **108**: 9463-9479

Betmouni S, Perry VH, Gordon JL (1996) Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience* **74**: 1-5

Blochberger TC, Cooper C, Peretz D, Tatzelt J, Griffith OH, Baldwin MA, Prusiner SB (1997) Prion protein expression in Chinese hamster ovary cells using a glutamine synthetase selection and amplification system. *Protein Eng* **10**: 1465-1473

Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB (1982) Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* **218**: 1309-1311

Bornert O, Alkhalfioui F, Logez C, Wagner R (2012) Overexpression of membrane proteins using *Pichia pastoris*. *Current protocols in protein science / editorial board, John E Coligan [et al]* **Chapter 29**: Unit 29 22

Brahms S, Brahms J (1980) Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol* **138**: 149-178

Breydo L, Sun Y, Makarava N, Lee CI, Novitskaia V, Bocharova O, Kao JP, Baskakov IV (2007) Nonpolar substitution at the C-terminus of the prion protein, a mimic of the glycosylphosphatidylinositol anchor, partially impairs amyloid fibril formation. *Biochemistry* **46**: 852-861

Brown DA, London E (1997a) Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochemical and biophysical research communications* **240**: 1-7

Brown DR (1999) Prion protein expression aids cellular uptake and veratridine-induced release of copper. *J Neurosci Res* **58**: 717-725

Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H (1997b) The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature* **390**: 684-687

Brown DR, Schmidt B, Kretzschmar HA (1997c) Effects of oxidative stress on prion protein expression in PC12 cells. *Int J Dev Neurosci* **15**: 961-972

Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM (1999) Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *The Biochemical journal* **344 Pt 1**: 1-5

Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* **389**: 498-501

Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* **73**: 1339-1347

Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C (1992) Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* **356**: 577-582

Caughey B, Race RE, Ernst D, Buchmeier MJ, Chesebro B (1989) Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol* **63**: 175-181

Cereghino GP, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Current opinion in biotechnology* **13**: 329-332

Cereghino GP, Cregg JM (1999) Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis. *Current opinion in biotechnology* **10**: 422-427

Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews* **24**: 45-66

Chandler RL (1961) Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet* **1**: 1378-1379

Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, et al. (1985) Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature* **315**: 331-333

Cho HJ (1976) Is the scrapie agent a virus? *Nature* **262**: 411-412

Chu NK, Becker CF (2013) Recombinant expression of soluble murine prion protein for C-terminal modification. *FEBS letters* **587**: 430-435

Cohen FE, Prusiner SB (1998) Pathologic conformations of prion proteins. *Annual review of biochemistry* **67**: 793-819

Colby DW, Prusiner SB (2011) De novo generation of prion strains. *Nat Rev Microbiol* **9**: 771-777

Connolly T, Gilmore R (1989) The signal recognition particle receptor mediates the GTP-dependent displacement of SRP from the signal sequence of the nascent polypeptide. *Cell* **57**: 599-610

Creutzfeldt HG (1920) Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Ges Neurol Psychiatry* **57**: 1-18

Cuillè J. CP-L (1936) La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *Comptes Rendus Acad Sci* **203**: 1552-1554

Daly R, Hearn MT (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of molecular recognition : JMR* **18**: 119-138

Damasceno LM, Pla I, Chang HJ, Cohen L, Ritter G, Old LJ, Batt CA (2004) An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* **37**: 18-26

Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, Bax A (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of biomolecular NMR* **6**: 277-293

Dietzsch C, Spadiut O, Herwig C (2011) A fast approach to determine a fed batch feeding profile for recombinant *Pichia pastoris* strains. *Microbial cell factories* **10**: 85

Diringer H, Beekes M, Oberdieck U (1994) The nature of the scrapie agent: the virus theory. *Ann N Y Acad Sci* **724**: 246-258

Dodelet VC, Cashman NR (1998) Prion protein expression in human leukocyte differentiation. *Blood* **91**: 1556-1561

Donne DG, Viles JH, Groth D, Mehlhorn I, James TL, Cohen FE, Prusiner SB, Wright PE, Dyson HJ (1997) Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231):

the N terminus is highly flexible. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 13452-13457

Dumpitak C (2003) Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Polysacchariden und alterungsassozierten Proteinmodifikationen bei Prionen. Dissertation Thesis, Physikalische Biologie Heinrich Heine Universität Düsseldorf,

Dutta A, Saxena K, Schwalbe H, Klein-Seetharaman J (2012) Isotope labeling in mammalian cells. *Methods in molecular biology* **831**: 55-69

Eberl H, Tittmann P, Glockshuber R (2004) Characterization of recombinant, membrane-attached full-length prion protein. *The Journal of biological chemistry* **279**: 25058-25065

Elfrink (2005) Zelluläres Prion Protein aus CHO-Zellen: Strukturelle Umwandlung und Mechanismus der Einlagerung in raft-ähnliche Lipidmembranen. Dissertation Thesis, Physikalische Biologie Heinrich Heine Universität Düsseldorf,

Elfrink K, Nagel-Steger L, Riesner D (2007) Interaction of the cellular prion protein with raft-like lipid membranes. *Biological chemistry* **388**: 79-89

Elfrink K, Riesner, D. (2004) *Purification of PrPC. Methods and tools in Biosciences and Medicine: Techniques in Prion Research*: Birkhäuser Verlag Basel.

Englund PT (1993) The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annual review of biochemistry* **62**: 121-138

Faber KN, Harder W, Ab G, Veenhuis M (1995) Review: methylotrophic yeasts as factories for the production of foreign proteins. *Yeast* **11**: 1331-1344

Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M (1966) Experimental transmission of a Kuru-like syndrome to chimpanzees. *Nature* **209**: 794-796

Gluck JM, Wittlich M, Feuerstein S, Hoffmann S, Willbold D, Koenig BW (2009) Integral membrane proteins in nanodiscs can be studied by solution NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* **131**: 12060-12061

Goncalves AM, Pedro AQ, Maia C, Sousa F, Queiroz JA, Passarinha LA (2013) Pichia pastoris: a recombinant microfactory for antibodies and human membrane proteins. *Journal of microbiology and biotechnology* **23**: 587-601

Gorlich D, Hartmann E, Prehn S, Rapoport TA (1992) A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* **357**: 47-52

Gorodinsky A, Harris DA (1995) Glycolipid-anchored proteins in neuroblastoma cells form detergent-resistant complexes without caveolin. *The Journal of cell biology* **129**: 619-627

Gray F, Chretien F, Adle-Biassette H, Dorandeu A, Ereau T, Delisle MB, Kopp N, Ironside JW, Vital C (1999) Neuronal apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **58**: 321-328

Griffith JS (1967) Nature of the Scrapie Agent: Self-replication and Scrapie. *Nature* **215**: 1043 - 1044

Gruening (2010) Biophysikalische Charakterisierung des Einflusses des Prion Proteins auf Membranen. Master Thesis Thesis, Physikalische Biologie Heinrich Heine Universität Düsseldorf,

Ha S, Wang Y, Rustandi RR (2011) Biochemical and biophysical characterization of humanized IgG1 produced in Pichia pastoris. *mAbs* **3**: 453-460

Hadlow WJ (1959) Scrapie and kuru. *Lancet* **ii**: 289-290

Hamilton SR, Gerngross TU (2007) Glycosylation engineering in yeast: the advent of fully humanized yeast. *Current opinion in biotechnology* **18**: 387-392

Hay B, Barry RA, Lieberburg I, Prusiner SB, Lingappa VR (1987) Biogenesis and transmembrane orientation of the cellular isoform of the scrapie prion protein [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1987 May;7(5):2035]. *Mol Cell Biol* **7**: 914-920

Heise H, Kohler FH, Xie X (2001) Solid-state NMR spectroscopy of paramagnetic metallocenes. *J Magn Reson* **150**: 198-206

Hicks MR, Gill AC, Bath IK, Rullay AK, Sylvester ID, Crout DH, Pinheiro TJ (2006) Synthesis and structural characterization of a mimetic membrane-anchored prion protein. *FEBS J* **273**: 1285-1299

Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KC, Gowland I, Collinge J, Doey LJ, Lantos P (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature* **389**: 448-450, 526

Hornemann S, Schorn C, Wuthrich K (2004) NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. *EMBO Rep* **5**: 1159-1164

Hornshaw MP, McDermott JR, Candy JM (1995) Copper binding to the N-terminal tandem repeat regions of mammalian and avian prion protein. *Biochemical and biophysical research communications* **207**: 621-629

Hosszu LL, Baxter NJ, Jackson GS, Power A, Clarke AR, Waltho JP, Craven CJ, Collinge J (1999) Structural mobility of the human prion protein probed by backbone hydrogen exchange. *Nat Struct Biol* **6**: 740-743

Huang L, Ho P, Chen CH (2007) Activation and inhibition of the proteasome by betulinic acid and its derivatives. *FEBS letters* **581**: 4955-4959

Ikezawa H (2002) Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Biological & pharmaceutical bulletin* **25**: 409-417

Imran M, Mahmood S (2011) An overview of human prion diseases. *Virology journal* **8**: 559

Ironside JW (1998) Neuropathological findings in new variant CJD and experimental transmission of BSE. *FEMS Immunol Med Microbiol* **21**: 91-95

Jackson GS, Murray I, Hosszu LL, Gibbs N, Waltho JP, Clarke AR, Collinge J (2001) Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 8531-8535

Jeffrey M, Goodsir CM, Bruce ME, McBride PA, Fraser JR (1997) In vivo toxicity of prion protein in murine scrapie: ultrastructural and immunogold studies. *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**: 93-101

Kaneko K, Vey M, Scott M, Pilkuhn S, Cohen FE, Prusiner SB (1997) COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 2333-2338

Kellings K, Meyer N, Mirenda C, Prusiner SB, Riesner D (1992) Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J Gen Virol* **73 (Pt 4)**: 1025-1029

Kretschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ (1986) Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* **122**: 1-5

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lasmezas CI, Deslys JP, Demaimay R, Adjou KT, Lamoury F, Dormont D, Robain O, Ironside J, Hauw JJ (1996) BSE transmission to macaques. *Nature* **381**: 743-744

Le Pichon CE, Valley MT, Polymenidou M, Chesler AT, Sagdullaev BT, Aguzzi A, Firestein S (2009) Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice. *Nat Neurosci* **12**: 60-69

Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB (2004) Synthetic mammalian prions. *Science* **305**: 673-676

Leopoldt JD (1759) Einleitung zu der Landwirtschaft. *Christian Friedrich Günthern, Berlin Gronau*

Li P, Anumanthan A, Gao XG, Ilangoan K, Suzara VV, Duzgunes N, Renugopalakrishnan V (2007) Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied biochemistry and biotechnology* **142**: 105-124

Lin Cereghino GP, Lin Cereghino J, Sunga AJ, Johnson MA, Lim M, Gleeson MA, Cregg JM (2001) New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. *Gene* **263**: 159-169

Littman DR, Gettner SN (1987) Unusual intron in the immunoglobulin domain of the newly isolated murine CD4 (L3T4) gene. *Nature* **325**: 453-455

Liu H, Farr-Jones S, Ulyanov NB, Llinas M, Marqusee S, Groth D, Cohen FE, Prusiner SB, James TL (1999) Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90-231). *Biochemistry* **38**: 5362-5377

Lopez Garcia F, Zahn R, Riek R, Wuthrich K (2000) NMR structure of the bovine prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 8334-8339

Luers (2013) Biophysikalische Charakterisierung der spontanen und keiminduzierten Fibrillogenese des humanen Prion-Proteins im Hinblick auf die Untersuchung der Speziesbarriere. Dissertation Thesis, Physikalische Biologie Heinrich Heine Universität Düsseldorf,

Luers L, Bannach O, Stohr J, Wordehoff MM, Wolff M, Nagel-Steger L, Riesner D, Willbold D, Birkmann E (2013) Seeded fibrillation as molecular basis of the species barrier in human prion diseases. *PloS one* **8**: e72623

- Ma J, Lindquist S (1999) De novo generation of a PrPSc-like conformation in living cells. *Nat Cell Biol* **1**: 358-361
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey LM (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* **22**: 249-270
- Madore N, Smith KL, Graham CH, Jen A, Brady K, Hall S, Morris R (1999) Functionally different GPI proteins are organized in different domains on the neuronal surface. *The EMBO journal* **18**: 6917-6926
- Malaga-Trillo E, Solis GP, Schrock Y, Geiss C, Luncz L, Thomanetz V, Stuermer CA (2009) Regulation of embryonic cell adhesion by the prion protein. *PLoS Biol* **7**: e55
- Marbach J, Zentis P, Ellinger P, Muller H, Birkmann E (2013) Expression and characterisation of fully posttranslationally modified cellular prion protein in *Pichia pastoris*. *Biological chemistry* **394**: 1475-1483
- Marley J, Lu M, Bracken C (2001) A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. *Journal of biomolecular NMR* **20**: 71-75
- Marsh RF, Kimberlin RH (1975) Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology, and pathogenesis. *J Infect Dis* **131**: 104-110
- Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ, 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 : a journal of neurology* **104**: 559-588
- Matlack KE, Mothes W, Rapoport TA (1998) Protein translocation: tunnel vision. *Cell* **92**: 381-390

McConville MJ, Ferguson MA (1993) The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. *The Biochemical journal* **294 (Pt 2)**: 305-324

McKinley MP, Bolton DC, Prusiner SB (1983) A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* **35**: 57-62

Mehlhorn I, Groth D, Stockel J, Moffat B, Reilly D, Yansura D, Willett WS, Baldwin M, Fletterick R, Cohen FE, Vandlen R, Henner D, Prusiner SB (1996) High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry* **35**: 5528-5537

Mehrpour M, Codogno P (2010) Prion protein: From physiology to cancer biology. *Cancer Lett* **290**: 1-23

Meyer DI, Dobberstein B (1980) Identification and characterization of a membrane component essential for the translocation of nascent proteins across the membrane of the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology* **87**: 503-508

Morillas M, Swietnicki W, Gambetti P, Surewicz WK (1999) Membrane environment alters the conformational structure of the recombinant human prion protein. *The Journal of biological chemistry* **274**: 36859-36865

Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* **40**: 735-746

Olschewski D, Seidel R, Miesbauer M, Rambold AS, Oesterhelt D, Winklhofer KF, Tatzelt J, Engelhard M, Becker CF (2007) Semisynthetic murine prion protein equipped with a GPI anchor mimic incorporates into cellular membranes. *Chem Biol* **14**: 994-1006

Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, Mehlhorn I, Huang Z, Fletterick RJ, Cohen FE, et al. (1993) Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the

formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 10962-10966

Panza (2009) Spontane und keiminduzierte Fibrillogenese des Prion-Proteins und ihr Zusammenhang mit der Spezies-Barriere. Dissertation Thesis, Physikalische Biologie Heinrich Heine Universität Düsseldorf,

Pergami P, Jaffe H, Safar J (1996) Semipreparative chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form. *Analytical biochemistry* **236**: 63-73

Pickford AR, O'Leary JM (2004) Isotopic labeling of recombinant proteins from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Methods in molecular biology* **278**: 17-33

Pike LJ (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res* **44**: 655-667

Pohlschroder M, Prinz WA, Hartmann E, Beckwith J (1997) Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* **91**: 563-566

Potgieter TI, Cukan M, Drummond JE, Houston-Cummings NR, Jiang Y, Li F, Lynaugh H, Mallem M, McKelvey TW, Mitchell T, Nylén A, Rittenhour A, Stadheim TA, Zha D, d'Anjou M (2009) Production of monoclonal antibodies by glycoengineered *Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology* **139**: 318-325

Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* **216**: 136-144

Prusiner SB (1998) Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 13363-13383

Prusiner SB, Groth DF, Bolton DC, Kent SB, Hood LE (1984) Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* **38**: 127-134

- Prusiner SB, Groth DF, McKinley MP, Cochran SP, Bowman KA, Kasper KC (1981a) Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 4606-4610
- Prusiner SB, McKinley MP, Bowman KA, Bolton DC, Bendheim PE, Groth DF, Glenner GG (1983) Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* **35**: 349-358
- Prusiner SB, McKinley MP, Groth DF, Bowman KA, Mock NI, Cochran SP, Masiarz FR (1981b) Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**: 6675-6679
- Ramon A, Marin M (2011) Advances in the production of membrane proteins in *Pichia pastoris*. *Biotechnology journal* **6**: 700-706
- Resenberger UK, Harmeier A, Woerner AC, Goodman JL, Muller V, Krishnan R, Vabulas RM, Kretschmar HA, Lindquist S, Hartl FU, Multhaup G, Winklhofer KF, Tatzelt J (2011) The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of beta-sheet-rich conformers independent of prion replication. *The EMBO journal* **30**: 2057-2070
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K (1996) NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* **382**: 180-182
- Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K (1997) NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS letters* **413**: 282-288
- Riesner D (2002) Molecular basis of prion diseases. *J Neurovirol* **8 Suppl 2**: 8-20
- Riesner D (2003) Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc). *Br Med Bull* **66**: 21-33
- Riesner D, Kellings K, Post K, Wille H, Serban H, Groth D, Baldwin MA, Prusiner SB (1996) Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *J Virol* **70**: 1714-1722

Riesner D, Kellings K, Wiese U, Wulfert M, Miranda C, Prusiner SB (1993) Prions and nucleic acids: search for "residual" nucleic acids and screening for mutations in the PrP-gene. *Dev Biol Stand* **80**: 173-181

Riley ML, Leucht C, Gauczynski S, Hundt C, Brecej M, Dodson G, Weiss S (2002) High-level expression and characterization of a glycosylated covalently linked dimer of the prion protein. *Protein Eng* **15**: 529-536

Rogers M, Yehiely F, Scott M, Prusiner SB (1993) Conversion of truncated and elongated prion proteins into the scrapie isoform in cultured cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 3182-3186

Ross CA, Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine* **10 Suppl**: S10-17

Safar JG, Kellings K, Serban A, Groth D, Cleaver JE, Prusiner SB, Riesner D (2005) Search for a prion-specific nucleic acid. *J Virol* **79**: 10796-10806

Sanders SL, Whitfield KM, Vogel JP, Rose MD, Schekman RW (1992) Sec61p and BiP directly facilitate polypeptide translocation into the ER. *Cell* **69**: 353-365

Sarramegna V, Muller I, Mousseau G, Froment C, Monsarrat B, Milon A, Talmont F (2005) Solubilization, purification, and mass spectrometry analysis of the human mu-opioid receptor expressed in *Pichia pastoris*. *Protein expression and purification* **43**: 85-93

Schumacher MC, Resenberger U, Seidel RP, Becker CF, Winklhofer KF, Oesterhelt D, Tatzelt J, Engelhard M (2010) Synthesis of a GPI anchor module suitable for protein post-translational modification. *Biopolymers* **94**: 457-464

Shyng SL, Moulder KL, Lesko A, Harris DA (1995) The N-terminal domain of a glycolipid-anchored prion protein is essential for its endocytosis via clathrin-coated pits. *The Journal of biological chemistry* **270**: 14793-14800

Soto C, Estrada LD (2008) Protein misfolding and neurodegeneration. *Archives of neurology* **65**: 184-189

Stahl N, Baldwin MA, Burlingame AL, Prusiner SB (1990) Identification of glycoinositol phospholipid linked and truncated forms of the scrapie prion protein. *Biochemistry* **29**: 8879-8884

Stahl N, Baldwin MA, Hecker R, Pan KM, Burlingame AL, Prusiner SB (1992) Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry* **31**: 5043-5053

Stahl N, Baldwin MA, Teplow DB, Hood L, Gibson BW, Burlingame AL, Prusiner SB (1993) Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* **32**: 1991-2002

Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB (1987) Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell* **51**: 229-240

Steele AD, Emsley JG, Ozdinler PH, Lindquist S, Macklis JD (2006) Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 3416-3421

Stöhr (2007) Biophysikalische Charakterisierung des Vorläufer- und Endzustandes von Fibrillen aus rekombinanten und natürlichen Prion- Proteinen. Dr. rer. nat. Thesis, Physikalische Biologie - Heinrich Heine Universität Düsseldorf,

Stohr J, Elfrink K, Weinmann N, Wille H, Willbold D, Birkmann E, Riesner D (2011) In vitro conversion and seeded fibrillization of posttranslationally modified prion protein. *Biological chemistry* **392**: 415-421

Sugiki T, Ichikawa O, Miyazawa-Onami M, Shimada I, Takahashi H (2012) Isotopic labeling of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris* and *Kluyveromyces lactis*. *Methods in molecular biology* **831**: 19-36

Szeverenyi NMS, M.J.; Maciel, G.E. (1982) Observation of spin exchange by two-dimensional fourier transform C-13 cross polarization-magic-angle spinning. *J Magn Reson* **47**: 462–475

Taraboulos A, Scott M, Semenov A, Avrahami D, Laszlo L, Prusiner SB (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *The Journal of cell biology* **129**: 121-132

Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* **380**: 639-642

Tong KI, Yamamoto M, Tanaka T (2012) Selective isotope labeling of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Methods in molecular biology* **896**: 439-448

Udenfriend S, Kodukula K (1995) How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made. *Annual review of biochemistry* **64**: 563-591

Vanniasinghe AS, Bender V, Manolios N (2009) The potential of liposomal drug delivery for the treatment of inflammatory arthritis. *Semin Arthritis Rheum* **39**: 182-196

Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A, Prusiner SB (1996) Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 14945-14949

Wang F, Wang X, Yuan CG, Ma J (2010) Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein. *Science* **327**: 1132-1135

Wang TY, Leventis R, Silvius JR (2000) Fluorescence-based evaluation of the partitioning of lipids and lipidated peptides into liquid-ordered lipid microdomains: a model for molecular partitioning into "lipid rafts". *Biophysical journal* **79**: 919-933

- Wang Z, Stalcup LD, Harvey BJ, Weber J, Chloupkova M, Dumont ME, Dean M, Urbatsch IL (2006) Purification and ATP hydrolysis of the putative cholesterol transporters ABCG5 and ABCG8. *Biochemistry* **45**: 9929-9939
- Wegner GH (1990) Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS microbiology reviews* **7**: 279-283
- Weiss S, Famulok M, Edenhofer F, Wang YH, Jones IM, Groschup M, Winnacker EL (1995) Overexpression of active Syrian golden hamster prion protein PrPc as a glutathione S-transferase fusion in heterologous systems. *J Virol* **69**: 4776-4783
- Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R (1987) A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec* **121**: 419-420
- Wilesmith JW, Wells GA, Cranwell MP, Ryan JB (1988) Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec* **123**: 638-644
- Wishart DS, Sykes BD (1994) The ¹³C chemical-shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical-shift data. *Journal of biomolecular NMR* **4**: 171-180
- Zahn R, Liu A, Luhrs T, Riek R, von Schroetter C, Lopez Garcia F, Billeter M, Calzolari L, Wider G, Wuthrich K (2000) NMR solution structure of the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 145-150

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Dieter Willbold und Prof. Dr. Henrike Heise danken, die mir die Möglichkeit eröffnet haben, meine Dissertation am Institut für Physikalische Biologie anzufertigen sowie für die immer zuverlässige, unkomplizierte Hilfe bei auftretenden Problemen und Fragestellungen.

Bei Dr. Eva Birkmann möchte ich mich besonders bedanken für die Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe, der Hilfe in schwierigen Phasen der Dissertation, sowie für die wissenschaftlichen Diskussionen.

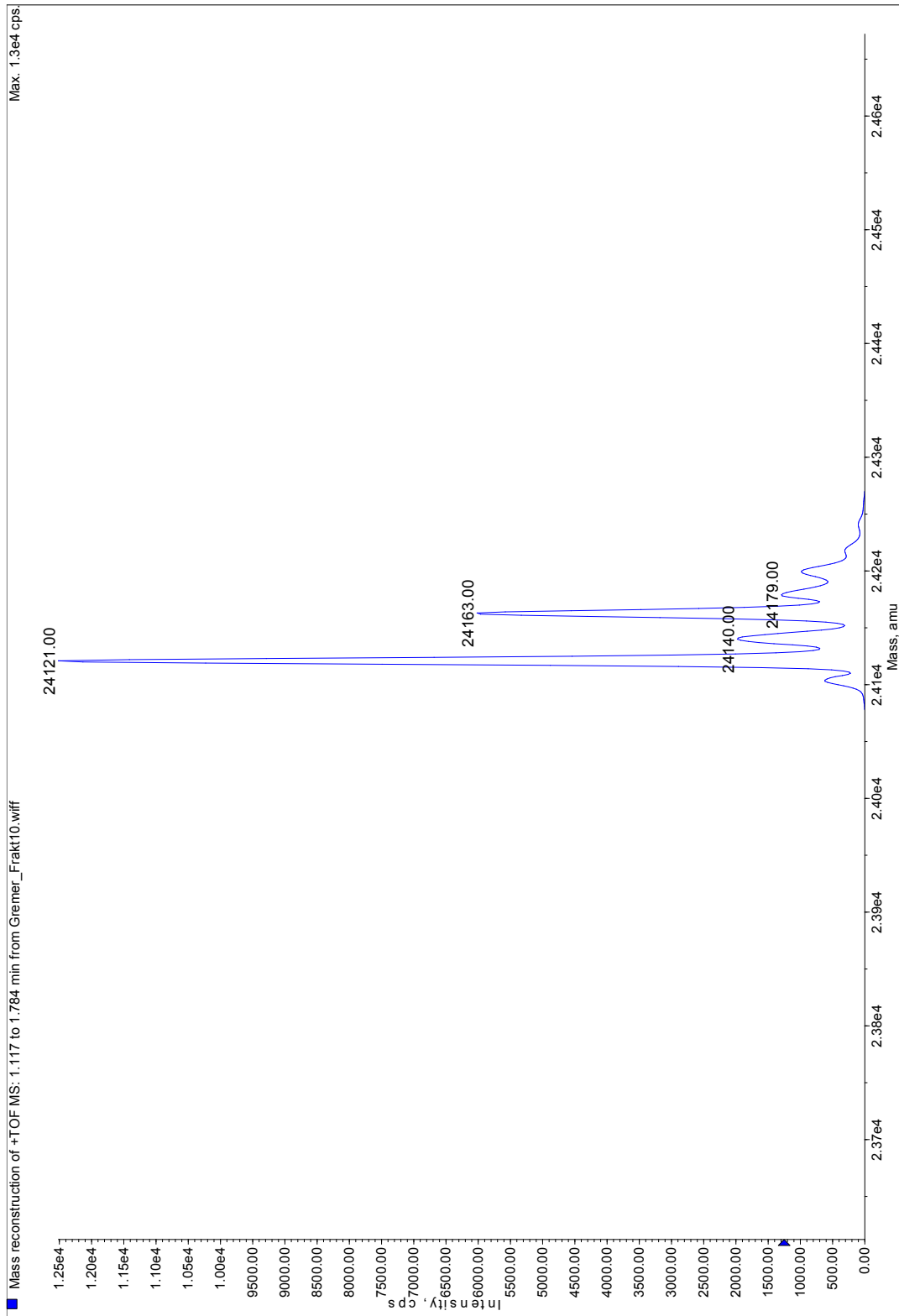
Besonderer Dank gilt auch Dr. Lars Luers, Dr. Henrik Müller, Dr. Lothar Gremer, Dr. Philipp Ellinger, Dr. Oliver Bannach, Dr. Dennis Tielker, Peter Zentis, Clara Grüning, Michael Wördehoff, Steffen Hübinger und Timo Piechatzek für die hilfreichen Diskussionen und zielführenden Hinweise und Hilfestellungen.

Mein Dank gilt auch allen übrigen Mitgliedern des Instituts für Physikalische Biologie.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Verantwortlichen der Graduiertenschule BioStruct für die Aufnahme in die Forschungsschule, die Finanzierung der Promotionsstudien und die zusätzliche Ausbildung in strukturellen Methoden bedanken, allen voran Prof. Dr. Dieter Willbold, Prof. Dr. Lutz Schmitt und Dr. Cordula Kruse. Ganz besonderer Dank gilt selbstverständlich meiner Familie und nicht zuletzt Dr. Charlotte Heller.

Anhang

PrPASS, Fraktion 12,7 Minuten, deconvolviert



PrPASS, Fraktion 13,3 Minuten, deconvolviert

