

Zelluläres Prion Protein aus CHO-Zellen:

Strukturelle Umwandlung und Mechanismus der Einlagerung in raft-ähnliche Lipidmembranen

Inaugural - Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Kerstin Elfrink

aus Hilden

Düsseldorf

2005

Angefertigt im

Institut für Physikalische Biologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Abgabedatum

06. Juni 2005

Tag der mündlichen Prüfung

07. November 2005

Betreuer:

Prof. Dr. D. Riesner

2. Gutachter:

Prof. Dr. P. Jahns

Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, 06. Juni 2005

Kerstin Elfrink

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abkürzungsverzeichnis	IV
	Abbildungsverzeichnis	V
1	Einleitung	1
1.1	Transmissible Spongiforme Enzephalopathien	1
1.1.1	Scrapie	1
1.1.2	Bovine Spongiforme Enzephalopathie	2
1.1.3	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	3
1.2	Molekulare Grundlagen	3
1.2.1	Eigenschaften des Erregers	3
1.2.2	Strukturelle Eigenschaften des Prion Proteins	5
1.2.3	Biosynthese des zellulären Prion Proteins	7
1.2.4	Funktion des zellulären Prion Proteins	8
1.3	<i>In vitro</i>-Konversion	10
1.4	Hypothesen zur Prion-Replikation	12
1.5	Fragestellung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Chemikalien	17
2.2	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	17
2.3	Lipidstammlösungen	18
2.3.1	Zusammensetzung raft ähnlicher Lipidvesikel	18
2.3.2	Zusammensetzung und Nachweis fluoreszenzmarkierter Vesikel	19
2.4	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	19
2.5	Silberfärbung von Proteingelen	20
2.6	Dot-Blot	20
2.7	Semi-Dry-Blot (Westernblot)	21
2.8	Immunologischer Proteinnachweis	21
2.9	Proteinkonzentrationsbestimmung (Micro-BCA-Test)	22

2.10	CHO-Zellkultur	22
2.10.1	Selektions- und Amplifikationssystem	23
2.10.2	CHO-Zellkulturmedium	24
2.10.3	Zellkultur-Stabilate	24
2.11	Reinigung des CHO-PrP^C	25
2.11.1	Solubilisierung des CHO-PrP ^C	25
2.11.2	Kupfer-immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographie (Cu ²⁺ -IMAC)	25
2.11.3	Immunopurifikation	26
2.11.4	Aufkonzentrierung	27
2.12	Enzymatische Behandlungen	27
2.12.1	Abspaltung der N-Glykosylierungen	27
2.12.2	Verdauung mit Proteinase K	27
2.13	Löslichkeitsbestimmung durch differentielle Zentrifugation	28
2.14	Circular Dichroismus- (CD-) Spektroskopie	28
2.15	Herstellung kleiner unilamellarer Vesikel (SUV)	29
2.15.1	Methodik der Vesikelherstellung	30
2.16	Präparative Ultrazentrifugation	30
2.17	Elektronenmikroskopie	31
2.17.1	Präparatherstellung für das TEM	31
2.17.2	Negativkontrastierung des Präparates	31
2.18	Kinetische Untersuchung von Oberflächenaffinitäten	32
2.18.1	Das Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz (SPR)	32
2.18.2	Totalreflexion und evaneszentes Feld	32
2.18.3	Anregung nicht-strahlender Oberflächenplasmonen durch abgeschwächte Totalreflexion	34
2.18.4	Kretschmann-Konfiguration	35
2.18.5	Messprinzip und Aufbau des Biacore	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Reinigung von PrP^C aus CHO-Zellkultur	38
3.1.1	Charakterisierung der Reinigungsschritte	39
3.1.1.1	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)	39
3.1.1.2	Immunopurifikation	40
3.1.2	Optimierung der CHO-PrP ^C -Reinigung	41

3.2	CHO-PrP^C-Konversion	43
3.2.1	Induktion der Konversion durch Verdünnung der SDS-Konzentration	43
3.2.2	Induktion der Konversion durch SDS-Zugabe	44
3.2.3	Vergleich der strukturellen Konversion von CHO-PrP ^C induziert durch Verdünnung, bzw. Zugabe von SDS	46
3.2.4	Konversion unter Ausbildung partieller Proteinase K-Resistenz	47
3.3	Untersuchung der CHO-PrP^C-Membran-Wechselwirkung	49
3.3.1	Herstellung kleiner unilamellarer Vesikel	49
3.3.2	Rekonstitution von CHO-PrP ^C in raft ähnliche Lipidvesikel (RLV)	51
3.3.3	Kinetische Analyse der Bindung von CHO-PrP ^C an Lipidbilayer	54
3.3.3.1	Präparation eines Lipidbilayers	55
3.3.3.2	Die Bindung von CHO-PrP ^C an raft ähnliche Modellmembranen wird durch den GPI-Anker vermittelt	56
3.3.3.3	Das Gleichgewicht der CHO-PrP ^C -Membran-Wechselwirkung wird durch multiple Injektionen erreicht	60
3.3.3.4	Bestimmung der kinetischen Konstanten der Bindung von CHO-PrP ^C an Modellmembranen	64
4	Diskussion	71
4.1	Reinigung von PrP^C aus CHO-Zellkultur	71
4.2	Identifikation verschiedener CHO-PrP^C-Populationen unterschiedlicher Kupferaffinität	73
4.3	<i>In vitro</i> Konversion von CHO-PrP^C	74
4.3.1	Induktion der strukturellen Konversion von CHO-PrP ^C	74
4.3.2	Induktion partieller Proteinase K-Resistenz von CHO-PrP ^C	78
4.4	Rekonstitution von CHO-PrP^C in Modellmembranen	82
4.5	Das Zwei-Phasen-Modell der Konversion von CHO-PrP^C	86
4.6	Ausblick	88
5	Zusammenfassung	90
6	Literaturverzeichnis	92

Abkürzungsverzeichnis

BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
CD	Circular Dichroismus
CHO-Zellen	chinesische Hamster Ovarien Zellen
CHO-PrP ^C	in CHO-Zellen exprimierte zelluläre Form des Prion Proteins
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
DMPC	Di-Myristoyl-Phosphatidylcholin
DOPE-CF	Di-Oleoyl-Phosphatidylethanolamin (Carboxyfluorescein markiert)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GdnHCl	Guanidinium-Hydrochlorid
GPI-Anker	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker
IMAC	immobilisierte Metallchelate Affinitätschromatographie
LUV	große unilamellare Vesikel
MLV	multilamellare Vesikel
PK	Proteinase K
PNGase F	Peptid-N ⁴ -(N-acetyl-β-glucosaminy)-Asparagin-Amidase
PrP	Prion Protein
PrP ^C	zelluläre Form des Prion Proteins
PrP ^{Sc}	krankheitsassoziierte Form des Prion Proteins
PrP 27-30	Proteinase K-resistentes Fragment der krankheitsassoziierten Form des Prion Proteins
PrP ^{0/0} -Mäuse	PrP- <i>knock-out</i> -Mäuse
rekPrP(x-y)	in <i>E. coli</i> exprimierte Form des Prion Proteins der Sequenz von Aminosäure x bis Aminosäure y
RLV	raft ähnliche Lipidvesikel
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHa	syrischer Goldhamster
SOD	Superoxid-Dismutase
SUV	kleine unilamellare Vesikel
SPR	Oberflächenplasmonresonanz
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Einleitung

Tab. 1.1	Überblick und Nomenklatur der Prionkrankheiten	2
Abb. 1.1	PK-Resistenz von PrP ^{Sc}	5
Tab. 1.2	Vergleich der strukturellen und physikalisch-chemischen Eigenschaften der beiden Prion Protein Isoformen PrP ^{Sc} und PrP ^C	6
Abb. 1.2	Struktureller Vergleich von PrP ^C und PrP ^{Sc}	6
Abb. 1.3	Biosynthese von PrP ^C	7
Abb. 1.4	Schematische Darstellung von PrP ^C	9
Abb. 1.5	<i>In vitro</i> -Konversion	11
Abb. 1.6	Heterodimer-Replikationsmodell	13
Abb. 1.7	Modell der keiminduzierten Polymerisation	14
Abb. 1.8	Zwei-Phasen-Modell	15

Material und Methoden

Abb. 2.1	CD-Spektren typischer Sekundärstrukturelemente von Proteinen	29
Abb. 2.2	Mechanismus der Vesikelbildung	30
Abb. 2.3	Entstehung eines evaneszenten Feldes	33
Abb. 2.4	Resonanzbedingungen für Oberflächenplasmonen	34
Abb. 2.5	Kretschmann-Konfiguration	35
Abb. 2.6	Prinzip der winkelaufgelösten SPR-Messung	36
Abb. 2.7	Aufbau und Messprinzip des Biacore	37

Ergebnisse

Abb. 3.1	Protokoll zur Reinigung von CHO-PrP ^C	38
Abb. 3.2	Charakterisierung der Cu ²⁺ -IMAC	39
Abb. 3.3	Charakterisierung der Immunopurifikation	40
Abb. 3.4	Einfluss von verschiedenen CHO-PrP ^C -Präparationen auf die Löslichkeit von rekPrP(90-231)-Keimen	41
Abb. 3.5	Konversion von CHO-PrP ^C durch Verdünnung der SDS-Konzentration	44
Abb. 3.6	Konversion von CHO-PrP ^C durch SDS-Zugabe	45
Abb. 3.7	Strukturelle Konversion von CHO-PrP ^C in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration	46
Abb. 3.8	Lokalisation der Epitope von 3F4 und R1 innerhalb der PrP-Sequenz	47
Abb. 3.9	Konversion von CHO-PrP ^C unter Ausbildung partieller PK-Resistenz	48
Abb. 3.10	Stabilität kleiner unilamellarer Vesikel (SUV)	50

Abb. 3.11	Bestimmung der Saccharosekonzentrationen nach präparativer Ultra-zentrifugation	51
Abb. 3.12	Rekonstitution von CHO-PrP ^C in RLV	52
Abb. 3.13	Vergleich der Bindungseigenschaften von rekPrP(29-231) und CHO-PrP ^C	53
Abb. 3.14	Schematische Darstellung des Aufbaus der Flusszelle beim Biacore X und Prinzip der Bilayer-Generierung	54
Abb. 3.15	SPR-Messung: Präparation eines Lipidbilayers	55
Abb. 3.16	SPR-Messung: Bindung von CHO-PrP ^C an raft ähnliche Modellmembranen und an eine unbedeckte Chipoberfläche	56
Abb. 3.17	SPR-Messung: Bindung von CHO-PrP ^C und rekPrP(29-231) an raft ähnliche Modellmembranen	57
Abb. 3.18	Modell der unterschiedlichen Wechselwirkungen von CHO-PrP ^C und rekPrP(29-231) mit Modellmembranen	58
Abb. 3.19	SPR-Messung: Einfluss der Ionenstärke auf die Bindung von CHO-PrP ^C und rekPrP(29-231) an raft ähnliche Lipidbilayer	59
Abb. 3.20	SPR-Messung: Untersuchung der Bindung von CHO-PrP ^C an Modellmembranen bei verschiedenen Flussraten	60
Abb. 3.21	SPR-Messung: Gleichgewichtseinstellung der Bindung von CHO-PrP ^C an Modellmembranen durch multiple Injektionen	61
Abb. 3.22	SPR-Messung: Rekonstruktion einer einheitlichen Bindungskurve aus Bindungskurven multipler Injektionen	62
Abb. 3.23	SPR-Messung: Bestimmung des Sättigungswertes der Bindung von CHO-PrP ^C an Modellmembranen	63
Abb. 3.24	Strukturmodell von PrP ^C	64
Abb. 3.25	SPR-Messung: Exemplarische Darstellung der Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeit	66
Abb. 3.26	SPR-Messung: Bestimmung der initialen Assoziationsgeschwindigkeit	67
Tab. 3.1	Mittels SPR-Messungen ermittelte Assoziationsgeschwindigkeiten	67
Abb. 3.27	SPR-Messung: Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit der Bindung von rekPrP(29-231), bzw. CHO-PrP ^C an raft ähnliche Modellmembranen	69
Tab. 3.2	Mittels SPR-Messungen ermittelte Dissoziationsgeschwindigkeiten	70
Diskussion		
Abb. 4.1	Modell der strukturellen Konversion von CHO-PrP ^C	75
Abb. 4.2	Vergleich der SDS-induzierten strukturellen Konversion von rekPrP(90-231) und CHO-PrP ^C	76
Abb. 4.3	Generierung partieller PK-Resistenz von CHO-PrP ^C	79
Abb. 4.4	Zwei-Phasen-Modell der CHO-PrP ^C -Konversion	87

1 Einleitung

1.1 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Als Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) wird eine Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen zusammengefasst, die zu schwammartigen Degenerationen im Hirn (spongiforme Enzephalopathien) führen und übertragbar (transmissibel) sind. Abgeleitet von dem außergewöhnlichen Typ der Erreger, den so genannten Prionen, auf die in Kapitel 1.2.1 genauer eingegangen wird, werden diese Erkrankungen auch kurz als Prionkrankheiten bezeichnet. Zu den Prionkrankheiten zählen u. a. die Traberkrankheit (Scrapie) beim Schaf, die Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE) beim Rind und verschiedene Formen der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) beim Menschen (s. Tab. 1). Das Außergewöhnliche dieser Krankheiten ist, dass sie nicht nur als Folge einer Infektion, sondern auch genetisch bedingt oder sporadisch auftreten können.

Das pathologische Hauptmerkmal aller Prionkrankheiten sind die bereits erwähnten spongiformen Veränderungen im Gehirn. So entsteht lichtmikroskopisch der Eindruck einer schwammartigen Durchlöcherung, hervorgerufen durch viele extrazellulär im Neuropil gelegene und z. T. auch durch multiple, intrazelluläre Vakuolen in Neuronen. Diese Vakuolisierung geht mit dem Absterben der Neuronen einher, was wiederum direkt korreliert mit einem vermehrten Wachstum an Astrozyten und Mikroglia (Masters *et al.*, 1981). Neben diesen neuromorphologischen Veränderungen treten zudem extrazelluläre proteinöse Ablagerungen auf, von denen etwa 90% amorphe Aggregate und 10% amyloide Strukturen darstellen (Jeffrey *et al.*, 1997). Weiterhin zeichnen sich die Prionkrankheiten durch eine Jahre dauernde symptomlose Inkubationszeit aus gefolgt von einem schnellen Krankheitsverlauf. Dieser umfasst klinische Symptome wie Bewegungs- und Koordinationsstörungen bis hin zu Demenz und führt stets zum Tod.

1.1.1 Scrapie

Die Traberkrankheit oder Scrapie bei Schafen ist seit 1732 bekannt und stellt somit die älteste bekannte Prionkrankheit dar. Historisch sei angemerkt, dass der Begriff Prion allerdings erst 1982 geprägt wurde. Bereits 1898 wurden erstmals pathologische Veränderungen im Hirn Scrapie-erkrankter Schafe beschrieben (Cassirer 1898). 1936 gelang dann der experimentelle Beweis, dass Scrapie übertragbar, also eine

Tab. 1.1: Überblick und Nomenklatur der Prionkrankheiten.

Wirt	Krankheit	Abkürzung	Mechanismus
Mensch	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit:		
	sporadisch	sCJD	somatische Mutation oder spontane Umwandlung von PrP ^C zu PrP ^{Sc}
	iatrogen	iCJD	Infektion durch kontaminierte Wachstumshormonpräparate, medizinische Eingriffe, etc.
	familiär	fCJD	Keimbahnmutation im PrP-Gen
	neue Variante	vCJD	Infektion durch bovine Prionen
	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom	GSS	Keimbahnmutation im PrP-Gen
	Fatale Familiäre Insomnie	FFI	Keimbahnmutation im PrP-Gen
	Kuru	Kuru	Infektion durch rituellen Kannibalismus
Schaf	Traberkrankheit	Scrapie	Infektion von genetisch suszeptiblen Schafen
Rind	Bovine Spongiforme Enzephalopathie	BSE	Infektion durch kontaminiertes Tiermehl
Hirsch	Chronic Wasting Disease	CWD	unbekannt
Katze	Feline Spongiforme Enzephalopathie	FSE	Infektion durch kontaminiertes Tiermehl
Nerz	Transmissible Mink Enzephalopathie	TME	Infektion durch kontaminiertes Tiermehl

Infektionskrankheit ist (Cuille *et al.*, 1936). Durch die Möglichkeit der Übertragung von Scrapie auf die Maus (Chandler 1961) und den syrischen Goldhamster (Marsh *et al.*, 1975) wurde Scrapie zum Modellsystem der Erforschung der Prionkrankheiten.

1.1.2 Bovine Spongiforme Enzephalopathie

Die wohl größte Aktualität besitzt die seit 1985 in Großbritannien auftretende **Bovine Spongiforme Enzephalopathie** (BSE). Von den weltweit rund 183 000 bestätigten BSE-Fällen traten 180 000 in Großbritannien auf. Ihren Höhepunkt erreichte die Epidemie 1992 mit etwa 37 000 Fällen pro Jahr. Bei der Betrachtung der auftretenden BSE-Fälle ist aber zu berücksichtigen, ob und in welchem Ausmaß die einzelnen Länder die bisher zur Verfügung stehenden BSE-Tests durchführen. Als Ursache für das Auftreten von BSE gilt die Verfütterung von nicht ausreichend dekontaminierten Schlachtabfällen von Scrapie-infizierten Schafen in Form von Tiermehl an Rinder. Es

wird angenommen, dass dadurch die Artenbarriere zwischen Schaf und Rind überwunden werden konnte (Prusiner, 1997). 1995 starb der erste Mensch an einer neuen Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD). Man geht davon aus, dass diese Variante durch die Übertragung von BSE vom Rind auf den Menschen entstanden ist (s. Kap. 1.1.3). Aus diesem Grund wurde 1996 ein Verbot für den Export britischer Rinder verhängt. Weiterhin wurden die Sterilisierungsbedingungen bei der Tiermehlherstellung erheblich verschärft. Bis heute geht die Epidemie in Großbritannien stetig zurück, umfasst aber immer noch 10-20 Fälle pro Monat.

1.1.3 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD)

Unter den menschlichen Prionkrankheiten stellt CJD die häufigste dar. Sie tritt in 85-90% der Fälle sporadisch auf (sCJD) und ist nur bei 10% genetisch bedingt (fCJD). Die seltenen iatrogenen Fälle (iCJD) sind durch Infektionen z.B. durch die Verwendung von kontaminiertem Operationsbesteck oder durch Verabreichung von kontaminierten Wachstumshormonpräparaten bedingt.

Von den menschlichen Prionkrankheiten sind typischerweise Erwachsene im Alter zwischen 40 und 80 Jahren betroffen (Roos *et al.*, 1973). 1995 tauchte in Großbritannien eine neue Variante der CJD (vCJD) auf, an der jüngere Menschen im Durchschnittsalter von 28 Jahren erkrankten (Will *et al.*, 1996). Das zunächst ausschließliche Auftreten von vCJD in Großbritannien und das ungewöhnlich junge Alter der Erkrankten gaben den ersten Hinweis dafür, dass vCJD durch Infektion bei dem Verzehr von kontaminierten Fleischprodukten zustande gekommen sein könnte. Vergleichende Untersuchungen unterstützten dann auch diesen vermuteten Zusammenhang. So stellte sich heraus, dass die neuromorphologischen Veränderungen im Hirn von BSE-infizierten Makaken denen im Hirn von vCJD-Patienten gleichen (Lasmézas *et al.*, 1996). Des Weiteren zeigten BSE- und vCJD-infizierte Mäuse identische neurologische und histopathologische Merkmale (Hill *et al.*, 1997; Bruce *et al.*, 1997).

1.2 Molekulare Grundlagen

1.2.1. Eigenschaften des Erregers

Bereits 1967 gab es erste Mutmaßungen, dass es sich bei dem Erreger um einen vollkommen neuen Erreger-Typ handelt: T. Alper und ihre Kollegen stellten fest, dass durch Behandlung von Hirnextrakten Scrapie-infizierter Tiere mit UV-Licht oder kurzweilliger, ionisierender Strahlung, was für gewöhnlich Nukleinsäuren schädigt oder zerstört, die Infektiosität unbeeinflusst blieb. Das Fehlen von Nukleinsäuren in dem

Erreger würde einen Virus oder sonst irgendein bekanntes infektiöses Agens ausschließen (Alper *et al.*, 1967).

Dieses erstaunliche Ergebnis wurde dann zu Beginn der 80er Jahre von S. B. Prusiner und seiner Arbeitsgruppe weiter systematisch untersucht. Es stellte sich heraus, dass durch diverse nukleinsäureschädigende Verfahren die Infektiösität gereinigter Hirnextrakte nicht verringert werden konnte, wohl aber durch Substanzen, die Proteine abbauen oder denaturieren (Prusiner *et al.*, 1981). Um diese neuartige Erregerklasse von den bisher bekannten Mikroorganismen abzugrenzen prägte S. B. Prusiner den Begriff **Prion** als Abkürzung von „**proteinaceous infectious particle**“ (Prusiner *et al.*, 1982). Nach dem von ihm aufgestellten Prion-Modell besteht dieser Erreger überwiegend, wenn nicht sogar ausschließlich aus Protein. Die Tatsache, dass Prionen sich dennoch replizieren können widersprach dem Dogma der Molekularbiologie, wonach als Informationsträger stets eine Nukleinsäure angenommen wurde. Verschiedene Modelle zur nukleinsäurefreien Replikation von Prionen werden in Kap. 1.2.6 genauer erläutert.

Es stellte sich dann heraus, dass Prionen ein bestimmtes Protein enthalten, welches kurz **PrP** für **Prion Protein** genannt wird (Bolton *et al.*, 1982). Dadurch stellte sich die nächste Frage nach der Lokalisation der codierenden Sequenz für dieses Protein. Nach Ansequenzierung des Prion Proteins (Prusiner *et al.*, 1984) konnten molekulare Sonden zur Identifizierung des PrP-Gens konstruiert werden. Erstaunlicherweise stellte sich heraus, dass das Prion Protein auf dem wirtseigenen Genom codiert ist und zwar sowohl in infizierten, als auch in nicht-infizierten Tieren (Oesch *et al.*, 1985; Chesebro *et al.*, 1985). Es zeigte sich weiterhin, dass das PrP-Gen die meiste Zeit aktiv ist, dass der Organismus also im Normalfall das Prion Protein expremiert ohne an einer Prionkrankheit zu erkranken (Basler *et al.*, 1986). Die Tatsache, dass eine zelluläre Form des Prion Proteins existiert erklärt auch die Feststellung, dass bei einem erkrankten Organismus jegliche Immunantwort ausbleibt. Dieses wirtseigene Prion Protein müsste sich also von dem krankheitsassoziierten Prion Protein bei gleicher Primärsequenz durch irgendeine Eigenschaft unterscheiden, um die von S. B. Prusiner formulierte Prion-Hypothese zu unterstützen. Tatsächlich stellte sich heraus, dass das Prion Protein aus Scrapie-infizierten Hirnen eine hohe Resistenz gegenüber Proteinasen aufweist, während das wirtseigene Prion Protein eines gesunden Organismus sensitiv gegenüber Proteinasen ist (Hay *et al.*, 1987). Zur Unterscheidung dieser beiden Formen des Prion Proteins wurden die Begriffe PrP^{Sc} (Sc für Scrapie) für die krankheitsassoziierte, Proteinase-resistente Form und PrP^C (C für cellular) für die zelluläre, Proteinase-sensitive Form geprägt.

Wie in Abbildung 1.1. dargestellt wird also durch Verdauung mit Proteinase K PrP^C im

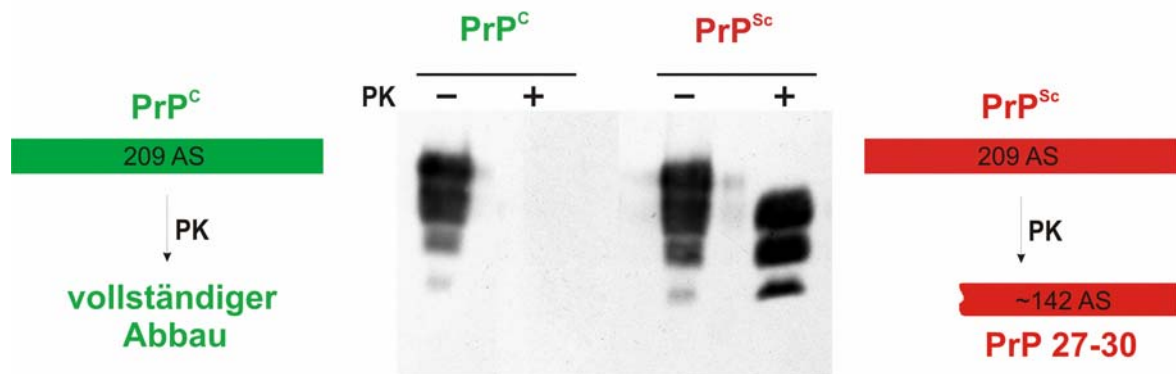


Abb. 1.1. **PK-Resistenz von PrP^{Sc}.** PrP^C und PrP^{Sc} wurden mit Proteinase K verdaut und anschließend mittels Western-Blot analysiert. Während PrP^C durch Proteinase K (PK) komplett abgebaut wird, weist PrP^{Sc} ein C-terminal resistentes Fragment (PrP 27-30) auf.

Gegensatz zu PrP^{Sc} komplett abgebaut. PrP^{Sc} hingegen weist eine C-terminale Resistenz auf, d.h.: es wird etwa um 68 Aminosäuren N-terminal verkürzt und es verbleibt ein resistentes Fragment von etwa 27-30 kDa (PrP 27-30). Dabei weist die verkürzte Form PrP 27-30 dieselbe Infektiosität auf wie PrP^{Sc} der vollen Länge.

Aufgrund dieser biochemischen Eigenschaft von PrP^{Sc} konnte auch ein geeignetes Reinigungsprotokoll für infektiöses PrP 27-30 etabliert werden (Prusiner *et al.*, 1982a).

1.2.2 Strukturelle Eigenschaften des Prion Proteins

Wie bereits erwähnt, sind PrP^C und PrP^{Sc} hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenzen identisch. Auch tragen beide Formen des Prion Proteins die gleichen posttranslationalen Modifikationen, wie N-Glykosylierungen und GPI-Anker (s. Kap. 1.2.3). Es handelt sich also um chemisch identische Moleküle. Dennoch können sie deutlich voneinander unterschieden werden (s. Tab. 1.2). Neben der bereits erwähnten Protease-Resistenz als Unterscheidungsmerkmal (s. Kap. 1.2.1), weisen die beiden PrP-Isoformen auch hinsichtlich ihres Löslichkeitsverhaltens verschiedene Eigenschaften auf. PrP^C liegt in wässriger Lösung unter dem Einfluss von milden Detergentien in löslicher Form vor, wie es für ein Membran-assoziiertes Protein zu erwarten ist. PrP^{Sc} hingegen bildet große unlösliche Aggregate, wobei die bereits beschriebene C-terminale PK-Resistenz als Folge eben dieser Unlöslichkeit auftritt. Des Weiteren konnte PrP^{Sc} bisher nicht unter Beibehaltung der Infektiosität in Lösung gebracht werden. Dies bedeutet, dass durch Solubilisierung von PrP^{Sc} dieses die Infektiosität als seine grundlegende Eigenschaft verliert. Es wurde weiterhin festgestellt, dass mit der Solubilisierung von PrP 27-30 eine strukturelle Änderung des Prion Proteins einhergeht. Dabei nahm der relativ hohe Gehalt an β -Faltblatt von PrP 27-30 ab und gleichzeitig konnte eine Zunahme des α -Helix-Gehaltes beobachtet werden (Riesner *et al.*, 1996). Dies lässt darauf schließen, dass die infektiöse Eigenschaft von PrP^{Sc} in der Sekundärstruktur und dem Löslichkeitszustand begründet liegt.

Tab.1.2: Vergleich der strukturellen und physikalisch-chemischen Eigenschaften der beiden Prion Protein Isoformen PrP^{Sc} und PrP^C.

Eigenschaft	PrP ^{Sc}	PrP ^C
Infektiosität	infektios	nicht-infektios
Proteinase K Zugänglichkeit	resistentes Fragment (PrP 27-30)	sensitiv
Sekundärstruktur	hoher β -Faltblatt-Anteil	hoher α -Helix-Gehalt
Löslichkeit	unlöslich	löslich (in milden Detergentien)

Die dreidimensionale Struktur von PrP^C wurde mit der Methode der hochauflösenden NMR-Spektroskopie an Prion Proteinen, denen die posttranslationalen Modifikationen und die N-terminalen Aminosäuren 23-89 fehlen (rekPrP(90-231)), bestimmt. Zunächst wurde die 3D-Struktur von rekPrP(90-231) der Sequenz der Maus (Riek *et al.*, 1996) und später auch von rekPrP(90-231) der Sequenz des syrischen Goldhamster beschrieben (Liu *et al.*, 1999). Der Vergleich mit dem 1D-NMR-Spektrum von natürlichem PrP^C aus Kälberhirn ergab, dass es keine signifikanten strukturellen Unterschiede zwischen diesen beiden Formen gibt (Hornemann *et al.*, 2004). Die in

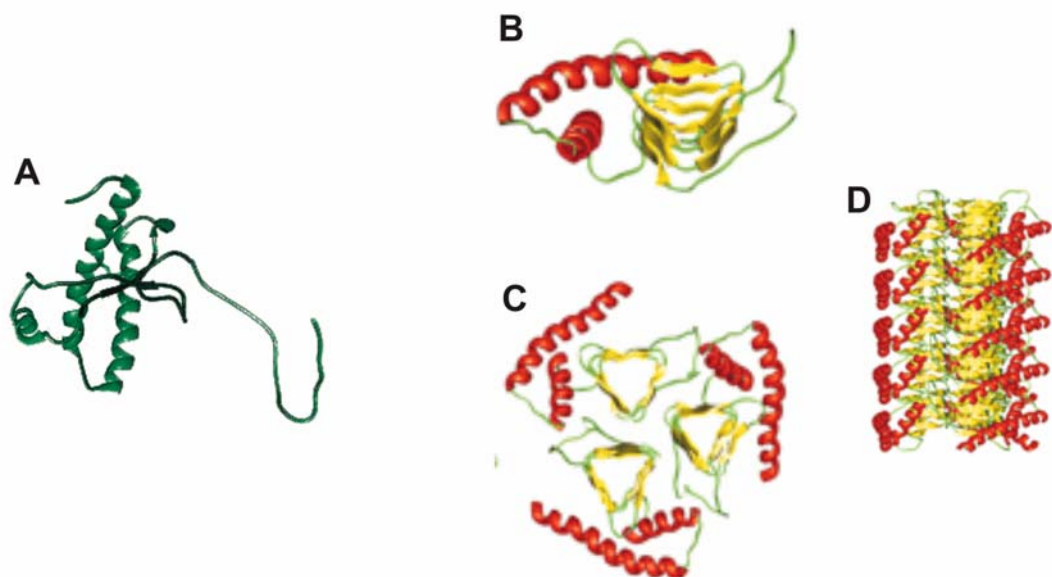


Abb. 1.2. Struktureller Vergleich von PrP^C und PrP^{Sc}.

A NMR-Struktur von rekombinantem SHa PrP (90-231) (Liu *et al.*, 1999). **B** Modell der Struktur von SHa PrP^{Sc}, das auf elektronen-mikroskopischen Daten von 2D-Kristallen beruht. **C** Es wird angenommen, dass PrP 27-30 Trimere ausbildet, die, wie in **D** dargestellt, Fibrillen bilden könnten (Govaerts *et al.*, 2004).

Abb. 1.2 A dargestellte Struktur wird also allgemein als Struktur von PrP^C angenommen.

Das PK-resistente Fragment PrP 27-30 von PrP^{Sc} hat die Fähigkeit amyloide Fibrillen (Prusiner *et al.*, 1983) und 2D-Kristalle zu bilden (Wille *et al.*, 2002). Anhand der elektronenmikroskopischen Daten dieser Kristalle konnte ein Strukturmodell für PrP^{Sc} (s. Abb. 1.2 B/C) erstellt werden (Govaerts *et al.*, 2004). Nach diesem Modell bildet PrP 27-30 β -Helices aus und ist in Trimeren angeordnet. Davon ausgehend lässt sich annehmen, dass es durch Assemblierung dieser Trimere zur Ausbildung von fibrillären Strukturen kommt (Abb. 1.2 D).

1.2.3 Biosynthese des zellulären Prion Proteins

PrP^C ist ein Membranprotein und wird somit am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) translatiert. Das primäre Translationsprodukt des PrP-Gens (Prpn) des syrischen Goldhamsters umfasst zunächst 254 Aminosäuren. Darin enthalten sind sowohl am N- als auch am C-Terminus vorhandene Signalsequenzen (s. Abb. 1.3). Während seiner Biosynthese erfährt PrP^C verschiedene Formen von posttranslationalen Modifikationen. Im ER wird zunächst die N-terminale Signalsequenz abgespalten, zwei N-Glykosylierungen verknüpft und eine Disulfidbrücke ausgebildet. Nach Abspaltung der verbleibenden C-terminalen Signalsequenz wird ein Glykosyl- Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) C-terminal verknüpft. Vom ER gelangt PrP^C in den Golgi-Apparat,

primäres Translationsprodukt:

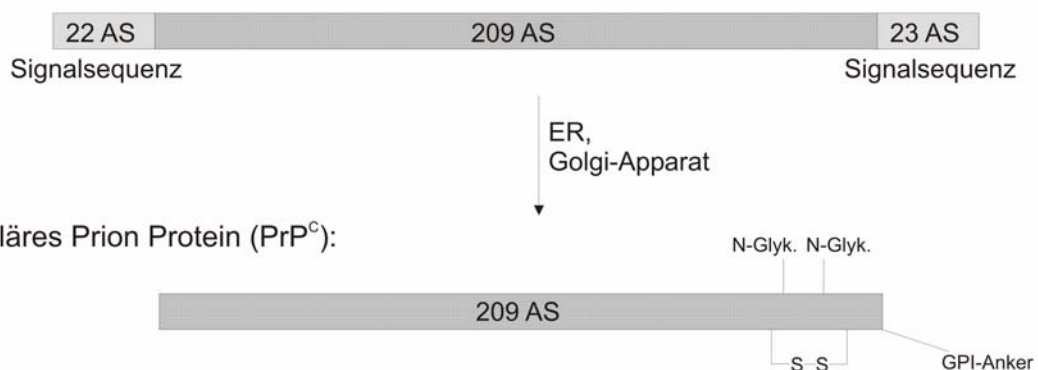


Abb. 1.3. Biosynthese von PrP^C. Das primäre Translationsprodukt wird modifiziert, indem im endoplasmatischen Retikulum (ER) die beiden Signalsequenzen abgespalten, zwei N-Glykosylierungen und ein GPI-Anker angehängt und eine Disulfidbrücke ausgebildet werden. Im Golgi-Apparat werden sowohl die beiden N-Glykosylierungen als auch der GPI-Anker weiter modifiziert (s. Text).

wo es zu weiteren Modifikationen kommt. Diese umfassen Modifikationen des Grundgerüsts der N-Glykosylierungen sowie Sialisierungen sowohl der N-Glykosylierungen als auch des GPI-Ankers (Turk *et al.*, 1988). Die vollständig modifizierte Form des PrP^C weist ein Molekulargewicht von etwa 33-35 kDa auf. PrP^C gelangt dann an die Zelloberfläche und wird dort über den GPI-Anker in der Membran verankert. Wie die meisten GPI-geankerten Proteine ist PrP^C in speziellen Membranbereichen angereichert, die als rafts bezeichnet werden (Vey *et al.*, 1996). Rafts sind Mikrodomänen innerhalb der Plasmamembran, die reich an Cholesterol, Sphingolipiden und Cerebrosiden sind. Biochemisch zeichnen sich rafts durch ihre Unlöslichkeit in kaltem Triton X-100 aus, was zu der oft verwendeten synonymen Bezeichnung als Detergenz-resistente Membranen (DRM) führte (Brown *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2000).

Das Organ mit der größten Konzentration an PrP^C in gesunden Organismen ist das Gehirn. *In situ* Hybridisierungen zeigten, dass der höchste Gehalt an PrP^C-mRNA in Neuronen vorliegt (Kretzschmar *et al.*, 1986). Der absolute Gehalt an PrP^C im Gehirn ist allerdings sehr gering. So macht PrP^C weniger als 0,1% des Gesamtproteins im zentralen Nervensystem aus (Turk *et al.*, 1988). Aus diesem Grund erwies sich die Aufreinigung von PrP^C aus dem Hirn gesunder Tiere als schwierig und die Ausbeute blieb in Bezug auf das eingesetzte Material sehr gering (Pan *et al.*, 1992; Pergamie *et al.*, 1996). Eine deutlich höhere Ausbeute kann durch Verwendung von *E. coli* als Expressionssystem erzielt werden (Mehlhorn *et al.*, 1996). Ein entscheidender Nachteil dabei ist allerdings, dass *E. coli* als prokaryotisches Expressionssystem nicht in Lage ist, das expremierte Protein posttranslational durch Verknüpfung der N-Glykosylierungen und des GPI-Ankers zu modifizieren. Zur Unterscheidung von der natürlichen, modifizierten Form des PrP^C wird aus *E. coli* gereinigtes PrP als rekombinates PrP (rekPrP) bezeichnet.

1.2.4 Funktion des zellulären Prion Proteins

Die genaue Funktion von PrP^C ist bis heute nicht bekannt. Trotz hoher Konservierung der PrP-Sequenz, was auf eine essentielle Funktion schließen lässt, zeigten PrP-*knock-out* (PrP^{0/0})-Mäuse eine normale Entwicklung (Büeler *et al.*, 1992). Genauere Untersuchungen deuteten lediglich auf einen anormalen Schlafrhythmus hin (Tobler *et al.*, 1996).

Es stellte sich heraus, dass PrP^C ein Metall-Ionen-Bindemolekül darstellt. Dabei bindet es Kupferionen mit einer höheren Affinität als Zink- Mangan- und Nickel-Ionen (Jackson *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2000). Es konnten sechs konservierte Histidin-Reste identifiziert werden, die für diese Bindung verantwortlich sind. Vier davon liegen in der *Octarepeat-Region* (s. Abb. 1.4) und zwei weitere an den Aminosäure-Positionen 96 und 111 (Jackson *et al.*, 2001). Im Zusammenhang mit der Tatsache,

dass die synaptosomale Fraktion von PrP^{0/0}-Mäusen eine um 50% erniedrigte Kupfer-Konzentration aufweist, lässt sich annehmen, dass PrP^C eine regulatorische Funktion in Bezug auf die synaptosomale Kupfer-Konzentration besitzt. Da die Zugabe von Kupfer zu Neuroblastoma-Zellkulturen die Endocytose von PrP^C stimuliert (Pauly *et al.*, 1998), könnte PrP^C direkt für den Transport von Kupfer aus dem extrazellulären in den intrazellulären Raum verantwortlich sein. Der N-terminale Teil von PrP^C, an dem es zur Bindung von Kupfer kommt, ist strukturell flexibel und an der Bindung verschiedener Liganden beteiligt. Somit könnte die Bindung von Kupfer auch einen strukturellen Einfluss auf PrP^C haben oder das Bindungsverhalten von PrP^C beeinflussen. So bindet PrP^C z. B. über zwei Bindungsstellen an den Lamininrezeptor, wovon eine in der *Octarepeat-Region* lokalisiert ist (Hundt *et al.*, 2001).

Alternativ wird PrP^C eine Kupfer/Zink-abhängige Superoxid Dismutase (SOD) Aktivität zugesprochen. So konnte gezeigt werden, dass die SOD-Aktivität bei PrP^{0/0}-Zellen reduziert, bei PrP-überexprimierenden Zellen hingegen erhöht ist (Brown *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1998). Allerdings konnten diese Ergebnisse im Hirn von PrP^{0/0}-, PrP-

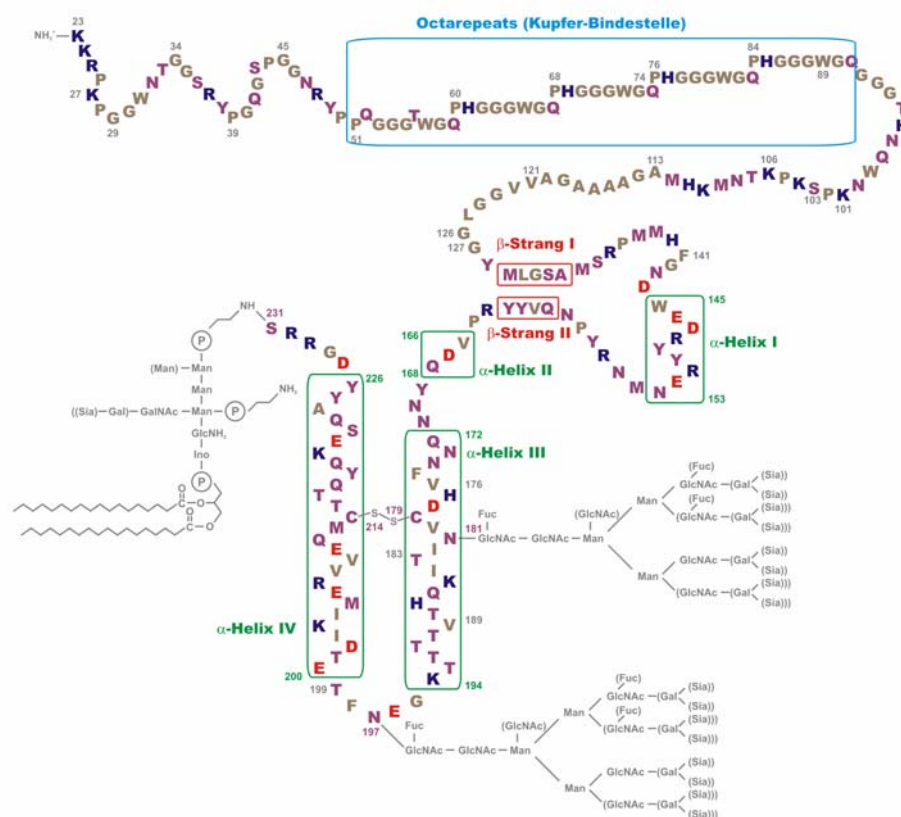


Abb. 1.4. Schematische Darstellung von PrP^C. Braun: hydrophobe AS; Rot: saure AS; Blau: basische AS; Lila: ungeladene hydrophile AS. (Darstellung verändert nach C. Dumpitak, 2003).

überexprimierenden und Wildtyp-Mäusen nicht bestätigt werden (Waggoner *et al.*, 2000).

Die Tatsache, dass PrP^{0/0}-Mäuse keine klinischen Symptome einer Prionkrankheit aufweisen, lässt darauf schließen, dass der Krankheitsverlauf nicht auf der Inhibierung von PrP^C, sondern vielmehr auf die Akkumulation von PrP^{Sc} zurückzuführen ist. Weiterhin stellte sich heraus, dass PrP^{0/0}-Mäuse resistent gegen Infektion mit Scrapie sind (Büeler, H. *et al.*, 1993), was bedeutet, dass PrP^C zwar nicht infektiös, aber durchaus für die Replikation von PrP^{Sc} essentiell ist.

1.3 *In vitro*-Konversion

Der letztendliche Beweis der Prion-Hypothese wäre dann erbracht, wenn es gelingen würde *in vitro* nicht-infektiöses Prion Protein in eine infektiöse Form zu überführen. Dies ist lange Zeit nicht gelungen bis schließlich 2004 gezeigt werden konnte, dass es prinzipiell möglich ist, gereinigtes und nicht-infektiöses PrP *in vitro* in eine infektiöse Form zu überführen (Legname *et al.*, 2004). Bei diesem System wurde eine verkürzte Form von rekombinantem PrP, rekPrP(89-230), in eine Isoform, die sich durch die effiziente Bildung von fibrillären Strukturen auszeichnet, überführt. Die Konversion wurde dabei induziert, indem rekPrP(89-230) in enorm hohen Konzentrationen unter teildeneraturierenden Bedingungen inkubiert wurde. Es konnte gezeigt werden, dass auf diese Weise generierte Fibrillen geringe Mengen an Infektiösität aufweisen. Um durch dieses System *in vitro* generierte Prionen von natürlichen zu unterscheiden, wurde der Begriff der synthetischen Prionen eingeführt. Die geringen Mengen an Infektiösität der synthetischen Prionen konnten allerdings lediglich in transgenen Mäusen, die eine verkürzte Form des PrP^C, PrP^C(89-230), überexprimieren, nachgewiesen werden. Des Weiteren kam es zur Erkrankung der transgenen Mäuse erst nach einer deutlich verlängerten Inkubationszeit verglichen mit natürlichen Prionen. Nach zweiter Passage in Wildtyp Mäusen, die PrP^C der vollen Länge exprimieren, konnte jedoch nahezu kein Unterschied in der Inkubationszeit mehr festgestellt werden. Die erste Passage führte also zu einer drastischen Zunahme der Infektiösität. PrP^C(89-230), welches während der ersten Passage im Hirn der transgenen Mäuse konvertiert wurde, trägt sowohl die beiden N-Glykosylierungen, als auch den GPI-Anker. Aus diesem Grund lässt sich annehmen, dass die Konversion bei Anwesenheit dieser Modifikationen weitaus spezifischer ist als die Konversion von unmodifiziertem rekPrP(89-231) zu den synthetischen Prionen. Somit kann die erste Passage als eine natürliche Amplifikation angesehen werden, wodurch es zu einer drastischen Zunahme der Infektiösität kommt.

Ein weiteres Konversionssystem, dass die spontane Umwandlung von rekPrP(90-231) der Sequenz des Hamsters nachstellt, führte ebenfalls zur Generierung verschiedener PrP^{Sc}-spezifischer Eigenschaften. So konnte die Zunahme an β -Struktur, Unlöslichkeit

und die Ausbildung von Fibrillen in diesem System generiert werden (Post *et al.* 1998; Leffers *et al.* 2005). *In vitro* generierte Infektiösität konnte jedoch bis heute nicht nachgewiesen werden. Induziert wird die Konversion bei diesem System durch sehr geringe Mengen des anionischen Detergenz SDS (s. Abb. 1.5). Durch systematische Variation der SDS-Konzentration konnten verschiedene Intermediate, die während der Konversion gebildet werden, stabil eingestellt und identifiziert werden (Jansen *et al.* 2001). So liegt rekPrP(90-231) bei 0,2 % SDS in löslicher Form mit überwiegend α -helikaler Sekundärstruktur vor. Systematisches Verdünnen der SDS-Konzentration führt dann zunächst zur Bildung eines löslichen und überwiegend α -helikalen Dimers. Im Weiteren kann eine Zunahme an β -Struktur unter Oligomerisierung des rekPrP(90-231) beobachtet werden. Dieses β -strukturierte Oligomer liegt in löslicher Form vor. Zur Ausbildung von unlöslichen, amorphen Aggregaten kommt es durch weitere Verdünnung der SDS-Konzentration. Die Generierung von fibrillären Strukturen konnte bei 0,03 % SDS unter der Anwesenheit von NaCl beobachtet werden (Leffers *et al.* 2005). Allerdings ist hierfür eine sehr lange Inkubationszeit von etwa 5 Wochen notwendig. Dies zeigt, dass das Ausfallen des rekPrP(90-231) in Form von amorphen Aggregaten ein schneller Prozess ist, wohingegen die ultrastrukturelle Umformung zu Fibrillen langsamer abläuft. Auch die natürliche Form des PrP^C, d.h. aus Hamsterhirn aufgereinigtes PrP^C, welches sowohl die N-Glykosylierungen als auch den GPI-Anker

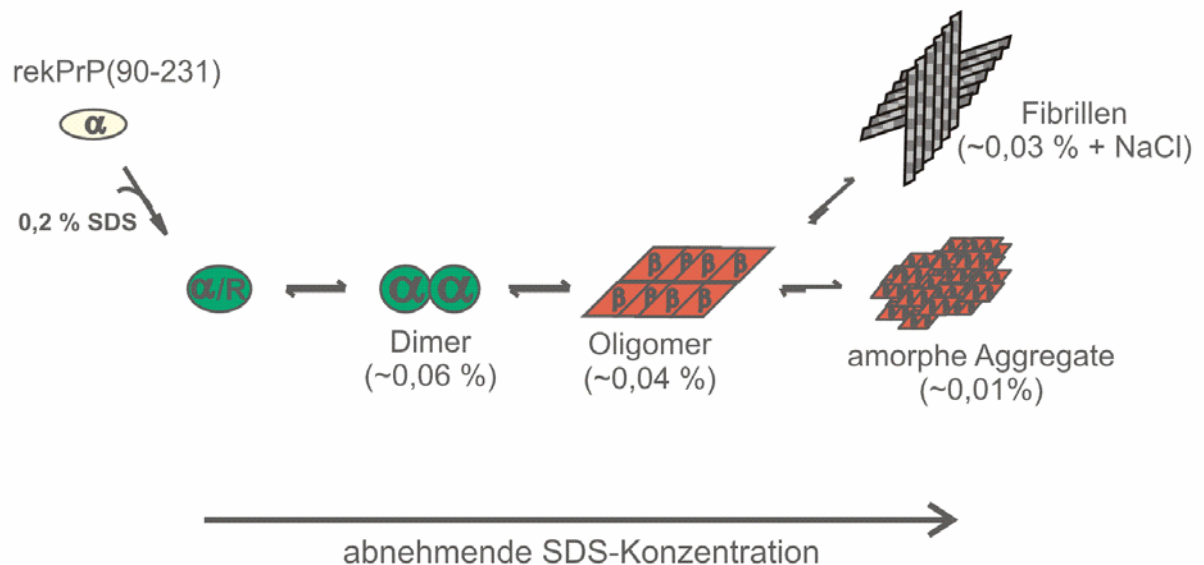


Abb. 1.5. *In vitro*-Konversion. Durch Verdünnen von SDS kann ein Übergang von einem überwiegend α -helikalen Monomer zu β -Faltblatt reichen Aggregaten, bzw. fibrillären Strukturen induziert werden. Dabei treten als Intermediate ein α -helikales Dimer und ein β -strukturiertes Oligomer auf (Darstellung verändert nach Jansen 2002).

trägt, kann auf diese Weise in eine fibrilläre Struktur überführt werden. Allerdings findet hier der Übergang bei einer geringeren SDS-Konzentration von 0,01 % statt, was durch die erhöhte Löslichkeit des natürlichen PrP^{C} , bedingt durch die posttranslationalen Modifikationen, erklärt werden kann.

1.4 Hypothesen zur Prion-Replikation

Auf Basis der Strukturen bzw. Strukturmodelle (s. Kap. 1.2.2) und der experimentellen Daten verschiedener *in vitro*-Konversionssysteme (s. Kap. 1.2.5) ließen sich erste Modelle für die Replikation von Prionen entwerfen. Dabei sollten die Modelle in der Lage sein, sämtliche Eigenschaften des Erregers zu erklären. Dazu zählt das Auftreten sporadischer, genetisch bedingter sowie infektiöser Formen der Prionkrankheiten.

Die von Prusiner formulierte Prion-Hypothese besagt, dass ein Protein den Hauptbestandteil, wenn nicht sogar den einzigen Bestandteil des Erregers darstellt, und dass dieses Protein in der Lage ist, sich selbst zu replizieren (Prusiner, 1982). Nach der Entdeckung der beiden Isoformen des Prion Proteins wurde diese Hypothese dahingehend erweitert, dass die Replikation von PrP^{Sc} auf der Umwandlung von PrP^{C} zu PrP^{Sc} beruht (Prusiner *et al.*, 1990). Sporadische Fälle würden so einer spontanen Konversion von PrP^{C} zu PrP^{Sc} entsprechen. Bei genetisch bedingten Fällen wäre die Verringerung der thermodynamischen Stabilität der PrP^{C} -Struktur der Grund für die Konversion und die dadurch eingeleitete Replikation. Im infektiösen Fall würde das exogene PrP^{Sc} direkt auf das wirtseigene PrP^{C} wirken und so die Konformationsänderung katalysieren.

Zu dem Mechanismus des PrP^{Sc} -induzierten Konformationsüberganges von PrP^{C} gibt es verschiedene Modelle. Nach dem Heterodimer-Modell (Abb.1.6) erfolgt die Konversion über eine lineare Autokatalyse (Cohen *et al.*, 1994). PrP^{C} liegt mit PrP^* , einem Übergangs-Intermediat, welches eine leicht destabilisierte Struktur besitzt, im Gleichgewicht. Exogenes PrP^{Sc} ist in der Lage, dieses PrP^* zu binden, wodurch ein heterodimerer Zwischenzustand entsteht. Das Heterodimer lagert sich dann in ein PrP^{Sc} -Homodimer um, welches nach Dissoziation weitere Umwandlungen einleiten kann. Es handelt sich bei diesem Modell also um eine lineare Autokatalyse, die zu einer exponentiell ansteigenden Bildung von PrP^{Sc} führt. Das Gleichgewicht zwischen PrP^{C} und PrP^{Sc} muss dabei auf der Seite von PrP^{Sc} liegen, da sonst keine treibende Kraft für den katalytischen Umsatz vorhanden wäre.

M. Eigen hat jedoch quantitative Mängel der linearen Katalyse aufgezeigt. Somit müsste die Beschleunigung der Umwandlung durch die Heterodimerbildung unrealistisch hohe Werte annehmen, da die spontane Umwandlung als extrem

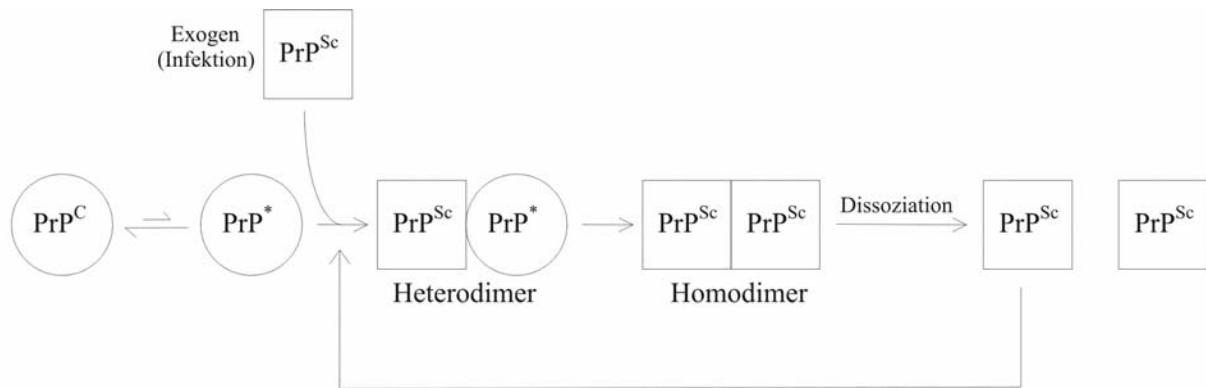


Abb. 1.6. Heterodimer-Replikationsmodell. PrP^{Sc} bindet an eine destabilisierte Form von PrP^{C} (PrP^*), wodurch ein Heterodimer gebildet wird. Durch die Wechselwirkung wird die Umwandlung von PrP^* zu PrP^{Sc} induziert und es entsteht ein Homodimer. Nach Dissoziation stehen zwei PrP^{Sc} -Monomere zur Katalyse weiterer Umwandlungen bereit (verändert nach Cohen *et al.*, 1994).

langsam angenommen werden muss. Diese Schwierigkeit ließe sich jedoch umgehen, wenn angenommen wird, dass mehrere PrP^{Sc} -Moleküle kooperativ die Umwandlung beschleunigen, da dies zu einer Verringerung des katalytischen Effektes eines einzelnen PrP^{Sc} -Moleküls führen würde (Eigen, 1996).

Das von P. T. Lansbury formulierte Modell geht von einer keiminduzierten Nukleation aus (s. Abb. 1.7). Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Modellen geht dieses Modell davon aus, dass das Gleichgewicht zwischen PrP^{C} und PrP^{Sc} weit auf der Seite von PrP^{C} liegt. Somit sind nur geringe Mengen an PrP^{Sc} vorhanden, die noch keine pathogene Wirkung haben. Zur Pathogenität kommt es erst, wenn ein so genannter Nukleationskeim entsteht oder exogen, z. B. durch eine Infektion zugeführt wird. Dabei handelt es sich um ein PrP^{Sc} -Oligomer, das eine kritische Größe überschritten hat und in der Lage ist PrP^{C} zu binden und umzuwandeln. Sobald dieser Nukleationskeim gebildet ist, ist der weitere Prozess thermodynamisch begünstigt und läuft sehr schnell ab, wodurch es zu einem raschen Wachstum der Aggregate kommt. Damit sich die Infektion ausbreiten kann, muss im Weiteren von einer Dissoziation, bzw. einem Zerfall der entstandenen sehr großen Aggregate ausgegangen werden, wodurch neue Keime entstehen, die der Polymerisation wieder zur Verfügung stehen (Jarret *et al.*, 1993; Come *et al.*, 1993). Verschiedene experimentelle Daten weisen ebenfalls auf diese keiminduzierte Polymerisation hin. So konnte gezeigt werden, dass es durch Zugabe eines Nukleationskeimes, in Form von Hirnhomogenaten infizierter Tiere, zu PrP^{C} , in Form von Hirnhomogenaten gesunder Tiere, zu einer Konversion von PrP^{C} kommt. Diese Konversion kommt allerdings bald zum Erliegen, wenn nicht durch die Einführung von Ultraschallzyklen ein Zerfall der entstandenen

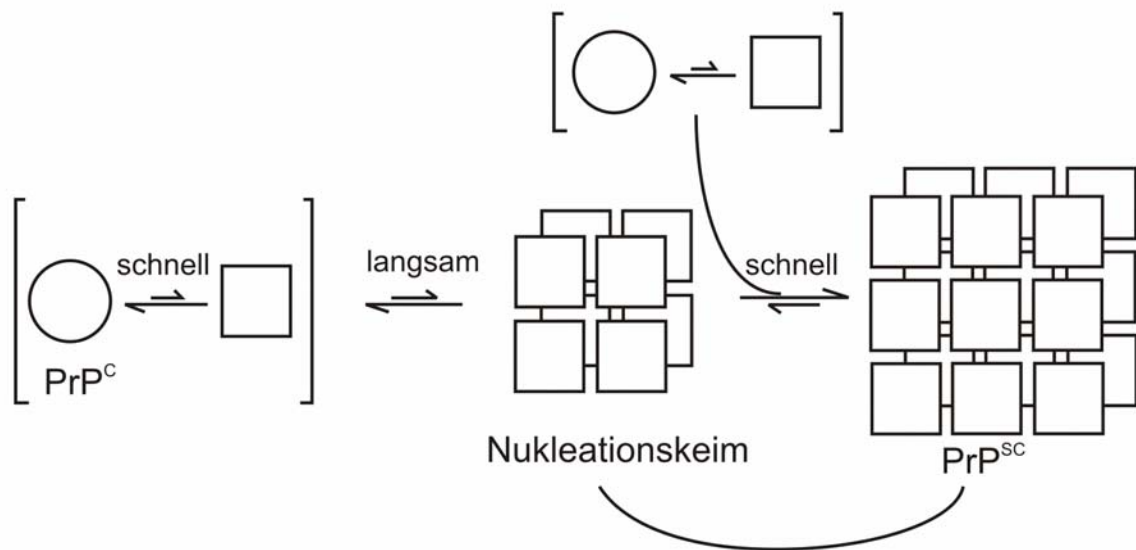


Abb. 1.7. Modell der keiminduzierten Polymerisation. Nach diesem Modell muss erst ein Nukleationskeim gebildet werden, damit die Umwandlung in PrP^{Sc} thermodynamisch günstig wird und sehr schnell ablaufen kann (Jarret *et al.*, 1993; Come *et al.*, 1993).

Aggregate, die eine Zunahme der zu Verfügung stehenden Keime bewirkt, induziert wird (Castilla *et al.* 2005; Sarborio *et al.* 2001; Lucassen *et al.* 2003).

Die bisher beschriebenen Modelle haben u. a. die Gemeinsamkeit, dass sie von einer Umwandlung in wässriger Lösung ausgehen. PrP^C ist allerdings, wie in Kap. 1.2.3 beschrieben über den GPI-Anker auf der Membranoberfläche gebunden. Die spontane oder induzierte Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} könnte also sowohl im Extrazellulärraum, als auch auf der Membranoberfläche stattfinden. Wie bereits in Kap. 1.2.5 erläutert, haben *in vitro*-Konversionsdaten gezeigt, dass durch Verdünnen von SDS die Generierung vieler PrP^{Sc}-spezifischer Eigenschaften induziert werden kann. Dies legt den Schluss nahe, dass die Membranumgebung (*in vitro* simuliert durch SDS) durchaus eine Rolle bei der spontanen Konversion spielt. Des Weiteren zeigten Untersuchungen an neuronalen Zellkulturen, dass PrP^C und PrP^{Sc} in raft-ähnlichen Membrandomänen kolokalisiert sind (Vey *et al.*, 1996; Naslavsky *et al.*, 1997) und dass die Konversion von PrP^C, induziert durch PrP^{Sc}, die spezifische Verankerung des PrP^C über den GPI-Anker zwingend erfordert (Kaneko *et al.*, 1997), was darauf hinweist, dass auch bei der PrP^{Sc}-induzierten Konversion die Membranumgebung eine entscheidende Rolle spielt. Das in Abb. 1.8 dargestellte Modell stützt sich auf diese Beobachtungen und geht von einer spontanen Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} beim Übergang von der Membranoberfläche in das wässrige Medium aus. Zu diesem Übergang kommt es nur mit sehr geringer

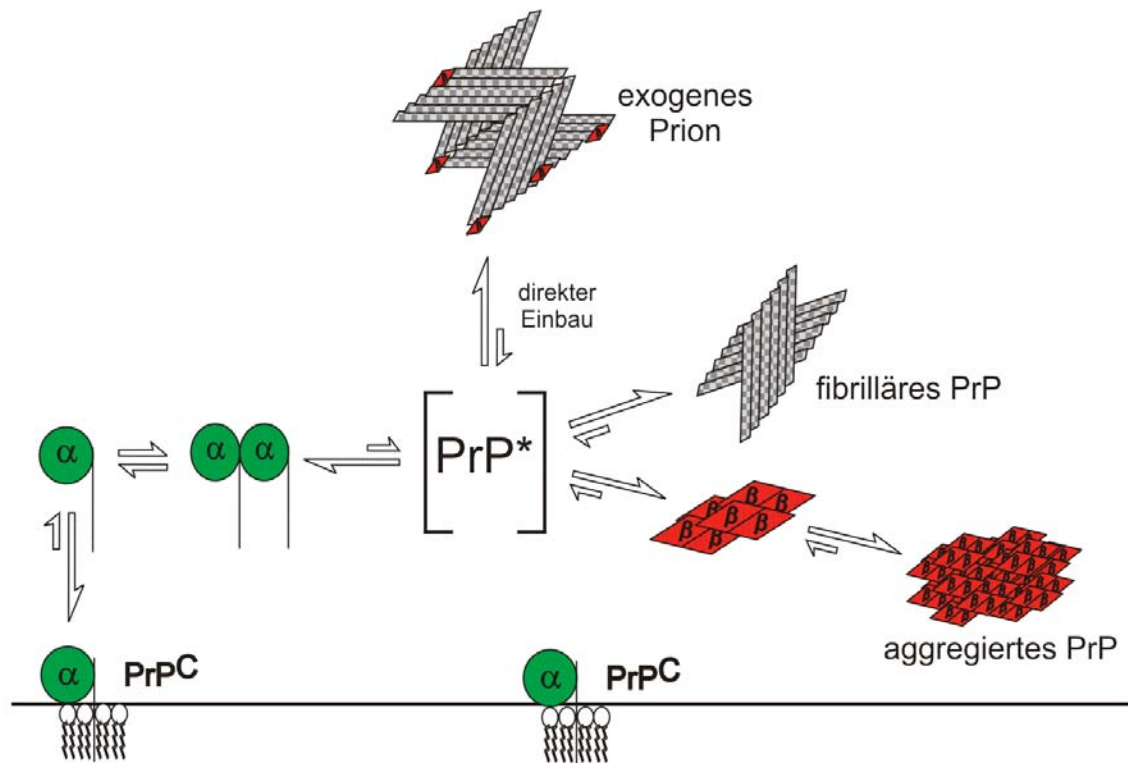


Abb. 1.8. Zwei-Phasen-Modell. Replikationsmodell unter Berücksichtigung der Verteilung von PrP^{C} zwischen Membranumgebung und Extrazellulärraum.

Wahrscheinlichkeit, wodurch dieses im Extrazellulärraum vorliegende PrP^{C} mit der destabilisierten Form PrP^* , wie sie im Heterodimer Modell postuliert wird (Abb. 1.6) vergleichbar ist. Alle in Abb. 1.8 aufgeführten Intermediate der Umwandlung konnten experimentell nachgewiesen werden. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Umwandlung ist bei diesem Modell die Bildung der Dimere. Bis zu diesem Punkt laufen die Reaktionen mit viel größerer Wahrscheinlichkeit zu dem membrangebundenen Zustand zurück als zum aggregierten Zustand hin. Die sehr geringe freie Konzentration an PrP^{C} im Extrazellulärraum macht zudem die bimolekulare Reaktion zum Dimer umso langsamer. Wenn durch eine Infektion ein Prion Partikel in den Extrazellulärraum gelangt, könnte sich die Situation verschieben. Durch sehr schnelle Anlagerung eines intermediären Zustandes kommt es zur beschleunigten Neubildung infektiöser Partikel, was dem Modell der keiminduzierten Polymerisation (Abb. 1.7) entspricht.

1.5 Fragestellung

Um den genauen Mechanismus der Konversion von PrP^{C} zu PrP^{Sc} aufzuklären wurden verschiedenste Untersuchungen sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* durchgeführt (s. Kap. 1.3 und 1.4). Bei den *in vitro*-Analysen der Konversion wurde als gereinigtes Protein rekombinant hergestelltes, d.h. in *E. coli* exprimiertes, PrP (rekPrP) verwendet. Wie in Kap. 1.2.3 näher erläutert, wird PrP^{C} allerdings posttranslational durch die Verknüpfung von zwei N-Glykosylierungen und eines Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Ankers (GPI-Anker) modifiziert. Als prokaryotisches Expressionssystem ist *E. coli* nicht in der Lage diese Modifikationen durchzuführen, wodurch *in vitro* Untersuchungen an rekPrP mögliche Einflüsse der Modifikationen auf die Konversion nicht erfassen können. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit die Reinigung von PrP^{C} aus einem eukaryotischen Expressionssystem von CHO-Zellen (chinese hamster ovary) optimiert werden. In CHO-Zellen hergestelltes PrP^{C} (CHO- PrP^{C}) weist sowohl die N-Glykosylierungen, als auch den GPI-Anker auf. Durch die Etablierung eines Protokolls zur Reinigung von vollständig modifiziertem PrP^{C} eröffnen sich verschiedene Möglichkeiten:

1. Für rekPrP(90-231) ist bereits ein *in vitro*-Konversionssystem etabliert und detailliert untersucht worden (s. Kap. 1.3; Abb. 1.5). Bei diesem System wird die Konversion von rekPrP(90-231) durch sehr geringe Mengen des anionischen Detergenz SDS induziert. Durch die Anwendung dieses Konversionssystems auf vollständig modifiziertes CHO- PrP^{C} können somit mögliche Einflüsse der Modifikationen auf den Mechanismus der Konversion untersucht werden.
2. PrP^{C} ist *in vivo* über den GPI-Anker extrazellulär in der Plasmamembran in bestimmten Mikrodomänen, den so genannten rafts, verankert. Wie in Kap. 1.4 (Zwei-Phasen-Modell) näher erläutert, gibt es deutliche Hinweise dafür, dass diese Verankerung von PrP^{C} in der Membran eine entscheidende Rolle bei der Konversion spielt. Deshalb sollte weiterhin das Konversionssystem dahingehend erweitert werden, CHO- PrP^{C} über den GPI-Anker in einer raft-ähnlichen Lipidmembran, als seine natürliche Umgebung, zu verankern. Durch eine derartige Rekonstitution von CHO- PrP^{C} in Modellmembranen würde somit erstmalig ein System für Konversionsanalysen zur Verfügung stehen, dass sowohl die natürliche Lokalisation von PrP^{C} in der Plasmamembran, als auch die Anwesenheit der posttranslational verknüpften Modifikationen von PrP^{C} berücksichtigt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

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

2.2 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

NaPi (Natrium-Phosphat-Puffer)

100 mM Na_2HPO_4

100 mM NaH_2PO_4

wurden durch Titrieren auf den gewünschten pH-Wert von 7,2 eingestellt.

NaAc (Natrium-Acetat-Puffer)

1 mM Na-Acetat/Essigsäure pH 4,0

CBS (Citrat Buffer Sodium)

10 mM Na-Citrat/Citratsäure pH 6,0

137 mM NaCl

CB (Citrat Buffer)

10 mM Na-Citrat/Citratsäure pH 6,0

TBST (Tris Buffer Sodium Tween)

10 mM Tris/HCl pH 8,0

150 mM NaCl

0,01 % Tween 20

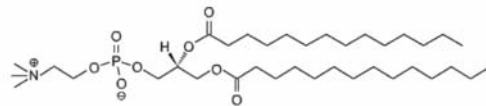
MOPBS (Mops Buffer Sodium)

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

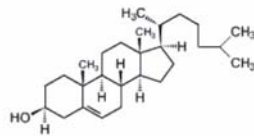
150 mM NaCl

2.3 Lipidstammlösungen

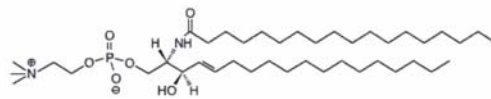
Unterschiedliche Lipide (Avanti Polar Lipids, Inc) und Lipidzusammensetzungen wurden in Chloroform gelöst. Die Lipidkonzentration lag dabei zwischen 5 und 20 mg/ml. Die Lipidlösungen können bei -20°C gelagert werden. Folgende natürliche Lipide wurden in unterschiedlichen Zusammensetzungen verwendet:



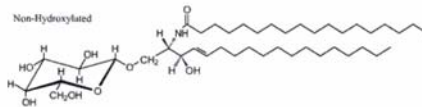
Di-Myristoyl-Phosphatidylcholin
(DMPC)



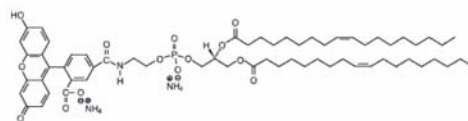
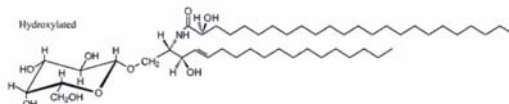
Cholesterol



Sphingomyelin



Cerebroside



Di-Oleoyl-Phosphatidylethanolamin
(Carboxyfluorescein-markiert)
(DOPE-CF)

2.3.1 Zusammensetzung raft ähnlicher Lipidvesikel

Die genaue Zusammensetzung von natürlichen rafts ist bis heute nicht bekannt. Zur Herstellung von raft ähnlichen Modellmembranen findet man aus diesem Grund in der Literatur unterschiedliche Ansätze, die jedoch alle gemeinsam haben, dass sie reich an Sphingomyelin und Cholesterol sind. Folgende Lipidzusammensetzung wurde zur Simulation von rafts gewählt:

DMPC, Sphingomyelin, Cerebroside und Cholesterol in dem molaren Verhältnis 2 : 1 : 1 : 2 (Schroeder *et al.* 1994).

2.3.2 Zusammensetzung und Nachweis fluoreszenzmarkierter Vesikel

Zu 3 mg Lipiden der raft ähnlichen Zusammensetzung wurden zusätzlich 0,2 µg Di-Oleoyl-Phosphatidylethanolamin, welches mit Carboxyfluorescein markiert ist (DOPE-CF) hinzugegeben. Die Detektion dieser Lipidvesikel erfolgte durch Messung der Fluoreszenz (Kontron Spectrofluorometer SFM23) bei einer Excitationswellenlänge von 465 nm und einer Emissionswellenlänge von 525 nm.

2.4 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe einer denaturierenden, diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli können Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook *et al.* (1989). Hierzu wurde eine Hoefer SE 600 Gelelektrophoresekammer von Pharma Biotech (San Francisco, USA) mit vertikalen Plattengelen verwendet. Zunächst wurde ein 12 %iges Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und ein 3 %iges Sammelgel auf das Trenngel gegossen.

Die Proben wurden vor der Auftragung 1:1 mit Auftragspuffer gemischt, 5 Minuten bei 100° C inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte für 30 Minuten bei 180 V und für weitere zwei Stunden bei 300 V oder optional bei 30 V über Nacht (ü. N.). Zur Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteine wurde ein Proteinstandard (Tab. 2.1) aufgetragen.

10 x Laemmli (Gelelektrophoresepuffer)

0,25 M Tris/HCl pH 8,3

1,9 M Glycin

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

Trenngel

380 mM Tris/HCl pH 8,8

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

0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)

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

0,1 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)

Sammelgel

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

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

0,1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)

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

0,1 % APS (Ammoniumperoxodisulfat)

Auftragspuffer nach Laemmli

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

Proteinstandard:

Es wurde der RainbowTM Molekulargewichtsmarker von Amersham Pharmacia Biotech als Proteinstandard mit folgenden Molekulargewichten verwendet:

Molekulargewicht	gefärbte Proteine
14,3 kDa	Lysozym
20,1 kDa	Trypsin-Inhibitor
30,0 kDa	Carboanhydrase
45,0 kDa	Ovalbumin
66,0 kDa	Rinderserumalbumin
97,0 kDa	Phosphorylase b
220,0 kDa	Myosin (H-chain)

2.5 Silberfärbung von Proteingelen

Mit Hilfe der Silberfärbung nach Heukeshoven *et al* (1986) kann bis zu 50 ng Protein pro Bande nachgewiesen werden. Die Silberfärbung von Proteingelen ist sensitiver als die Coomassie-Färbung, sie lässt aber keine quantitativen Aussagen zu.

Fixieren:	50 % Ethanol, 10 % Essigsäure	20 min (optional ü. N.)
Waschen:	10 % Ethanol, 5 % Essigsäure	10 min
Oxidieren:	0,05 % Natriumcarbonat, 0,15 % Kaliumhexacyanoferrat, 0,3 % Natriumthiosulfat	1 min
Waschen:	H ₂ O _{deion}	3x 20 min
Färben:	0,012 M Silbernitrat	20 min
Waschen:	H ₂ O _{deion}	2x 5 min
Entwickeln:	3 % Natriumcarbonat, 0,02 % Formaldehyd,	nach Bedarf
Stop	1 % Essigsäure	10 min

2.6 Dot-Blot

Beim Dot-Blot Verfahren werden die Proteine direkt unter Vakuum auf eine Polyvinylfluorid- (PVDF-) Membran (Millipore GmbH, Neu Isenburg) mit einer Porengröße von 0,45 μ m übertragen. Es wurde eine Apparatur mit 96 Probenlöchern

(S & S Minifold I, Schleicher & Schuell, Dassel) verwendet. Die PVDF-Membran wurde zunächst mit Ethanol aktiviert und anschließend zusammen mit einem Chromatographiepapier (Whatman 3MM Chr) in TBST geschwenkt. Der Aufbau bestand aus der unteren Kammer, dem Chromatographiepapier, der Membran und der oberen 96-Lochplatte. In die Probenlöcher wurden zunächst 100 µl H₂O_{deion} vorgelegt, in die dann die Proben pipettiert wurden. Unter Vakuum wurden dann die Proben durch die Membran gesogen, wobei es zur Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran kommt. Die Detektion erfolgte durch immunologischen Proteinnachweis (s. Kap. 2.8). Da der PrP-spezifische Erstantikörper 3F4 nur denaturiertes Protein erkennt, wurde die Membran vor Durchführung des immunologischen Nachweises für 5 min in 1% KOH geschwenkt.

2.7 Semi-Dry-Blot (Westernblot)

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung können Proteine durch dieses Verfahren auf eine PVDF-Membran transferiert werden. Auch hierbei wurde zunächst die Membran durch schwenken in Ethanol aktiviert. Das Trenngel, sechs Chromatographiepapiere (Whatman 3MM Chr) und die PVDF-Membran wurden zunächst in 1x Laemmli-Puffer ohne SDS geschwenkt. Der Transfer erfolgte in einer "Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell" (Biorad, Hercules, USA) für ca. 1 h bei 1,5 mA/cm² und maximal 25 V und wurde folgendermaßen aufgebaut:

Anode → 3x Whatman → PVDF-Membran → Trenngel → 3x Whatman → Kathode.

Auch hier erfolgte die Detektion durch immunologischen Proteinnachweis.

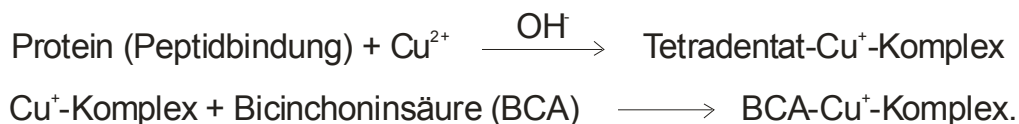
2.8 Immunologischer Proteinnachweis

Die verbliebenen freien Bindeplätze der PVDF-Membran wurden zunächst durch Schwenken für 1 h in 5 % Milchpulver abgesättigt. Dann wurde die Membran kurz mit TBST gewaschen und mit dem jeweils angegebenen PrP-spezifischen Erstantikörper für 2 h bei Raumtemperatur oder optional ü. N. bei 4°C inkubiert. Alle verwendeten Erstantikörper wurden von der Arbeitsgruppe S. B. Prusiner (UCSF, San Francisco) zur Verfügung gestellt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBST gewaschen. Als Nachweisantikörper wurde ein Peroxidase-gekoppelter Zweitantikörper (Sheep anti mouse, bzw. Goat anti human fab; Pierce Biotechnology, Inc.) verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h. Um einen zu starken Hintergrund zu vermeiden, wurde ungebundener Nachweisantikörper durch drei- bis viermaliges Waschen für 10 min mit TBST entfernt. Zum Nachweis wurde die Membran dann mit dem ECL-PlusTM-Detektions-Reagenz (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB) für 1 min benetzt. Dieses Reagenz enthält Luminol, welches durch die an den Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase in alkalischem Medium in einer

Chemolumineszenzreaktion oxidiert wird. Die dabei entstehende Lumineszenz wurde durch Auflegen eines Röntgenfilms (HyperfilmTM ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) mit variierenden Expositionszeiten von 30 sek bis 20 min detektiert.

2.9 Proteinkonzentrationsbestimmung (Micro BCA-Test)

Die Proteinkonzentrationsbestimmung mit Hilfe des Micro BCATM-Testes (Pierce, Rockford, Illinois, USA) beruht auf einer quantitativen kolorimetrischen Methode. In alkalischer Umgebung reduzieren Proteine Cu^{2+} zu Cu^{1+} . Zwei Bicinchoninsäure (BCA)-Moleküle bilden dann mit Cu^{1+} einen Chelatkomplex, der bei 562 nm absorbiert:



Lösungen:

Micro BCATM Reagenz A:	Natriumcarbonat, Natriumdicarbonat, Natriumtartrat, 0,2 N NaOH
Micro BCATM Reagenz B:	4 %ige Bicinchoninsäure (BCA)
Micro BCATM Reagenz C:	4 %ige Kupfersäure in Pentahydratwasser
Albuminstandard:	2 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA) in 0,9 %iger Kochsalzlösung, 0,05 % Natriumazid
Reaktionslösung:	25 Teile Micro BCA TM Reagenz A, 24 Teile Micro BCA TM Reagenz B, 1 Teil Micro BCA TM Reagenz C

Eine 1:1 Mischung aus Proteinlösung und Reaktionslösung wird zunächst für eine Stunde bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wird die Absorption bei 562 nm gemessen. Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wird parallel eine BSA-Verdünnungsreihe gemessen und eine Eichgerade erstellt.

2.10 Chinesische Hamster Ovarien (CHO)-Zellkultur

Transfizierte Chinesische Hamster Ovarien (CHO)-Zellen wurden von dem Labor von S.B. Prusiner (UCSF, San Francisco, USA) zur Verfügung gestellt. Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter der Microflow-Sicherheitswerkbank Klasse II (Nunc GmbH, Wiesbaden Biebrich). Die Suspensionskulturen wurden in Rührflaschen

(Bellco Glass Inc., USA) in einem CO₂-Inkubator (Nunc GmbH, Wiesbaden Biebrich) bei 2 % CO₂, 37°C und 75 rpm angezogen. Zur Ermittlung der Lebend-Zellzahl wurde die Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau-Lösung (Life-Technologies, Eggenstein) versetzt. Trypanblau kann lediglich bei abgestorbenen Zellen die Zellmembran passieren, was zu einer Färbung abgestorbener Zellen führt und dient somit zur Bestimmung der Lebendzellzahl. Die lebenden Zellen wurden dann unter dem Mikroskop mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt. Die Zellkonzentration kann bei dieser Zählkammer mit folgender Formel berechnet werden:

$$N = \frac{n \cdot x}{y} \cdot 10^4 (\text{Zellen} / \text{ml})$$

mit:

- n = Anzahl gezählter Zellen
- x = Verdünnungsfaktor
- y = ausgezählte Großquadrate
- N = Zellkonzentration.

2.10.1 Selektions- und Amplifikationssystem

CHO-Zellen benötigen für ihr Überleben und Wachstum Glutamin. Dieses kann entweder aus dem Medium bezogen werden oder von der zelleigenen Glutaminsynthetase (GS) aus Glutamat und Ammonium synthetisiert werden:



Das Medium enthält kein Glutamin, so dass nur solche Zellen überleben können, die ausreichenden Mengen an GS exprimieren. Zur Selektion kommt es, da die Zellen mit einem Vektor transfiziert wurden, der neben dem PrP^C-Gen das GS-Gen enthält. CHO-Zellen enthalten allerdings eine endogene GS. Um diese zu inhibieren wird dem Medium als GS-Inhibitor L-Methionin-Sulfoximin (MSX) zugegeben (Sanders *et al.*, 1984). So können nur Zellen überleben, die den Vektor inkorporiert haben und genügend GS exprimieren, um die Inhibierung durch MSX überwinden zu können. Die endogene GS hingegen liegt in so geringen Konzentrationen vor, dass sie in Zellen, die nicht transfiziert wurden, vollständig inhibiert wird. Die Expression der GS und des PrP^C kann durch Erhöhen der MSX-Konzentration gesteigert werden. Durch Optimierung der MSX-Konzentration kann eine maximale Amplifikation erreicht werden (Blochberger *et al.*, 1997).

gebracht. In 1 ml großen Fraktionen werden die Stabilate erst 3-5 Tage bei -20°C , dann für weitere 3-5 Tage bei -70°C und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

Der Stabilisierungspuffer setzt sich aus CHO-Zellkulturmedium (s. Kap. 2.9.2) zusammen, dass mit 10 % Dimethylsulfoximin (DMSO) und 45 % fätalem Kälber Serum (FCS) versetzt wurde.

DMSO verhindert die Kristallbildung. Es ist außerdem aber bei Raumtemperatur zelltoxisch. Aus diesem Grund muss die Herstellung der Stabilate schnell und bei 4°C erfolgen.

Um die Stabilate wieder in Kultur zu bringen, wurden sie nach dem Auftauen sofort mit CHO-Zellkulturmedium verdünnt und die Zellen pelletiert. Das Pellet wird in CHO-Zellkulturmedium aufgenommen und die Lebend-Zellzahl bestimmt.

2.11 Reinigung von CHO-PrP^C

Vor jeder Reinigung wurden die Zellen bei $250 \times g$ (GA-3.8 Rotor, Beckman, Palo Alto, USA) pelletiert. Die Zellpellets können bei -20°C gelagert werden. Sämtliche Schritte des Reinigungsprotokolls wurden bei 4°C durchgeführt.

2.11.1 Solubilisierung von CHO-PrP^C

Parallel zur Lyse der CHO-Zellen wurde das in der Membran verankerte PrP^C aus der Membran solubilisiert. Dies geschah durch Aufnehmen von 4×10^9 pelletierten Zellen in 100 ml Solubilisierungspuffer und Schwenken für 1 h bei 4°C . Dieser Puffer enthält neben den solubilisierenden Detergentien DOC und NP40 verschiedene Protease-Inhibitoren, um die Proteine vor Abbau zu schützen. Die unlöslichen Bestandteile wurden dann bei $250 \times g$ (GA-3.8 Rotor, Beckman, Palo Alto, USA) pelletiert. Im Überstand befindet sich dann solubilisiertes PrP^C (im Folgenden als Solubilisat bezeichnet).

Solubilisierungspuffer:

10 mM	NaP _i pH 7,5	2 mM	PMSF
0,5 mM	MgCl ₂	1 mM	EDTA
1 µM	Pepstatin	0,5 %	Desoxycholat (DOC)
1 µM	Leupeptin	0,5 %	NP40

2.11.2 Kupfer-immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographie (Cu²⁺-IMAC)

Die Reinigung von CHO-PrP^C erfolgte mittels zwei Affinitätschromatographien, einer Cu²⁺-IMAC und einer Immunopurifikation. Für die Durchführung der Cu²⁺-IMAC wurde das Solubilisat zunächst auf eine Imidazolkonzentration von 1 mM eingestellt und die Chromatographie wie folgt durchgeführt:

	Lösung	Volumen	Flussrate
Equilibrierung	CuSO ₄ (5 mg/ml)	300 ml	6 ml/min
	H ₂ O _{deion.}	200 ml	6 ml/min
	10 mM Imidazol (Im) in MOPBS	300 ml	6 ml/min
	1 mM Im in MOPBS und 0,2 % Zwittergent (Zw) 3-12	200 ml	4 ml/min
Beladung	Solubilisat (1 mM Im)	30-50 ml	4 ml/min
Waschschritt 1	10 mM Im in MOPBS, 0,15 % Zw 3-12	300 ml	4 ml/min
Waschschritt 2	15 mM Im in MOPBS, 0,15 % Zw 3-12	200 ml	4 ml/min
Elution	150 mM Im in MOPBS, 0,15 % Zw 3-12	100-200 ml	4 ml/min
Regenerierung	50 mM EDTA, 20 mM MOPS, 0,2 M NaCl, 0,15 % Zw 3-12	250 ml	6 ml/min
Lagerung	MOPBS, 2 mM Natriumazid (NaN ₃)	200 ml	6 ml/min

2.11.3 Immunopurifikation

Der zur Immunopurifikation verwendete Antikörper 3F4 wurde von der Arbeitsgruppe von S. B. Prusiner (UCSF, San Francisco) zur Verfügung gestellt. 3F4 wurde an ProteinG-Agarose (ImmunoPure® ProteinG IgG Plus Orientation Kit, Pierce) als Säulenmaterial kovalent gebunden. Diese Verknüpfung erfolgte mit Hilfe des Crosslinkers Disuccinimidylsuberat (DSS) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Immunopurifikation wurde wie folgt durchgeführt:

	Lösung	Volumen	Flussrate
Equilibrierung	MOPBS	100 ml	2 ml/min
	MOPBS; 0,15 % Zw 3-12	100 ml	2 ml/min
Beladung	IMAC-Pool	50-150 ml	0,5 ml/min
Waschschritt	MOPBS, 0,15 % Zw 3-12	50-100 ml	2 ml/min
Elution	0,1 M Essigsäure; 150 mM NaCl, 2,8; Zw 3-12 wie jeweils angegeben	20-50 ml	2 ml/min
Neutralisation	1,5 M Tris/HCl pH 8,8	50 ml	2 ml/min
Lagerung	MOPBS; 2 mM NaN ₃	50 ml	2 ml/min

Sämtliche Chromatographien wurden mit einer Chromatographieanlage (ÄctaPrime, Amersham Pharmacia Biotech) bei 4°C durchgeführt. Die Absorption bei 280 nm wurde während der Chromatographie durch den internen Detektor verfolgt und das Chromatogramm simultan durch einen Schreiber aufgezeichnet. Alle dabei verwendeten Lösungen wurden auf 4°C abgekühlt und kurz vor Verwendung entgast.

2.11.4 Aufkonzentrierung

Das Volumen der aufgereinigten Probe wurde mittels Centricon-Röhrchen (Amicon Inc., Beverly, USA) mit einem Ausschlussvolumen von 10.000 kDa eingengt und dadurch das CHO-PrP^C aufkonzentriert. Weiterhin wurde bei der Aufkonzentrierung ein Pufferwechsel in 1 mM NaAc pH 4,0 vorgenommen. Nach der Aufkonzentrierung erfolgte 4-maliges Waschen mit 1 mM NaAc pH 4,0 um einen kompletten Pufferwechsel zu gewährleisten. Die Proben wurden dann auf ein Volumen von 100-200 µl eingengt. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Micro BCATM-Test (siehe 2.8) wurde das aufgereinigte CHO-PrP^C fraktioniert und bei -70°C gelagert. Dabei enthielten die Fraktion jeweils etwa 0,2 bis 1 µg CHO-PrP^C.

2.12 Enzymatische Behandlungen

2.12.1 Abspaltung der N-Glykosylierungen

Zur enzymatischen Abspaltung der N-Glykosylierungen wurde das Enzym Peptid-N⁴-(N-acetyl-β-glucosaminy)-Asparagin-Amidase (PNGase F) aus *Flavobacterium meningosepticum* (Sigma-Aldrich, Inc.) nach Herstellerangaben verwendet. PNGase F spaltet praktisch alle N-glykosidisch verknüpften Zuckerketten. Ausnahme bilden die Zuckerketten, die mit dem N-terminalen Ende des Peptids verknüpft sind. Durch die Anwesenheit von 0,1 % SDS und 50 mM 2-Mercaptoethanol in der Probe, sowie durch Erhitzen auf 100°C für 5 min werden die Proteine zunächst denaturiert und somit der Zugriff des Enzyms auf die Glykosylierungsstellen erleichtert. PNGase F spaltet die N-glykosidische Bindung zwischen dem proximalen N-Acetyl-Glucosamin (GlcNAc) und der Aminosäure Asparagin. Während die N-Glykane dabei in unveränderter Form freigesetzt werden, wird das Ankermolekül Asparagin zu Asparaginsäure modifiziert.

2.12.2 Verdauung mit Proteinase K

Zur vergleichenden Analyse der Stabilität verschiedener CHO-PrP^C-Konformationen wurden Verdauungen von 10 bis 20 ng/µl CHO-PrP^C mit 2,5 bis 5 ng/µl Proteinase K (Boehringer Mannheim GmbH) in 1x Proteinase K Reaktionspuffer durchgeführt. Die Verdauung erfolgte für unterschiedliche Zeiten zwischen 3 min und 1 h. Die enzymatische Aktivität der Proteinase K wurde durch Einstellen auf 7,5 mM PMSF gestoppt.

10x Proteinase K Reaktionspuffer:

0,5 M Tris/HCl pH 8,0

1 M NaCl

25 mM EDTA

2.13 Löslichkeitsbestimmung durch differentielle Zentrifugation

Die Löslichkeit von Proteinen kann durch differentielle Ultrazentrifugation bestimmt werden. Die Proben werden dafür 1 h bei 100.000 x g (TLA-45 Rotor) und 25 °C in der Beckman Optima TM TL Ultrazentrifuge (Beckman, Palo Alto, USA) zentrifugiert. Partikel, die unter diesen Bedingungen im Überstand verbleiben, gelten als löslich (Hjelmeland *et al.*, 1984). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet in Auftragspuffer aufgenommen. Der relative Proteingehalt in Überstand und Pellet wurde durch Western-Blot bestimmt.

2.14 Circular Dichroismus- (CD-) Spektroskopie

Das Messprinzip der CD-Spektroskopie beruht darauf, dass asymmetrische Moleküle unterschiedliche Extinktionskoeffizienten für links- (ϵ_L) und rechtszirkular- (ϵ_R) -polarisiertes Licht aufweisen. Bei der CD-Spektroskopie wird der Unterschied zwischen diesen Koeffizienten gemessen: $\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R$.

Dieser Unterschied wird meistens in Form der Elliptizität angegeben. Dabei besteht folgender Zusammenhang zwischen $\Delta\epsilon$ und der Elliptizität:

$$\Theta_{(A)} = \ln 10 \frac{180}{2\pi} (\epsilon_L - \epsilon_R) c d$$

mit: Θ = Elliptizität
c = Konzentration
d = Schichtdicke.

Hieraus geht hervor, dass das erhaltene Signal sowohl positive als auch negative Werte annehmen kann, was zu einer sehr scharfen Auflösung der Absorptionsbanden führt. Zu einem CD-Effekt kommt es nur bei optisch aktiven Molekülen, d.h. bei Molekülen deren elektrisches und magnetisches Übergangsdipolmoment nicht genau senkrecht aufeinander stehen.

Verschiedene Sekundärstrukturelemente von Proteinen weisen unterschiedliche asymmetrische Eigenschaften auf und lassen sich somit im CD-Spektrum zuordnen. Informationen über die Sekundärstruktur liefern dabei die Elektronenübergänge der Amidgruppen im Proteinrückgrat im fernen UV-Bereich (~170-260 nm), wohingegen die Elektronenübergänge der aromatischen Seitenketten (~260-290 nm) Aufschluss über die Tertiärstruktur des Proteins geben können. Anhand eines CD-Spektrums ließen sich theoretisch die Anteile der einzelnen Sekundärstrukturelemente berechnen. Da allerdings sowohl die Seitenketten als auch die Größe der einzelnen Sekundärstrukturelemente einen Einfluss auf das gemessene Spektrum nehmen,

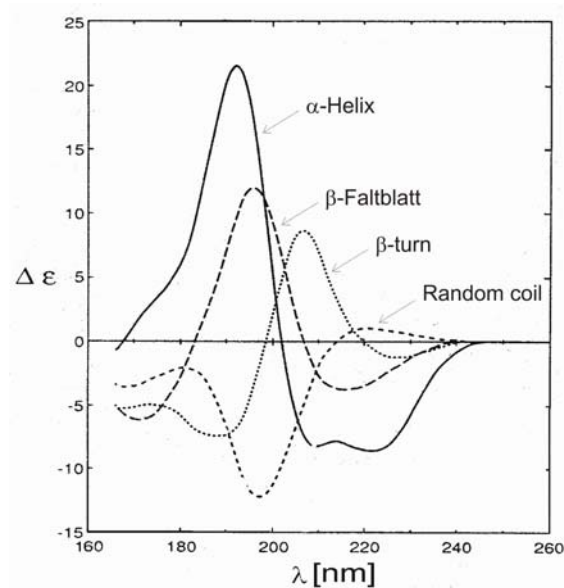


Abb. 2.1: CD-Spektren typischer Sekundärstrukturelemente von Proteinen.
Verändert nach Brahms & Brahms (1980).

lassen sich CD-Spektren nur durch Vergleich mit den Spektren von Proteinen oder Modellpeptiden bekannter Struktur auswerten (s. Abb. 2.1). Zur Bestimmung der absoluten Anteile einzelner Sekundärstrukturelemente ist die CD-Spektroskopie daher nicht gut geeignet, allerdings eignet sie sich sehr gut zur Bestimmung relativer Änderungen der Sekundärstruktur.

Die Messung der Spektren erfolgte mit einem Spektralpharimeter J715 (Jasco Labor- und Datentechnik GmbH, Groß-Umstadt). Es wurden Mikroküvetten einer Schichtdicke von 1 cm (Helma, Mülheim) verwendet. Diese fassen ein Probenvolumen von 75 μl . Die minimale Proteinkonzentration beträgt 10 ng/ μl . Die Spektren wurden von 195 bis 260 nm bei einer Auflösung von 1 nm, einer Responsezeit von 2 s und einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min aufgezeichnet. Dabei wurden je Probe 20 Spektren akkumuliert, gemittelt und gegen das entsprechende Pufferspektrum korrigiert.

2.15 Herstellung kleiner unilamellarer Vesikel (SUV)

Lipidvesikel werden gebildet, wenn dünne Lipidfilme hydratisiert werden, wodurch die gestapelten Bilayer fluide werden und quellen (s. Abb. 2.2). Die hydratisierten Lipidfilme lösen sich von der Oberfläche und formen spontan große multilamellare Vesikel (MLV), da es so zur minimalen Interaktion des Wassers mit den hydrophoben Kohlenwasserstoffketten kommt. Haben sich spontan diese MLV einmal gebildet, so kann die Größe der Vesikel nur durch Energiezufuhr, z.B. durch Ultraschall oder Hochdruckhomogenisation reduziert werden. Dabei entstehen so genannte kleine unilamellare Vesikel (SUV) mit einem Durchmesser von 50-300 nm.

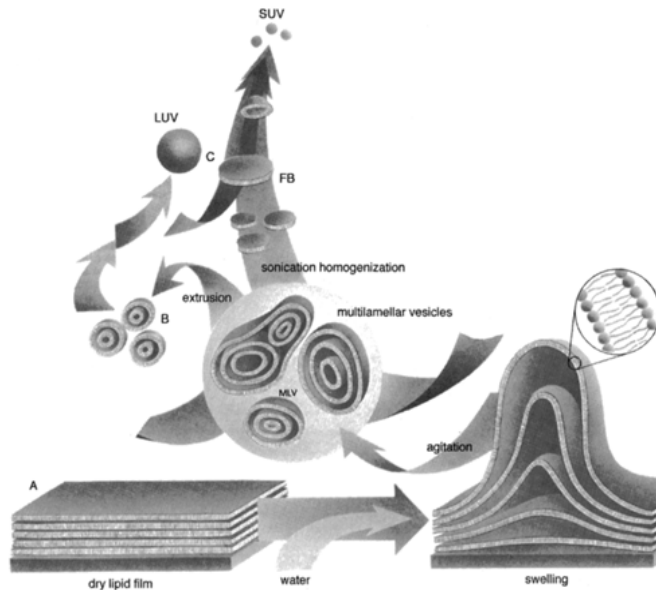


Abb. 2.2: Mechanismus der Vesikelbildung.

Durch Hydratisieren von Lipidfilmen kommt es zur Bildung von MLV. Nur durch Energiezufuhr kann die Größe dieser Strukturen unter der Bildung von SUV reduziert werden (Abbildung von Avanti Polar Lipids, Inc).

2.15.1 Methodik der Vesikelherstellung

Zur Herstellung von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUV) wurden zunächst Lipide in ein konisches Glasgefäß überführt. Da die Lipide in Chloroform vorliegen, ist dabei folgendes zu beachten: Chloroform löst aus Kunststoffen (wie z.B. Eppendorfgefäße und Pipettenspitzen) die darin enthalten Weichmacher. Diese stellen relativ starke Fluorophore dar. Wenn im Folgenden Fluoreszenzuntersuchungen durchgeführt werden sollen, ist also darauf zu achten, dass die Lipid/Chloroform-Lösungen ausschließlich mit Glasgefäßen in Berührung kommen. Aus diesem Grund wurden beim Umgang mit den Lipid-Stammlösungen Glas-Mikropipetten (Brand GmbH + Co, Wertheim) verwendet. Das Lösungsmittel wurde zunächst durch Stickstoffbegasung und anschließend unter Vakuum ü. N. abgedampft. Der entstandene dünne Lipidfilm wurde in CBS (s. 2.2.3) für 2 h bei 37°C hydratisiert. Dadurch entstehen große multilamellare Vesikel (MLV). Durch Ultraschallbehandlung für 30 min mit der Nadelsonde bei der Einstellung „low“ bei 37°C, 40 Watt und einer Frequenz von 0,5 (Labsonic® U, B. Braun Biotech International) können aus den MLV SUV generiert werden (Benes *et al.* 2004). SUV müssen nach der Herstellung direkt verwendet werden, da sie mit der Zeit unter der Bildung von großen unilamellaren Vesikeln (LUV) und schließlich auch von MLV relaxieren.

2.16 Präparative Ultrazentrifugation

SUVs können von einem Probengemisch mit Hilfe eines Saccharose-Gradienten wieder abgetrennt werden. Hierzu wurde die Probe zunächst auf 30% Saccharose

gebracht und dann schrittweise mit je 200 µl 20%, 15%, 10% und 5% Saccharose überschichtet. Die Zentrifugation erfolgte dann für 3 h bei 4°C und 160 000 x g (TLS-55 Rotor, Beckman Optima TM TL Ultrazentrifuge, Palo Alto, USA). Im Anschluß wurde der Gradient zu Proben mit einem Volumen von je 200 µl fraktioniert und das Pellet in Auftragspuffer (s. Kap. 2.4) aufgenommen. Die Saccharosekonzentrationen der resultierenden Fraktionen wurden mit Hilfe eines Refraktometers (Bausch und Lomb, USA) bestimmt.

2.17 Elektronenmikroskopie

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit einem Zeiss EM 910-Transmissionselektronenmikroskop bei einer Beschleunigungsspannung von 100 kV durchgeführt.

2.17.1 Präparatherstellung für das TEM

Als Probenträger wurden mit Formvar beschichtete 200-mesh Kupfernetze (Plano, W. Plannet GmbH, Wetzlar) verwendet, auf die zunächst unter Vakuum eine Kohleschicht aufgebracht wurde. Die Herstellung kleiner unilamellarer Liposomen erfolgte wie in Kapitel 2.15 beschrieben. Dabei betrug die Lipidkonzentration 50 bzw. 100 µg/ml. Etwa 5 µl der Liposomenlösung wurden auf ein Kupfernetz gegeben und die Adsorption erfolgte über einen Zeitraum von 2 min. Wie bereits erwähnt weisen die Atome des Präparates nur geringe Ordnungszahlen auf, so dass es zu keiner hinreichenden Streuung der Elektronenstrahlen kommt. Zur Abbildung macht man sich deshalb das Verfahren der Negativ-Kontrastierung zu Nutzen.

2.17.2 Negativ-Kontrastierung des Präparates

Die Elemente von Kontrastierungsmitteln weisen sehr hohe Ordnungszahlen auf, was zu einer starken Ablenkung der Elektronen führt. Von den verschiedenen Kontrastierungsmitteln, die eingesetzt werden können ist Ammonium-Molybdat am besten geeignet, um fibrilläre Proteine und Membranen anzufärben. Die Färbung beruht hierbei darauf, dass sich das Salz nicht an die Biomoleküle selber anlagern kann. Es kommt also zu einer Färbung des Hintergrundes, wobei die Bereiche um die Biomoleküle am stärksten angefärbt werden. Aus diesem Grund wird diese Art der Färbung als negativ-Kontrastierung bezeichnet.

Zur Anfärbung der adsorbierten Liposomen wurde eine 2,5 %ige (w/v) Ammonium-Molybdat-Lösung verwendet.

2.18 Kinetische Untersuchung von Oberflächenaffinitäten

Die kinetische Analyse der CHO-PrP^C-Membran-Wechselwirkung erfolgte mit Hilfe des Biacore X (Biacore International SA, Freiburg). Das Messprinzip beruht dabei auf dem physikalischen Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz (SPR, surface plasmon resonance), wodurch Prozesse an Metall/Luft- bzw. Metall/Flüssigkeit-Grenzflächen untersucht werden können. Erfasst werden dabei Änderungen des Brechungsindex bis zu einem gewissen Abstand von dem Metallfilm. Dadurch wird eine zeitliche Beobachtung der Adsorption von Molekülen an eine Oberfläche ermöglicht.

Da diese Methode erstmals in der Arbeitsgruppe angewandt wurde, soll sie im Folgenden detailliert beschrieben werden.

2.18.1 Das Phänomen der Oberflächenplasmonresonanz (SPR)

Eine Plasmaschwingung in einem Metall oder Halbleiter ist eine kollektive Anregung des Leitungselektronengases. Das Quant dieser Plasmaschwingung wird als Plasmon bezeichnet, wobei Volumen- und Oberflächenplasmonen unterschieden werden müssen. Volumenplasmonen sind rein longitudinale Schwingungen und können somit nicht durch Licht, sondern nur durch Teilchenstoß angeregt werden. An der Oberfläche bilden Plasmonen jedoch auch einen transversalen Anteil aus, da dort abstoßende Nachbarn fehlen. Oberflächenplasmonen können somit durch Licht angeregt werden.

Praktische Anwendung fand die Oberflächenplasmonresonanz erstmals 1968 durch Otto (Otto, 1968). Dabei gelang es Otto mit Hilfe der abgeschwächten Totalreflexion (ATR) die Oberflächenplasmonresonanz zur Bestimmung des Brechungsindex zu nutzen. Im Prinzip gibt es zwei Anordnungen zur Bestimmung des Brechungsindex auf diese Art: Die Otto-Konfiguration und die Kretschmann-Konfiguration (Kretschmann, 1968), wobei sich letztere bis heute durchgesetzt hat und den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen am Biacore zu Grunde liegt. In den folgenden Kapiteln wird deshalb die Kretschmann-Konfiguration näher erläutert.

2.18.2 Totalreflexion und evaneszentes Feld

Beim Übergang von elektromagnetischer Strahlung von einem optisch dichteren zu einem optisch dünneren Medium wird der Strahl nach dem Gesetz von Snellius

$$\sin \alpha / \sin \beta = n_1 / n_2$$

gebrochen. Es existiert somit ein Grenzwinkel α_G des einfallenden Strahls, bei dem das Licht das optisch dichtere Medium nicht mehr verlassen kann. Nach dem Gesetz von Snellius gilt für diesen Grenzwinkel:

$$\sin \alpha_G = n_1 / n_2.$$

Bei größeren Winkeln wird der Strahl in das optisch dichtere Medium zurückreflektiert. Man spricht hierbei von Totalreflexion.

Aus den Stetigkeitsbedingungen für elektromagnetische Felder folgt, dass das elektromagnetische Feld der totalreflektierten Welle nicht an der Grenzfläche abrupt auf Null abfällt. Experimentell stellten Goos und Hänchen diesen Effekt insofern fest, dass der totalreflektierte Strahl nicht am Ort des Auftreffens, sondern etwas versetzt zurückläuft (s. Abb. 2.3). Dieser Effekt wird als Goos-Hänchen-Verschiebung bezeichnet. Er liegt darin begründet, dass im Fall der Totalreflexion eine entlang der Grenzfläche propagierende Welle entsteht, die exponentiell mit der Eindringtiefe gedämpft wird. Diese Welle im optisch dünneren Medium wird als evaneszentes Feld bezeichnet.

Die Intensität und die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes lassen sich wie folgt beschreiben:

$$I_z = I_0 e^{(-z/d_p)}$$

$$d_p = \frac{\lambda}{4\pi \sqrt{n_1^2 \sin^2 \alpha - n_2^2}}$$

mit I = Intensität
 z = Abstand
 λ = Wellenlänge
 d_p = Eindringtiefe.

Die Intensität der evaneszenten Welle nimmt also exponentiell mit dem Abstand zur Grenzfläche ab. Als Eindringtiefe wird der Abstand von der Grenzfläche bezeichnet, bei dem die Intensität auf I_0/e abgefallen ist. Sie ist abhängig von der Wellenlänge des Lichtes, den Brechungsindizes der beiden Medien und dem Einfallswinkel α . Im Allgemeinen liegen Eindringtiefen von etwa 100-400 nm vor.

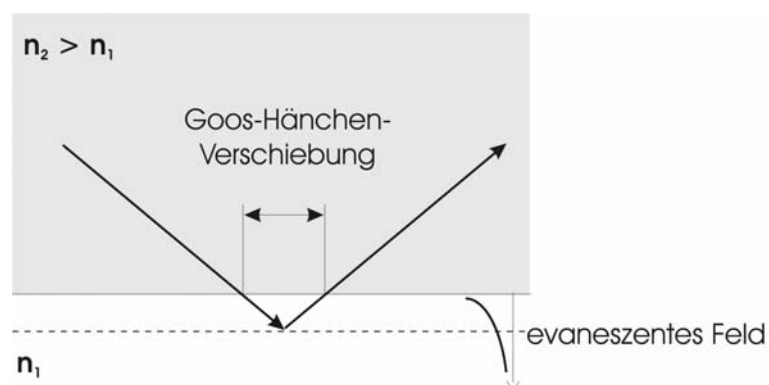
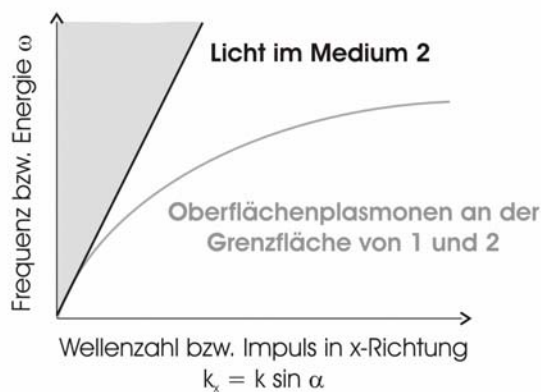


Abb. 2.3: Entstehung eines evaneszenten Feldes. Bei Totalreflexion entsteht eine entlang der Grenzfläche propagierende Welle, die exponentiell mit der Eindringtiefe gedämpft wird.

2.18.3 Anregung nichtstrahlender Oberflächenplasmonen durch abgeschwächte Totalreflexion

Im Fall der Totalreflexion ist die Intensität des reflektierten Strahls gleich der Intensität des einfallenden Strahls. Gibt man dem evaneszenten Feld allerdings die Möglichkeit zur Wechselwirkung, so kann Energie übertragen werden, was zu einer Abnahme der Intensität des reflektierten Strahls führt. Man bezeichnet dies als abgeschwächte Totalreflexion. Die Energieübertragung kann z. B. an einer Metalloberfläche durch Anregung von Oberflächenplasmonen erfolgen. Zum Energietransfer kommt es dabei durch eine Kopplung des Lichtimpulses mit dem Impuls der entstehenden Plasmonen, wobei die parallel zur Einfallsebene liegende Komponente des Lichtimpulses $\hbar k_x$ auf

A



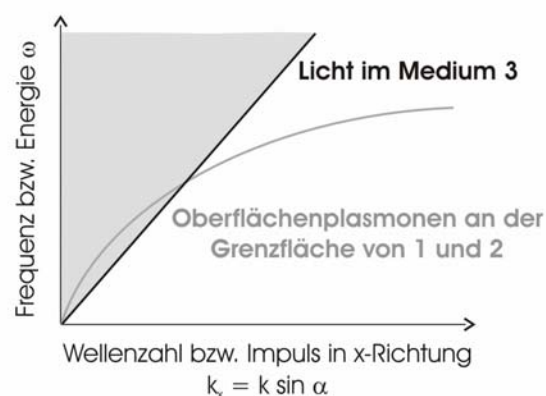
Licht:

$$\omega(k) = \frac{k_x}{\sin \alpha} c \sqrt{\frac{1}{n_2}}$$

Oberflächenplasmon:

$$\omega(k) = k_x c \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$$

B



Licht:

$$\omega(k) = \frac{k_x}{\sin \alpha} c \sqrt{\frac{1}{n_3}}$$

Oberflächenplasmon:

$$\omega(k) = k_x c \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$$

Abb. 2.4: Resonanzbedingungen für Oberflächenplasmonen.

A Dispersionsrelationen von anregendem Licht im Medium 2 und Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche von Medium 1 und Medium 2: Da kein Schnittpunkt existiert, kann keine Anregung der Plasmonen erfolgen. **B** Dispersionsrelationen von anregendem Licht in hochbrechendem Medium 3 und Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche von Medium 1 und Medium 2: An dem Schnittpunkt ist eine Anregung der Oberflächenplasmonen möglich (Oberflächenplasmonresonanz).

das Oberflächenplasmon übertragen wird. Aufgrund der Impuls- und Energieerhaltung müssen sich hierfür die Dispersionsrelationen von anregendem Licht und Oberflächenplasmonen schneiden (s. Abb. 2.4). Dies ist für Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche von Medium 1 und 2 und anregendem Licht im Medium 2 nicht möglich (s. Abb. 2.4 A), denn bei maximalem Einfallswinkel läuft die Lichtgerade tangential zur Dispersionskurve der Oberflächenplasmonen und bei kleineren Einfallswinkeln im grauen Bereich. Die Steigung der Lichtgeraden lässt sich allerdings durch die Wahl eines hochbrechenden Mediums 3, in dem sich das Licht ausbreitet verringern (s. Abb. 2.4 B). Die Anregung der Oberflächenplasmonen durch das evaneszente Feld des totalreflektierten Lichtes ist somit möglich. Man spricht dabei von Oberflächenplasmonresonanz.

2.18.4 Kretschmann-Konfiguration

Die Kretschmann-Konfiguration (s. Abb. 2.5) ist eine der beiden möglichen Anordnungen für die Medien 1, 2 und 3. Als hochbrechendes Medium 3 dient ein Prisma. Auf das Prisma wird direkt eine dünne Metallschicht als Medium 2 aufgebracht. Diese Konfiguration nutzt die Tatsache aus, dass das evaneszente Feld des Lichtes in der Lage ist eine sehr dünne Metallschicht zu durchdringen. Aus diesem Grund weist der Metallfilm eine Dicke von nur etwa 50 nm auf. Die Oberflächenplasmonen können dann an der Grenzfläche von Metallfilm und Umgebungsmedium 1 angeregt werden. Auf der dem Prisma zugewandten Seite können keine Plasmonen angeregt werden, da sich dort die Lichtgerade und die Dispersionskurve der Plasmonen nicht schneiden.

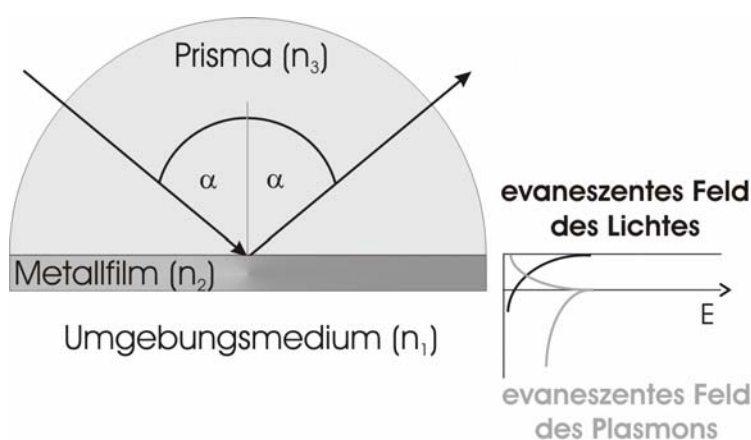


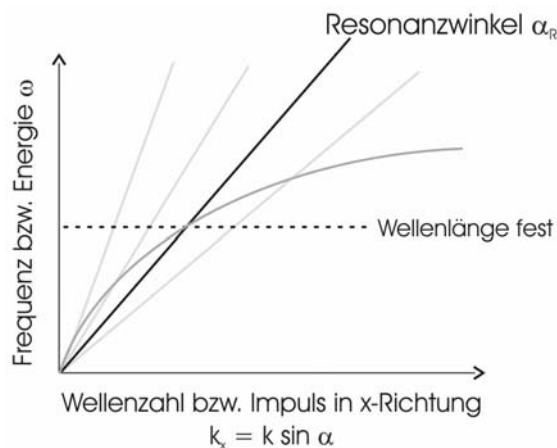
Abb. 2.5: Kretschmann-Konfiguration.

Das Prisma ist mit einem dünnen Metallfilm überzogen. Das evaneszente Feld des totalreflektierten Lichtes kann diese Schicht durchdringen und an der Oberfläche des Metallfilms Plasmonen anregen.

2.19 Messprinzip und Aufbau des Biacore

Bei dem Biacore erfolgt die SPR-Messung winkelaufgelöst. Da der Resonanzfall sowohl von dem Einfallswinkel, als auch von der Wellenlänge des Lichtes abhängt, muss zur winkelaufgelösten Messung die Anregungsenergie durch die Verwendung von monochromatischem Licht vorgegeben werden. Der Einfallswinkel wirkt sich direkt auf die Steigung der Lichtgeraden aus und es existiert bei fester Wellenlänge genau ein Resonanzwinkel, der zur Anregung der Oberflächenplasmonen führt (s. Abb. 2.6). Die Dispersionskurve der Oberflächenplasmonen hängt von dem Brechungsindex n_1 des Umgebungsmediums ab. Eine Änderung dieses Brechungsindex lässt sich also über die Messung eines veränderten Resonanzwinkels detektieren.

Der Aufbau des Biacore ist in Abb. 2.7 dargestellt. Die Oberflächenplasmonen werden an der Oberfläche einer Goldschicht angeregt. Änderungen des Brechungsindex innerhalb des evaneszenten Feldes des Plasmons können somit durch einen veränderten Resonanzwinkel detektiert werden. Die Bindung eines Analyten an eine Oberfläche bewirkt eine Änderung im Brechungsindex, was zu einer Verschiebung des Resonanzwinkels führt. Das resultierende Signal wird über die Zeit aufgezeichnet, wodurch eine kinetische Beobachtung der Adsorption eines Analyten an eine Oberfläche beobachtet werden kann.



Licht:

$$\omega(k) = \frac{k_x}{\sin \alpha} c \sqrt{\frac{1}{n_3}}$$

Oberflächenplasmon:

$$\omega(k) = k_x c \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}$$

Abb. 2.6: Prinzip der winkelaufgelösten SPR-Messung.

Bei Verwendung von monochromatischem Licht lassen sich über die Bestimmung des Resonanzwinkels Änderungen des Brechungsindex n_1 des Umgebungsmediums innerhalb des evaneszenten Feldes der Oberflächenplasmonen feststellen.

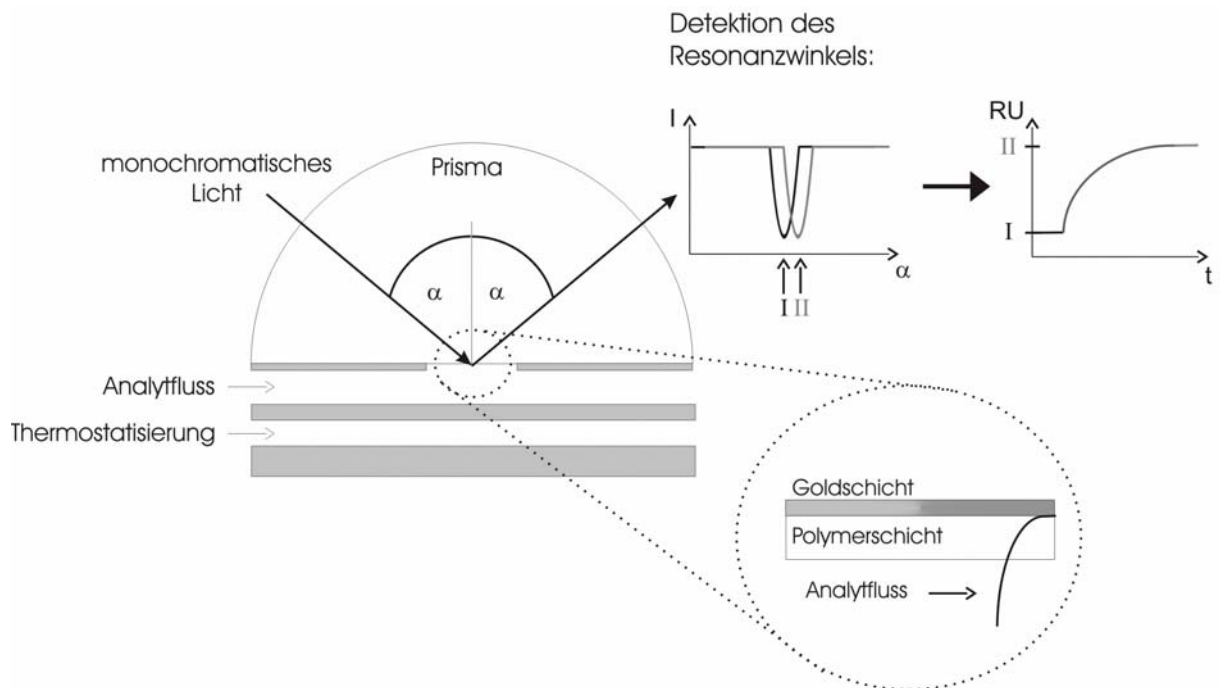


Abb. 2.7: Aufbau und Messprinzip des Biacore.

Die Bindung eines Analyten an die Oberfläche führt zu einer Änderung des Resonanzwinkels. Diese Änderung wird in Form des RU-Signals über die Zeit aufgezeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Reinigung von PrP^C aus CHO-Zellkultur

Die Reinigung von PrP^C, das in CHO-Zellen exprimiert wird, basiert auf einem bereits etablierten Protokoll (Elfrink, 2001; Elfrink und Riesner, 2004). Der Vorteil dieses Systems liegt darin begründet, dass CHO-Zellen, als eukaryotisches System, in der Lage sind das exprimierte PrP^C posttranslational durch Verknüpfung des GPI-Ankers und der N-Glykosylierungen zu modifizieren. Die Reinigung des solubilisierten PrP^C erfolgt mittels zwei Affinitätschromatographien (s. Abb. 3.1), einer immobilisierten Metall-Chelat-Affinitätschromatographie und einer Immunopurifikation. Im letzten Schritt wird das gereinigte Protein dann aufkonzentriert.

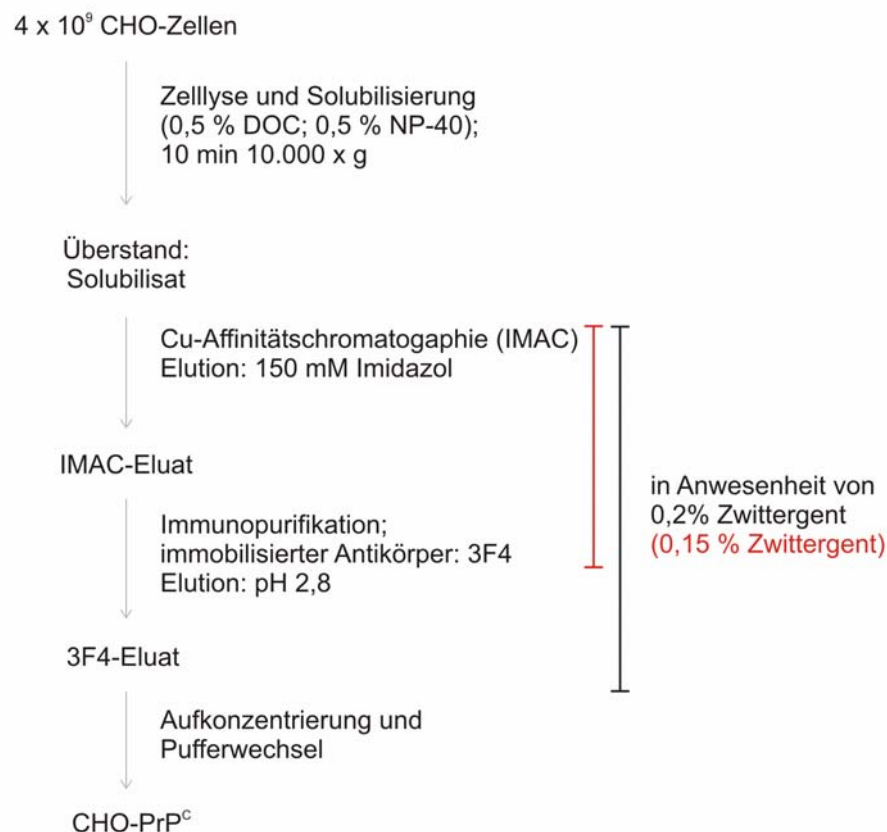


Abb. 3.1: Protokoll zur Reinigung von CHO-PrP^C.

Das Protokoll umfasst zunächst die Zelllyse und die Solubilisierung der Membranproteine. Die Reinigung erfolgt über zwei Affinitätschromatographien. Um ein Ausfallen des PrP^C zu verhindern, werden diese in Anwesenheit von Zwittergent durchgeführt. Im letzten Schritt wird das gereinigte Protein aufkonzentriert und auf den gewünschten Puffer eingestellt. In rot sind die in dieser Arbeit eingeführten Optimierungen dargestellt.

3.1.1 Charakterisierung der Reinigungsschritte

3.1.1.1 Immobilisierte Metall-Chelat-Affinitätschromatographie (IMAC)

Der Reinigungseffekt der IMAC liegt darin begründet, dass PrP^C ein Kupfer-bindendes Protein ist (Vgl. Kap. 1.2.4). So wurde vor jeder Chromatographie Cu²⁺ an der Säulenmatrix komplexiert. Abb. 3.2 A zeigt das Chromatogramm einer Cu²⁺-IMAC. Im Durchfluss befinden sich Proteine, die nicht an Cu²⁺ binden. Anschließend wurde die Säule mit 10 mM Imidazol gewaschen. Imidazol konkurriert dabei um die Cu²⁺-Bindeplätze, wodurch Proteine mit geringer Kupfer-Affinität eluiert werden. Im nächsten Schritt wurde die Stringenz durch Waschen mit 15 mM Imidazol erhöht. Die Elution der Proteine mit hoher Kupfer-Affinität erfolgte schließlich durch Erhöhung der Imidazol-Konzentration auf 150 mM. Wie Abb. 3.2 B zeigt, befinden sich im Durchfluss (Spur 2) auch geringe Mengen an CHO-PrP^C. Ein größerer Verlust tritt jedoch während des ersten Waschschrilles mit 10 mM Imidazol auf (Spur 3). Bei dem zweiten Waschschriff mit 15 mM Imidazol ist kein Verlust an CHO-PrP^C detektierbar (Spur 4). Spur 5 zeigt bei 150 mM Imidazol eluiertes CHO-PrP^C.

Der Vergleich von Spur 3 und Spur 5 zeigt, dass in diesen Fraktionen enthaltenes CHO-PrP^C von unterschiedlichem Molekulargewicht ist. So wird durch eine Konzentration von 10 mM Imidazol CHO-PrP^C einer Größe von etwa 29-33 kDa

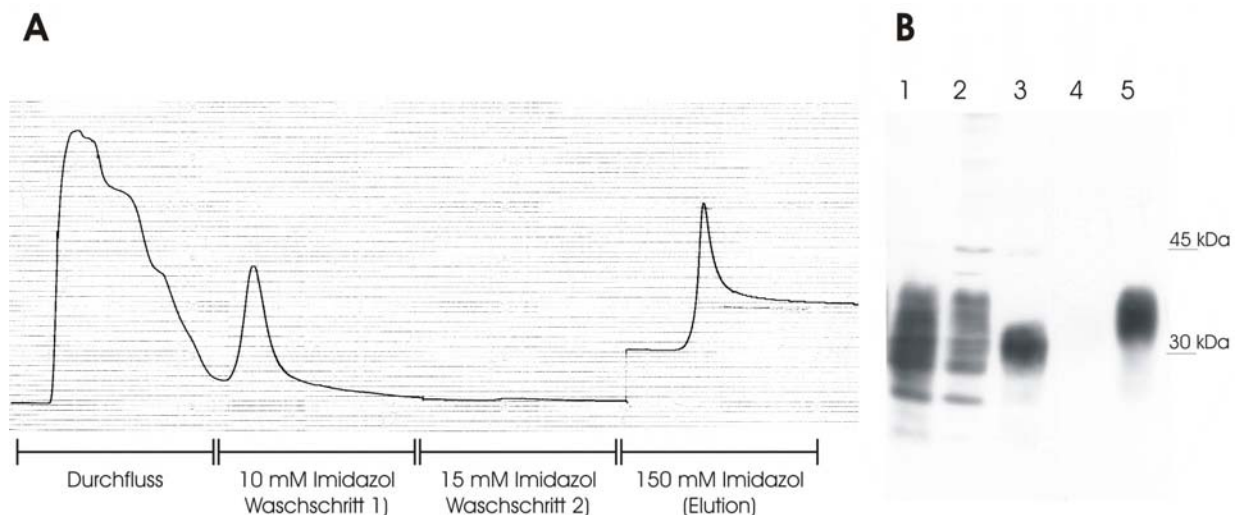


Abb. 3.2: Charakterisierung der Cu²⁺-IMAC.

A Chromatogramm: Die relative Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde während der Chromatographie verfolgt. Bei der Elution wurde die Empfindlichkeit des Schreibers verdoppelt.

B Westernblot (Detektionsantikörper: 3F4): Analyse des relativen CHO-PrP^C-Gehaltes der einzelnen Fraktionen. **1** Solubilisat als Ausgangsmaterial (relativer Volumenanteil:1x). **2** Durchfluss (3x). **3** Waschschriff 1 (3x). **4** Waschschriff 2 (3x). **5** Elution (2x).

eluiert, wohingegen bei 150 mM Imidazol eluiertes CHO-PrP^C eine Größe von etwa 34-38 kDa aufweist. Es konnten somit zwei verschiedene CHO-PrP^C-Populationen mit unterschiedlicher Kupfer-Affinität nachgewiesen werden. Für die folgenden Schritte der Reinigung wurde lediglich die Population mit höherer Kupfer-Affinität und einem Molekulargewicht von 34-38 kDa eingesetzt, da diese Population aus CHO-PrP^C besteht, welches die volle Länge aufweist und sämtliche posttranslationalen Modifikationen trägt.

3.1.1.2 Immunopurifikation

Zur Immunopurifikation wurde der Antikörper 3F4 an eine Protein G-Säule gekoppelt. Protein G bindet dabei an die konstante Region des Antikörpers. Durch kovalente Verknüpfung des Antikörpers und Protein G entsteht so eine stabile Protein G-3F4-Säule, über welche das Eluat einer IMAC vollständig gereinigt werden kann. Abb. 3.3 A zeigt ein Chromatogramm einer solchen Immunopurifikation.

Nachdem das IMAC-Eluat auf die Protein G-3F4-Säule gegeben wurde, wurde bei einem pH-Wert von 7,0 bis zum Erreichen einer konstanten Absorption gewaschen. Durch Erniedrigung des pH-Wertes auf 2,8 kann schließlich die Wechselwirkung zwischen Antikörper und Antigen aufgehoben werden, wodurch gebundenes CHO-PrP^C eluiert wird. Nach Aufkonzentrierung des so gereinigten CHO-PrP^C wurde die Reinheit mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung bestimmt (s. Abb. 3.3 C). Hierbei sind keine anderen Proteine neben CHO-PrP^C zu detektieren.

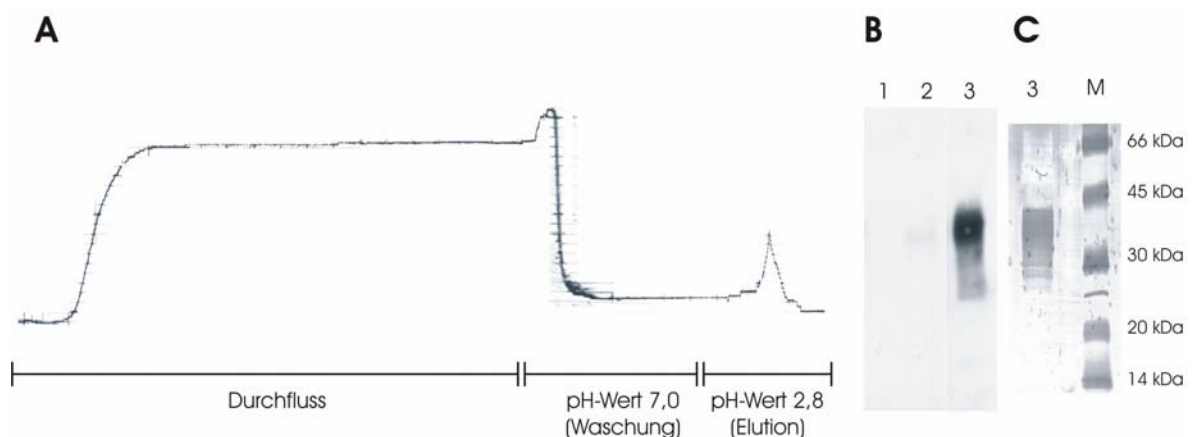


Abb. 3.3: Charakterisierung der Immunopurifikation.

A Chromatogramm: Die relative Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde während der Chromatographie verfolgt. Während der Elution wurde die Empfindlichkeit des Schreibers verdreifacht.

B Westernblot (Detektionsantikörper: 3F4): Analyse des relativen CHO-PrP^C-Gehaltes. **1** Durchfluss (relativer Volumenanteil: 1x). **2** Waschung (2x). **3** Elution (10x).

C Silberfärbung: Analyse der Reinheit des präparierten CHO-PrP^C. **3** Aufkonzentrierte Elution. **M** Molekulargewichtsstandard.

Wie im folgenden Kapitel näher erläutert wird, stellte sich allerdings heraus, dass auf diese Art gereinigtes CHO-PrP^C trotz des hohen Reinheitsgrades nicht für weitere *in vitro*-Konversionsanalysen geeignet ist. Das Reinigungsprotokoll wurde aus diesem Grund zwar nicht bezüglich der Reinheit und der Ausbeute an CHO-PrP^C, jedoch bezüglich der Pufferbedingungen der gereinigten Probe optimiert.

3.1.2 Optimierung der CHO-PrP^C-Reinigung

Zunächst sollte die Konversion von CHO-PrP^C *in vitro* durch sehr geringe Mengen an SDS (Vgl. Kap. 1.2.2) induziert werden. Die Umwandlung von der löslichen in die aggregierte Form wurde dabei durch Ultrazentrifugation bei 100.000 x g für 1 h analysiert. Es stellte sich allerdings heraus, dass durch Verdünnung des SDS bis hin zu sehr niedrigen Konzentrationen (0,001 %) keine Aggregation des löslichen CHO-PrP^C induziert werden konnte. Der Versuch, die CHO-PrP^C-Aggregation durch Zugabe von spezifischen Keimen in Form von bereits aggregiertem rekPrP(90-231) zu induzieren schlug ebenfalls fehl (s. Abb. 3.4 A). Bei derartigen Ansätzen konnte sogar eine Zunahme der Löslichkeit der zugegebenen Keime beobachtet werden, d.h. durch die

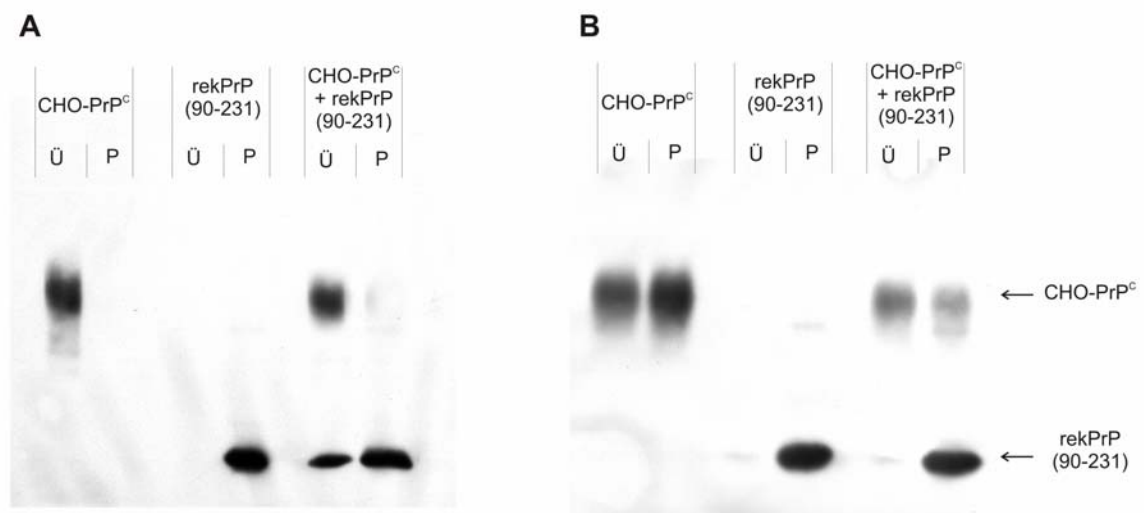


Abb. 3.4: Einfluss von verschiedenen CHO-PrP^C-Präparationen auf die Löslichkeit von rekPrP(90-231)-Keimen.

A Die Reinigung von CHO-PrP^C erfolgte nach dem ursprünglichen Protokoll (s. Abb. 3.1).

B Die Reinigung von CHO-PrP^C erfolgte nach dem optimierten Protokoll.

Die Ansätze wurden auf 0,001 % (**A**), bzw. 0,01 % (**B**) SDS eingestellt und für 20 h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 1 h bei 100.000 x g zentrifugiert und in Überstand (Ü) als lösliche und Pellet (P) als unlösliche Fraktion getrennt. Die Analyse der relativen PrP-Gehalte der einzelnen Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot (Detektionsantikörper: 3F4).

Zugabe von löslichem CHO-PrP^C wurde ein Teil der rekPrP(90-231)-Aggregate in eine lösliche Form überführt. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass bei der Aufkonzentrierung, als letzter Schritt der Reinigung, neben CHO-PrP^C auch das Detergenz Zwittergent aufkonzentriert wird. Dadurch entstehende hohe Konzentrationen an Zwittergent inhibieren die Aggregation des CHO-PrP^C und bringen aggregiertes rekPrP(90-231) zum Teil wieder in Lösung. Das Protokoll musste also hinsichtlich der Detergenz-Konzentration in der gereinigten Probe optimiert werden. Die Anwesenheit von Zwittergent während der gesamten Reinigung ist notwendig, um ein Ausfallen des CHO-PrP^C zu verhindern. Jedoch konnte die Konzentration von 0,2 auf 0,15 % Zwittergent erniedrigt werden. Des Weiteren konnte bei dem Elutionsschritt der Immunopurifikation, der bei einem pH-Wert von 2,8 abläuft, auf die Zugabe von Zwittergent gänzlich verzichtet werden, da PrP^C bei sauren pH-Werten in löslicher Form vorliegt. Der Wechsel auf einen Zwittergent-freien Puffer erfolgt somit bereits vor der Aufkonzentrierung des Proteins (Vgl. Abb. 3.1). Dadurch ist allerdings zu beachten, dass das gereinigte CHO-PrP^C bei dem anschließenden Pufferwechsel nicht mehr auf einen neutralen pH-Wert eingestellt werden kann, da dies zur Aggregation von CHO-PrP^C führen würde. Aus diesem Grund wurde der Puffer auf 1 m NaAc mit einem pH-Wert von 4,0 eingestellt.

Um die Entfernung von Zwittergent durch das optimierte Reinigungsprotokoll zu kontrollieren, wurde erneut der Einfluss von CHO-PrP^C auf rekPrP(90-231)-Aggregate untersucht (s. Abb. 3.2 B). Die Aggregation von rekPrP(90-231) wurde dabei durch Einstellen auf 0,01 % SDS induziert. Dabei zeigte sich, dass die Zugabe von CHO-PrP^C keinen Einfluss auf den Löslichkeitszustand von rekPrP(90-231) hat, was für eine Detergenz-freie Präparation von CHO-PrP^C spricht. Weiterhin stellte sich heraus, dass CHO-PrP^C unter diesen Bedingungen bereits zum Teil in aggregierter Form vorliegt. Dies bedeutet, dass nach dem optimierten Protokoll gereinigtes CHO-PrP^C zur Konversion unter der Ausbildung von Aggregaten gebracht werden kann (Vgl. Kap. 3.2).

Es ist somit gelungen, die Reinigung von CHO-PrP^C aus Zellkultur dahingehend zu optimieren, dass die gereinigte Probe keine Detergentien enthält und dass CHO-PrP^C in löslicher Form vorliegt (Elfrink und Riesner, 2004). Dies erlaubt es unterschiedliche Bedingungen direkt einzustellen, wodurch gereinigtes CHO-PrP^C für verschiedenste Versuchsansätze eingesetzt werden kann.

3.2 CHO-PrP^C-Konversion

Wie in Kapitel 1.2.2 näher erläutert, weisen die beiden Isoformen des Prion Proteins, PrP^C und PrP^{Sc} Unterschiede hinsichtlich ihrer strukturellen und physikalisch-chemischen Eigenschaften auf. So liegt PrP^C in milden Detergentien in löslicher Form vor, während PrP^{Sc} unlösliche Aggregate bildet. Auch hinsichtlich der Sekundärstruktur gibt es eindeutige Unterschiede: PrP^C weist strukturell einen hohen α -helikalen Anteil auf, wohingegen PrP^{Sc} einen deutlich erhöhten β -Faltblatt-Anteil besitzt. Des Weiteren wird PrP^C durch enzymatische Verdauung mit Proteinase K (PK) vollständig abgebaut, PrP^{Sc} hingegen akkumuliert als C-terminal resistentes Fragment (PrP 27-30), dass etwa von Aminosäure 90 bis Aminosäure 231 reicht. Die Konversion von CHO-PrP^C zu einer PrP^{Sc}-ähnlichen Konformation lässt sich also anhand dieser verschiedenen Eigenschaften identifizieren.

Die Induktion der Konversion erfolgte dabei mittels des in Kap. 1.2.5 erörterten SDS-Konversionssystems. Für rekPrP(90-231) ist dieses System bereits ausführlich untersucht (Jansen *et al.* 2001). So konnte durch schrittweise Verdünnung der SDS-Konzentration ein struktureller Übergang von rekPrP(90-231) zu einem erhöhten β -Faltblatt-Anteil unter Ausbildung hochmolekularer Aggregate induziert werden. Weiterhin konnten bei diesem Übergang ein lösliches Dimer von überwiegend α -helikaler Struktur und ein lösliches Oligomer mit einem erhöhten β -Faltblatt-Anteil als Intermediate identifiziert werden (Vgl. Abb. 1.5).

3.2.1 Induktion der Konversion durch Verdünnung der SDS-Konzentration

Die *in vitro*-Konversion wurde zunächst anhand des Löslichkeitszustandes und der Sekundärstruktur von CHO-PrP^C untersucht (s. Abb. 3.5). Hierzu wurde das gereinigte CHO-PrP^C, das bei einem pH-Wert von 4,0 vorliegt, zunächst auf 0,1 % SDS bei einem pH-Wert von 7,2 eingestellt und anschließend die Konzentration an SDS zunächst auf 0,05 % verdünnt. Unter diesen Bedingungen liegt CHO-PrP^C in löslicher Form vor. Wie die CD-spektroskopischen Analysen zeigen, weist die Sekundärstruktur des löslichen CHO-PrP^C einen sehr hohen α -helikalen Anteil auf. Nach einer Inkubationszeit von 20 h spiegelt das CD-Spektrum jedoch eher eine teildenaturierte Struktur wider. Durch weitere schrittweise Verdünnung der SDS-Konzentration auf einen Bereich von 0,01 bis 0,005 % SDS und Inkubation für 20 h stellt sich ein Gleichgewicht zwischen einer löslichen und einer unlöslichen Form des CHO-PrP^C ein. In diesem SDS-Bereich weist die Sekundärstruktur des CHO-PrP^C einen deutlich erhöhten β -Faltblatt-Anteil auf. Weitere Verdünnung der SDS-Konzentration auf 0,002 % oder kleiner führt dazu, dass das gesamte CHO-PrP^C nach 20 h in

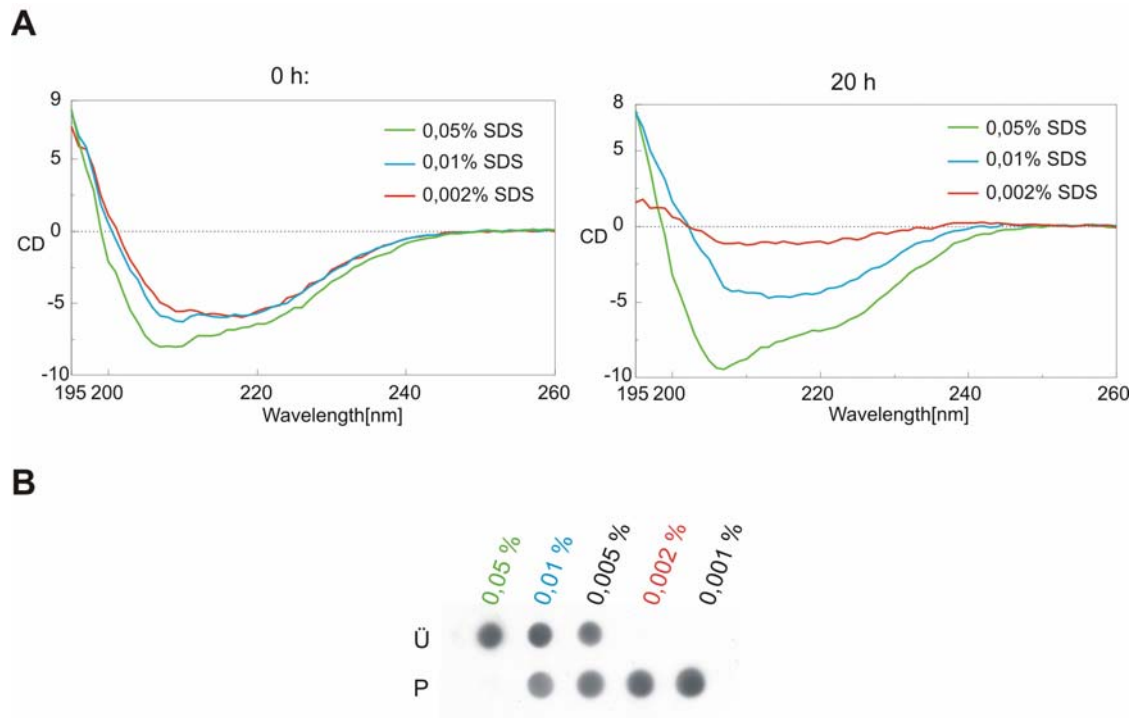


Abb. 3.5: Konversion von CHO-PrP^C durch Verdünnung der SDS-Konzentration.

A CD-spektroskopische Analyse der Sekundärstruktur von CHO-PrP^C: Die Proben wurden zunächst auf 0,05 % SDS bei einem pH-Wert von 7,2 eingestellt. Dann wurde das SDS auf die angegebenen Konzentrationen verdünnt, die Proben sofort vermessen, anschließend für 20 h bei 25°C inkubiert und erneut vermessen.

B Dot-Blot (Detektionsantikörper: 3F4) nach differentieller Ultrazentrifugation: Im Anschluss an die CD-spektroskopischen Analysen wurden die Proben bei 100.000 x g für 1 h zentrifugiert und in Überstand (Ü) als lösliche und Pellet (P) als unlösliche Fraktion getrennt.

aggregierter Form vorliegt. Bezüglich der Sekundärstruktur kann unter diesen Bedingungen zunächst ein erhöhter β -Faltblatt-Anteil beobachtet werden. Nach 20 h lässt sich die Sekundärstruktur aufgrund der Unlöslichkeit des CHO-PrP^C jedoch nicht CD-spektroskopisch erfassen.

3.2.2 Induktion der Konversion durch SDS-Zugabe

Wie bereits für rekPrP(90-231) beschrieben (Leffers *et al.* 2004) kann die Konversion ebenso durch Zugabe von sehr geringen Mengen an SDS direkt induziert werden. Diese Art der Induktion unterscheidet sich von der Induktion, wie sie in dem vorangegangenen Kapitel beschrieben ist, dadurch, dass das Detergenz SDS nicht schrittweise verdünnt, sondern schrittweise zu dem Ausgangsmaterial hinzugegeben wird. Abb. 3.6 zeigt, dass durch SDS-Zugabe ebenso die Konversion von CHO-PrP^C induziert werden kann. So führt die Einstellung der gereinigten Probe auf sehr geringe

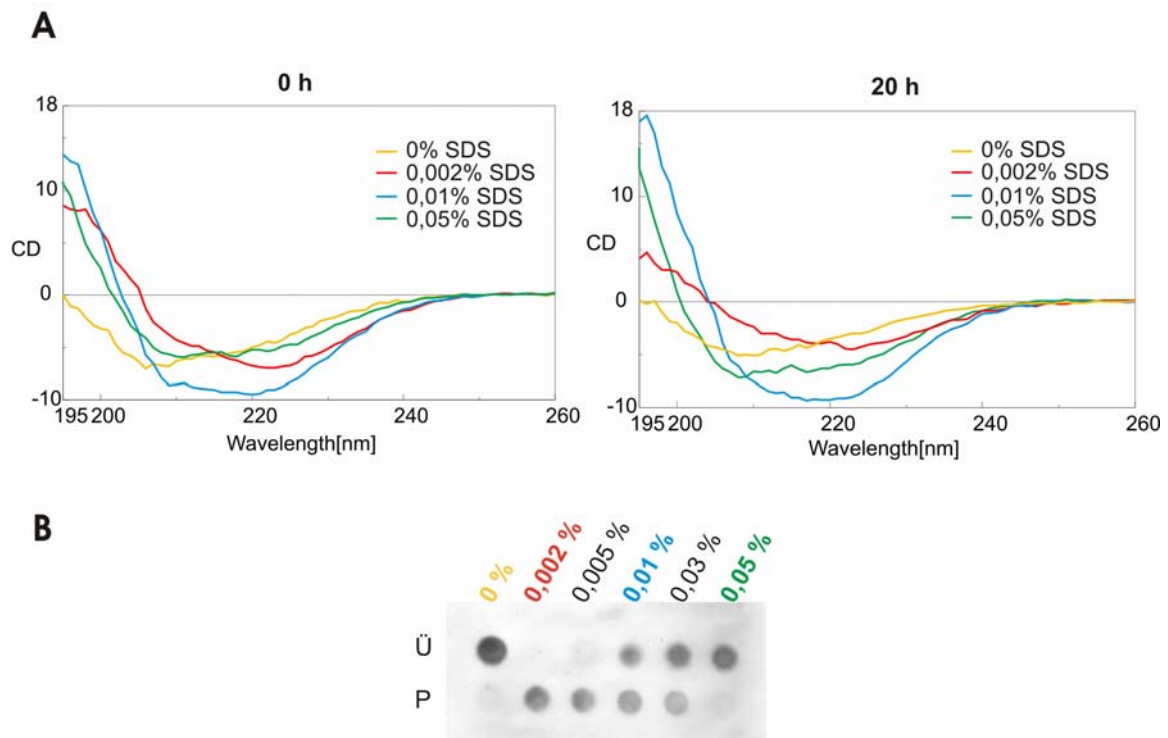


Abb. 3.6: Konversion von CHO-PrP^C durch SDS-Zugabe.

A CD-spektroskopische Analyse der Sekundärstruktur von CHO-PrP^C: Die Proben wurden auf die angegebenen SDS-Konzentrationen eingestellt, sofort vermessen, anschließend für 20 h bei 25°C inkubiert und erneut vermessen.

B Dot-Blot (Detektionsantikörper: 3F4) nach differentieller Ultrazentrifugation: Im Anschluss an die CD-spektroskopischen Analysen wurden die Proben bei 100.000 x g für 1 h zentrifugiert und in Überstand (Ü) als lösliche und Pellet (P) als unlösliche Fraktion getrennt.

SDS-Konzentrationen von 0,002 bis 0,005 % zur Aggregation des CHO-PrP^C. CD-spektroskopisch lässt sich die Sekundärstruktur des CHO-PrP^C aufgrund der sehr schnell einsetzenden Aggregation nicht erfassen. Bei höheren SDS-Konzentrationen von 0,01 bis 0,03 % stellt sich ein Gleichgewicht zwischen löslicher und unlöslicher Form ein. Wie das CD-Spektrum bei 0,01 % SDS zeigt, weist CHO-PrP^C hier einen erhöhten β -Faltblatt-Anteil auf, der nach 20 h noch weiter zunimmt. Weitere Erhöhung der SDS-Konzentration auf 0,05 % führt dann zur vollständigen Löslichkeit des CHO-PrP^C. Gleichzeitig ist eine Zunahme des α -helikalen Anteils zu beobachten.

Ohne Zugabe von SDS ist CHO-PrP^C bei einem pH-Wert von 4,0 überwiegend löslich. Das unter diesen Bedingungen aufgenommene CD-Spektrum lässt sich schwer einer Sekundärstruktur zuordnen, deutet aber auf einen erhöhten random coil Anteil hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass CHO-PrP^C unter Anwesenheit von geringen Mengen an SDS verschiedene Sekundärstrukturen einnehmen kann, wobei die Konzentration an SDS festlegt, in welcher Konformation CHO-PrP^C vorliegt.

3.2.3 Vergleich der strukturellen Konversion von CHO-PrP^C induziert durch Verdünnung, bzw. Zugabe von SDS

Um die strukturelle Konversion von CHO-PrP^C, wie sie zum einen durch schrittweise Verdünnung der SDS-Konzentration und zum anderen durch schrittweise Zugabe von SDS induziert werden kann, besser vergleichen zu können, wurde der Quotient aus dem CD-Signal bei 218 nm und bei 207 nm gegen die SDS-Konzentration aufgetragen (s. Abb. 3.8). Bei einer derartigen Auftragung deuten hohe Werte auf einen erhöhten β -Faltblatt Anteil hin, wohingegen niedrige Werte für einen hohen α -helikalen Anteil sprechen. Diese Auftragung zeigt, dass bei sehr geringen SDS-Konzentrationen CHO-PrP^C in einer Konformation mit erhöhtem β -Faltblatt Anteil vorliegt. Bei geringfügig höheren SDS-Konzentrationen kann ein Übergang zu einer überwiegend α -helikalen Sekundärstruktur beobachtet werden. Der generelle Verlauf dieser strukturellen Übergangskurven ist für den Fall der Verdünnung der SDS-Konzentration und für den Fall der Zugabe von SDS durchaus vergleichbar. Der Übergangsbereich ist für den Fall der SDS-Zugabe jedoch um etwa 0,02 % zu höheren SDS-Konzentrationen verschoben. Dies kann bedeuten, dass für die Einstellung einer stabilen α -helikalen Konformation von CHO-PrP^C durch die Zugabe von SDS geringfügig höhere Mengen an SDS notwendig sind, als es bei Verdünnung

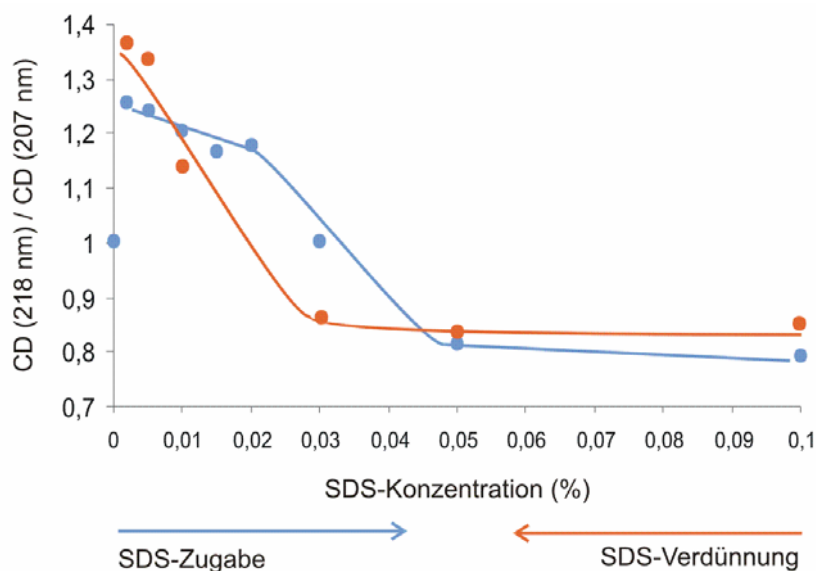


Abb. 3.7: Strukturelle Konversion von CHO-PrP^C in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration. CHO-PrP^C wurde auf die verschiedenen SDS-Konzentrationen entweder direkt eingestellt (blau) oder, nach Einstellung auf 0,1 % SDS verdünnt (rot). Die Proben wurden für 20 h bei 25°C inkubiert und anschließend CD-spektroskopisch vermessen. Anhand der erhaltenen CD-Spektren wurde der Quotient CD (218 nm) / CD (207 nm) ermittelt und gegen die SDS-Konzentration aufgetragen. Dabei entsprechen hohe Werte des Quotienten einem erhöhten β -Faltblatt-Anteil und niedrige Werte einem hohen α -helikalen Anteil.

der SDS-Konzentration der Fall ist. Es ist aber ebenso denkbar, dass die Umwandlung nach 20 h noch nicht vollständig abgeschlossen ist und dass die beobachtete Verschiebung des Übergangsbereiches einem kinetischen Unterschied entspricht.

3.2.4 Konversion unter Ausbildung partieller PK-Resistenz

Im Folgenden wurde analysiert, inwiefern die SDS-induzierte Konversion von CHO-PrP^C neben der strukturellen Umwandlung auch zur Ausbildung der PrP^{Sc}-spezifischen C-terminalen PK-Resistenz führt. Hierzu wurde die Konversion von CHO-PrP^C durch die Zugabe von geringen Mengen an SDS (0,002 %) induziert. Die so entstandenen CHO-PrP^C-Aggregate (im Folgenden unlösliches CHO-PrP^C genannt) wurden dann mit PK verdaut. Als Kontrolle wurde lösliches CHO-PrP^C ebenfalls mit PK verdaut. Die Analyse erfolgte mittels Westernblot, wobei als Detektionsantikörper R1 verwendet wurde. Im Gegensatz zu dem monoklonalen Antikörper 3F4, der üblicherweise zur Detektion eingesetzt wird und dessen Epitop im mittleren Bereich des PrP liegt, bindet R1 an den C-Terminus von PrP (s. Abb. 3.8). Die Verwendung von R1 führt also dazu, dass CHO-PrP^C-Fragmente nur dann detektiert werden, wenn sie durch eine N-terminale Verkürzung entstanden sind. Im Falle einer C-terminalen Verkürzung wird das R1-Epitop verdaut und es ist keine Detektion des CHO-PrP^C mittels R1 möglich.

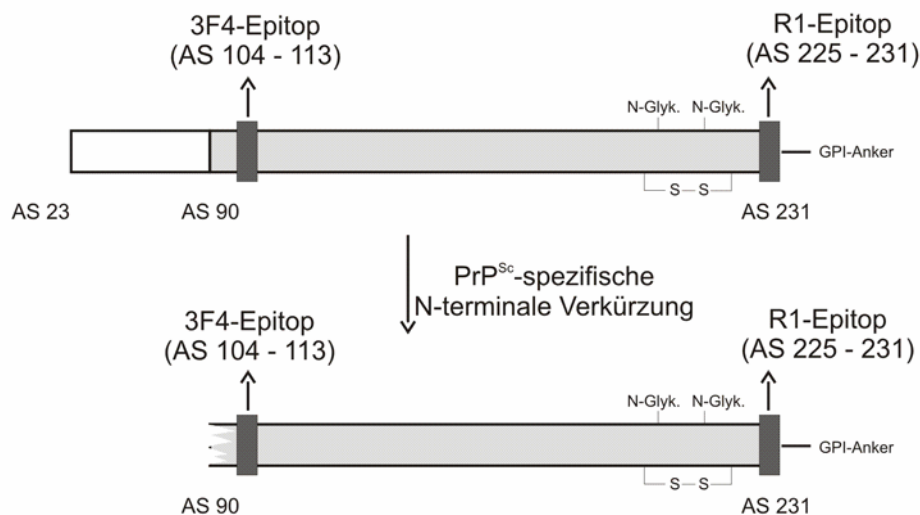


Abb. 3.8: Lokalisation der Epitope von 3F4 und R1 innerhalb der PrP-Sequenz.

Der Zusammenhang zwischen der PrP^{Sc}-spezifischen PK-Schnittstelle und der Lage der Epitope der beiden Antikörper 3F4 und R1 sind schematisch dargestellt.

Abbildung 3.9 A zeigt, dass unlösliches CHO-PrP^C durch Zugabe von PK innerhalb von 3 Minuten enzymatisch verkürzt wird. Dabei entsteht ein C-terminales Fragment von etwa 28 bis 32 kDa. Auch nach Verdauung für 15 Minuten ist dieses Fragment noch zu detektieren. Bei Verdauung von löslichem CHO-PrP^C konnte zunächst ein ebenfalls verkürztes Fragment beobachtet werden. Dieses Fragment weist allerdings ein Molekulargewicht von lediglich 18 bis 21 kDa auf, wird von dem Antikörper 3F4 nicht erkannt (nicht gezeigt) und ist nach einer PK-Verdauung von 15 Minuten nicht mehr mittels R1 detektierbar.

Um die verschiedenen CHO-PrP^C-Fragmente besser zuordnen zu können, wurden im Anschluss die N-Glykosylierungen mittels N-Glykosidase F (PNGase F) enzymatisch abgespalten. Der Vergleich mit rekPrP(90-231), was dem unmodifizierten PrP^{Sc}-charakteristischen Fragment entspricht, soll weiteren Aufschluss über die Spezifität der generierten partiellen PK-Resistenz geben (s. Abb. 3.9 B). Ohne Zugabe von PK weist unglykosyliertes CHO-PrP^C ein Molekulargewicht von 25 kDa auf. Das C-terminal PK-resistente Fragment des unlöslichen CHO-PrP^C hingegen besitzt unglykosyliert ein Molekulargewicht von 15 kDa (Die Banden zu höheren

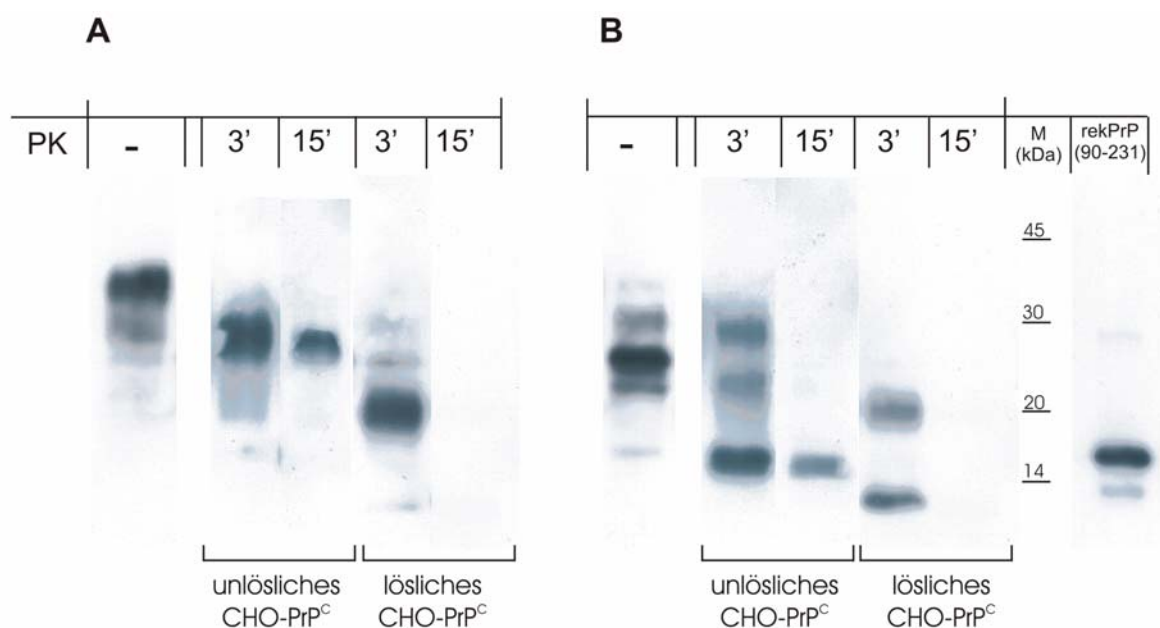


Abb. 3.9: Konversion von CHO-PrP^C unter Ausbildung partieller PK-Resistenz.

Die Konversion von CHO-PrP^C zu unlöslichen Aggregaten wurde durch die Zugabe von 0,002 % SDS mit anschließender Inkubation bei 37°C für 20 h induziert. Die PK-Verdauung erfolgte bei einem molaren Verhältnis von 1 : 4 (PK : PrP) für die angegebenen Zeiten bei 25°C. Vor der Analyse der einzelnen Proben mittels SDS-PAGE und Westernblot (Detektionsantikörper: R1) wurden die Ansätze halbiert. Eine Hälfte wurde direkt analysiert (**A**), während die andere Hälfte zunächst mittels PNGase F enzymatisch deglykosyliert wurden (**B**).

Molekulargewichten sind in einer unvollständigen Abspaltung der N-Glykosylierungen begründet und entsprechen somit der mono- und der diglykosylierten Form). Dies stimmt nahezu mit dem Molekulargewicht von rekPrP(90-231) von 16 kDa überein. Es ist bekannt, dass die Anwesenheit des GPI-Ankers zu einer erhöhten SDS-PAGE-Mobilität von PrP führt, die etwa 1 kDa entspricht (Narwa *et al.* 1999). Der geringe Unterschied im Molekulargewicht von N-terminal verkürztem CHO-PrP^C und rekPrP(90-231) kann also durch die Anwesenheit des GPI-Ankers erklärt werden. Die durch sehr geringe Mengen an SDS generierte C-terminale PK-Resistenz von CHO-PrP^C entspricht somit der charakteristischen Resistenz, wie sie für PrP^{Sc} bekannt ist.

3.3 Untersuchung der CHO-PrP^C-Membran-Wechselwirkung

Wie in Kapitel 1.2.3 bereits näher erläutert, ist PrP^C *in vivo* an der Zelloberfläche in der Plasmamembran verankert. Als GPI-verankertes Protein ist PrP^C dabei in speziellen Lipid-Mikrodomänen angereichert. Diese Mikrodomänen, die als rafts bezeichnet werden, stellen Bereiche innerhalb der Membran dar, die eine erhöhte lokale Konzentration an Sphingolipiden, Cholesterol und Cerebrosiden aufweisen. Verschiedene Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} an der Membranoberfläche in rafts stattfindet (Vgl. Kap. 1.2.6: Zwei-Phasen-Modell). Um den genauen Einfluss der natürlichen Membranumgebung auf die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} zu untersuchen ist es also notwendig gereinigtes PrP^C *in vitro* in einer Modellmembran verankern zu können. Durch die optimierte Reinigung von CHO-PrP^C (Vgl. Kap. 3.1.2), welches neben den beiden N-Glykosylierungen auch den GPI-Anker trägt, steht nunmehr ein ideales Ausgangsmaterial für die Untersuchung der Wechselwirkung von PrP^C mit Modellmembranen zur Verfügung.

3.3.1 Herstellung kleiner unilamellarer Vesikel

Um die natürliche Membranumgebung von PrP^C *in vitro* nachzustellen, wurden kleine unilamellare Vesikel (SUV) von einer raft ähnlichen Lipidzusammensetzung hergestellt. Wie bereits erläutert, ist bekannt, welche Lipide in rafts angereichert sind, jedoch ist die exakte Lipidzusammensetzung von rafts bis heute nicht aufgeklärt. Aus diesem Grund wurde eine Mischung von DMPC, Sphingomyelin, Cerebrosiden und Cholesterol in dem molaren Verhältnis 2 : 1 : 1 : 2 verwendet, wie sie in der Literatur als raft ähnliche Lipidzusammensetzung beschrieben ist (Schroeder *et al.* 1994). SUV wurden durch Behandlung mit Ultraschall für 30 min generiert (s. Kap. 2.15.2). Bei SUV handelt es sich um Lipidstrukturen, die über die Zeit nicht stabil sind,

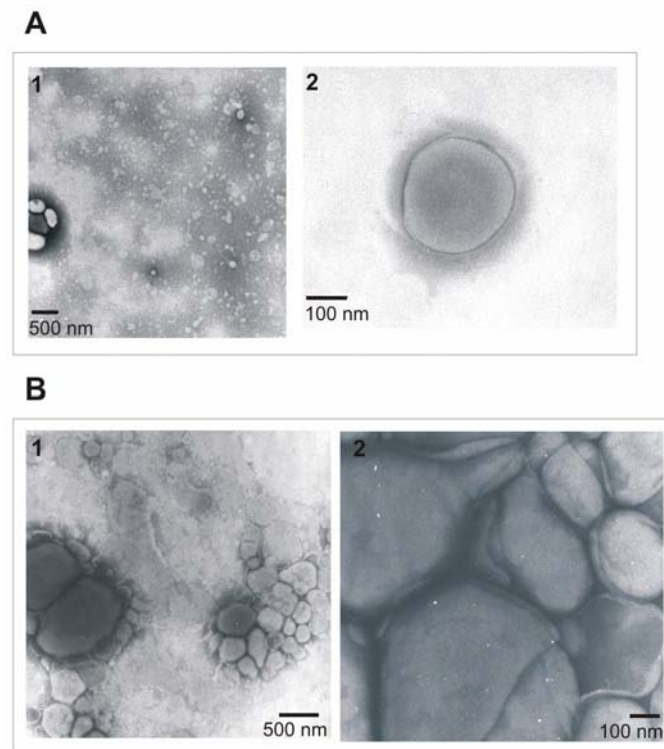


Abb. 3.10: Stabilität kleiner unilamellarer Vesikel (SUV). SUV wurden durch Ultraschallbehandlung von hydratisierten Lipiden in CBS hergestellt und nach verschiedenen Zeiten mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. Generierte SUV wurden vor den elektronenmikroskopischen Untersuchungen für 1 h (A), bzw. für 3 h (B) bei 25°C inkubiert. Für die verschiedenen Inkubationszeiten ist jeweils eine Übersichts- (1) und eine Detailaufnahme (2) dargestellt.

sondern unter Relaxation zur Ausbildung von großen unilamellaren und schließlich auch multilamellaren Vesikeln neigen. Aus diesem Grund wurde die Stabilität der hergestellten SUV mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht (s. Abb. 3.10). Dabei zeigte sich, dass die generierten Lipidvesikel nach 1 h Durchmesser von etwa 100 bis 300 nm aufweisen. Vereinzelt konnte auch eine Zusammenlagerung und Verschmelzung der Vesikel beobachtet werden (s. Abb. 3.10 A). Nach einer Inkubation für 3 h hingegen wurden überwiegend sehr große Strukturen beobachtet. Die in Abbildung 3.10 B 2 dargestellte Detailaufnahme zeigt, dass sowohl sehr große unilamellaren Vesikeln, als auch multilamellare Vesikel gebildet werden. Die Ausbildung von multilamellaren Strukturen führt jedoch zu einer Verringerung der zugänglichen Membranoberfläche. Für die folgenden Untersuchungen bezüglich der CHO-PrP^C-Membran Wechselwirkung wurden SUV aus diesem Grund niemals gelagert, sondern nach Herstellung in einem Zeitrahmen verwendet, in dem die Zusammenlagerung der Vesikel noch nicht fortgeschritten ist (maximal 30 min).

3.3.2 Rekonstitution von CHO-PrP^C in raft ähnliche Lipidvesikel (RLV)

Die Rekonstitution von Membranproteinen in Lipidvesikel erfolgt üblicherweise durch Dialyse, wobei vorhandene Detergentien langsam aus der Lösung, die Lipidvesikel und präpariertes Protein enthält, entfernt werden. Da gereinigtes CHO-PrP^C in einem Puffer gelagert wird, der keine Detergentien enthält, konnte die Rekonstitution hier durch Zugabe von CHO-PrP^C zu präparierten RLV ohne Dialyse erfolgen. Um die Detektion der Lipidvesikel im Anschluss an die Rekonstitution zu ermöglichen, wurden RLV hergestellt, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Carboxyfluorescein kovalent markiert waren.

Die Rekonstitution von CHO-PrP^C in fluoreszenzmarkierte RLV wurde durch Inkubation bei 37°C für 30 min unter leichtem Schütteln (600 rpm) der Proben durchgeführt. Die anschließende Trennung von freiem und gebundenem CHO-PrP^C erfolgte durch präparative Ultrazentrifugation in einem Dichtegradienten. Hierzu wurde die Probe auf 30 % Saccharose eingestellt und mit einem Stufengradienten (20 % → 15 % → 10 % → 5 % Saccharose) überschichtet. Nach Zentrifugation für 3 h bei 160.000 x g und 4°C wurden von oben nach unten gleich große Fraktionen vorsichtig abgenommen. Die Saccharosekonzentration der resultierenden Fraktionen ist in Abbildung 3.11 dargestellt. Zum Nachweis der Bindung von CHO-PrP^C an die Lipidvesikel wurden die Fraktionen halbiert und sowohl der relative Lipidgehalt mittels Fluoreszenzmessung, als auch der relative CHO-PrP^C-Gehalt mittels Westernblot-Analyse der einzelnen Fraktionen bestimmt (s. Abb. 3.12). Die Fluoreszenzmessung zeigt, dass RLV, wie es für kleine unilamellare Vesikel zu erwarten ist, unter diesen Bedingungen bei etwa 10-15 % Saccharose akkumulieren (s. Abb. 3.12 B). Als Kontrolle wurde CHO-PrP^C ohne Vesikelzugabe in CBS inkubiert (s. Abb. 3.12 C: 1:0). Unter diesen Bedingungen ist CHO-PrP^C nach präparativer Ultrazentrifugation ausschließlich im Pellet zu detektieren. Unter Anwesenheit von RLV in einem molaren Verhältnis von CHO-PrP^C zu Lipiden von 1 : 20.000 jedoch, akkumuliert der größte

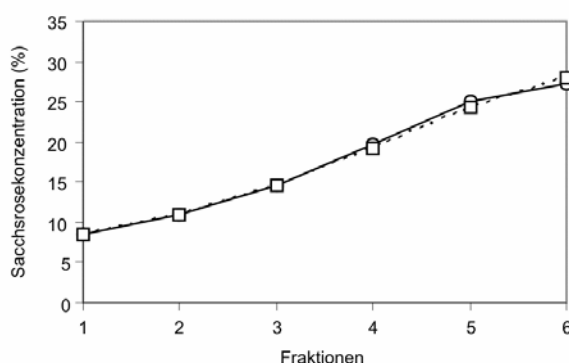


Abb. 3.11: Bestimmung der Saccharosekonzentrationen nach präparativer Ultrazentrifugation. Zwei Dichtegradienten wurden für 3 h bei 160.000 x g und 4°C zentrifugiert und im Anschluss je zu 6 Proben fraktioniert. Dabei wurden die Fraktionen 1 bis 6 von oben nach unten entnommen. Die Saccharosekonzentration der einzelnen Fraktionen wurde refraktometrisch bestimmt.

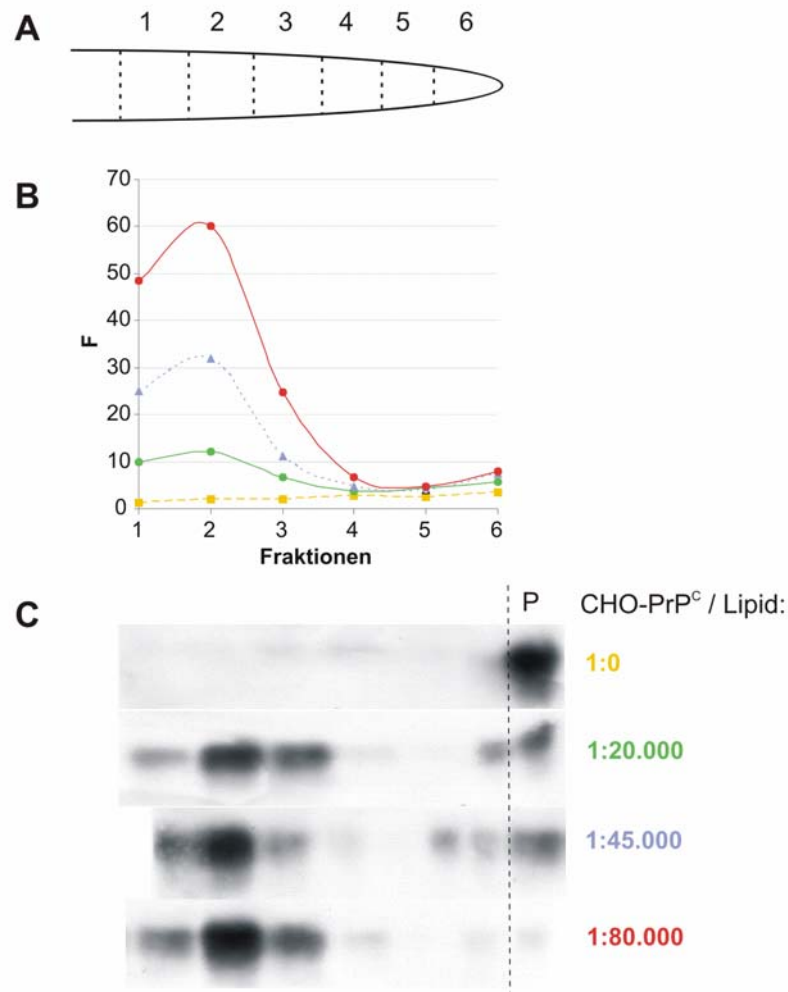


Abb. 3.12: Rekonstitution von CHO-PrP^C in RLV. CHO-PrP^C (2,5 ng/μl) wurde für 30 min bei 37°C und 600 rpm mit RLV in CBS inkubiert. Dabei wurden unterschiedliche molare Verhältnisse, wie angegeben, von CHO-PrP^C zu Lipid eingestellt. Die Zentrifugation erfolgte in einem Saccharosegradienten (5-30 %) für 3 h bei 160.000 x g und 4°C. Anschließend wurde der Gradient in 6 Fraktionen aufgeteilt (**A**) und das Pellet in Auftragspuffer aufgenommen. Die Fraktionen wurden halbiert, um sowohl den relativen Lipidgehalt (**B**) als auch den relativen CHO-PrP^C-Gehalt (**C**) der einzelnen Fraktionen zu bestimmen.

B Fluoreszenzmessung (λ_{exc} = 465 nm; λ_{em} = 525 nm) zur Bestimmung des relativen Lipidgehaltes der einzelnen Fraktionen.

C Westernblot zur Bestimmung des relativen CHO-PrP^C-Gehaltes der einzelnen Fraktionen (Detektionsantikörper: 3F4).

Anteil von CHO-PrP^C bei etwa 10-15 % Saccharose. Geringe Mengen an CHO-PrP^C sind allerdings auch unter diesen Bedingungen noch im Pellet zu detektieren. Erhöhung der Lipidkonzentration in den Ansätzen bis zu einem molaren Verhältnis von CHO-PrP^C zu Lipiden von 1 : 80.000 führt dazu, dass nahezu das gesamte CHO-

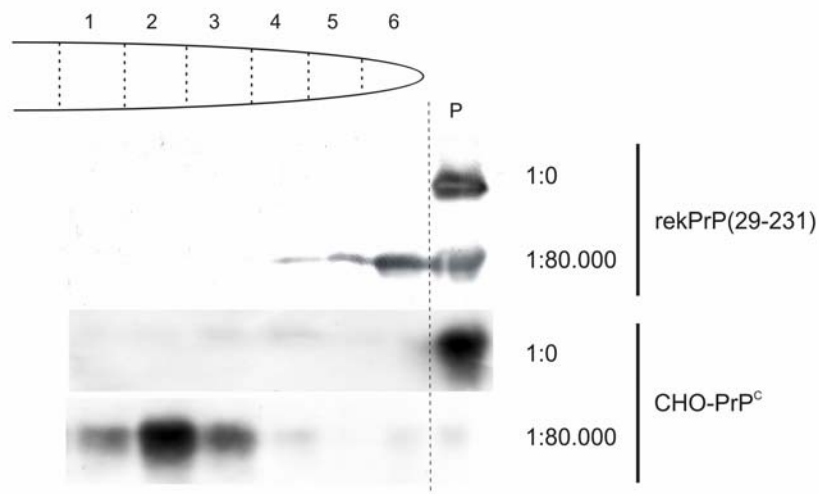


Abb. 3.13: Vergleich der Bindungseigenschaften von rekPrP(29-231) und CHO-PrP^C. CHO-PrP^C und rekPrP(29-231) wurden für 30 min bei 37°C und 600 rpm mit RLV in einem molaren Verhältnis von 1 : 80.000 (PrP : Lipid) in CBS inkubiert. Die Zentrifugation erfolgte in einem Saccharosegradienten (5-30 %) für 3 h bei 160.000 x g und 4°C. Anschließend wurde der Gradient in 6 Fraktionen aufgeteilt und das Pellet in Auftragspuffer aufgenommen. Der relative PrP-Gehalt der einzelnen Fraktionen wurde mittels Westernblot-Analyse bestimmt (Detektionsantikörper: 3F4).

PrP^C in Fraktionen geringer Dichte akkumuliert. Die hier beobachtete Kolo-kalisation der Vesikel und CHO-PrP^C lässt darauf schließen, dass eine Bindung von CHO-PrP^C an die raft ähnlichen Vesikel stattgefunden hat.

Als Kontrolle für die Spezifität dieser Wechselwirkung wurde rekPrP(29-231) hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften untersucht, da rekPrP(29-231) zwar die identische Aminosäuresequenz wie CHO-PrP^C aufweist, jedoch nicht posttranslational modifiziert ist und somit nicht den GPI-Anker trägt. Es zeigte sich, dass rekPrP(29-231), im Gegensatz zu CHO-PrP^C, nicht in Fraktionen niedriger Dichte akkumuliert (s. Abb. 3.13). Dies bedeutet, dass keine Bindung von rekPrP(29-231) an die Lipidvesikel stattgefunden hat. Somit konnte gezeigt werden, dass CHO-PrP^C an raft ähnliche Lipidvesikel bindet und dass diese Bindung auf spezifischen Wechselwirkungen beruht. Die Tatsache, dass rekPrP(29-231) diese Wechselwirkung unter den gegebenen Bedingungen nicht eingehen kann legt den Schluss nahe, dass die beobachtete Bindung von CHO-PrP^C an RLV durch den GPI-Anker vermittelt wird.

3.3.3 Kinetische Analyse der Bindung von CHO-PrP^C an Lipidbilayer

Wie in Kapitel 2.18 ausführlich beschrieben lässt sich mit Hilfe der Oberflächen-Plasmon-Resonanz (SPR) die Adsorption von Biomolekülen an eine Oberfläche kinetisch verfolgen. In dieser Arbeit wurde das Biacore X, welches auf der SPR-Technologie beruht, zur kinetischen Analyse der Bindung von CHO-PrP^C an raft ähnliche Lipidbilayer verwendet. Bei dem Biacore X kann ein maximales Probenvolumen von 80 µl mit unterschiedlichen Flussraten über eine Oberfläche von 1 mm² injiziert werden. Das Volumen der Flusszelle beträgt dabei etwa 0,06 µl (s. Abb. 3.14 A). Durch den kontinuierlichen Fluss wird die Konzentration an freiem Protein während der gesamten Messung konstant gehalten.

Um die Wechselwirkung von CHO-PrP^C mit Modellmembranen zu untersuchen muss zunächst ein Lipidbilayer als Oberfläche präpariert werden. Hierzu wurde ein Standardprotokoll des Biacore-Herstellers für einen speziellen Sensorchip (L1-Chip) verwendet. Dieser Chip trägt eine Dextran-Matrix, die mit lipophilen Komponenten modifiziert ist. Die Oberfläche des L1-Chips erlaubt es, einen stabilen Lipidbilayer durch Aufspaltung von kleinen unilamellaren Vesikeln herzustellen (s. Abb. 3.14 B). Um die Fluidität der Lipide zu gewährleisten, wurden sämtliche SPR-Messungen bei 37°C durchgeführt.

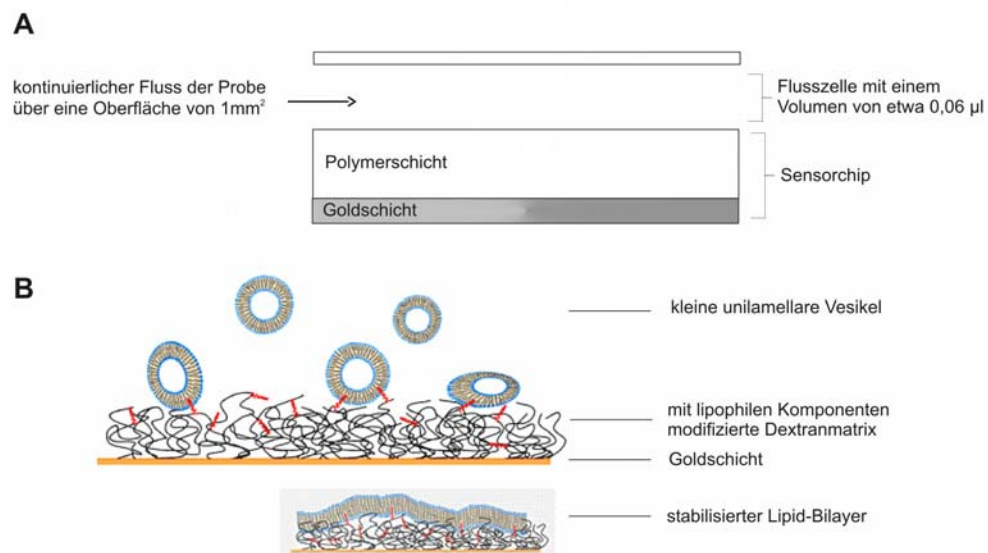


Abb. 3.14: Schematische Darstellung des Aufbaus der Flusszelle beim Biacore X und Prinzip der Bilayer-Präparation. **A** Die Probe wird über eine sehr kleine Flusszelle bei kontinuierlichem Fluss injiziert. Dabei weist die Flusszelle ein Volumen von etwa 0,06 µl auf und kommt mit einer Fläche von 1 mm² des Sensorchips in Kontakt. **B** Der verwendete L1-Sensorchip ermöglicht die Generierung eines stabilen Lipidbilayers durch die Aufspaltung von Lipidvesikeln.

3.3.3.1 Präparation eines Lipidbilayers

Abbildung 3.15 zeigt ein typisches Sensogramm, das aus der Präparation eines Lipidbilayers resultiert. Das Signal wird beim Biacore X in so genannten Resonanz Units (RU) aufgezeichnet. 1 RU entspricht dabei der Bindung von 1 pg eines Moleküls aus der Lösung an eine Oberfläche von 1 mm². Die Oberfläche des Chips wird zunächst mit 20 mM CHAPS gereinigt. Die Generierung des Bilayers erfolgt durch kontinuierlichen Fluss von kleinen unilamellaren Vesikeln der raft ähnlichen Lipidzusammensetzung für 1 h über die Oberfläche. Hierbei ist ein schneller Anstieg des Signals zu beobachten, was durch die Fusion der Vesikel unter Ausbildung eines Lipidbilayers bewirkt wird. Intakte Vesikel und auch multilamellare Lipidstrukturen, die zunächst an dem Bilayer noch haften können, werden durch die Injektion von 50 mM NaOH entfernt. Um unspezifische Bindestellen auf dem Lipidbilayer zu blockieren, wird BSA injiziert, wodurch die Präparation einer raft ähnlichen Modellmembran abgeschlossen wird.

Ein auf diese Art generierter Bilayer resultiert typischerweise in einem Signal von 8.500 RU (pg/mm²). Die verwendeten Lipide besitzen ein mittleres Molekulargewicht von 650 Da. Somit entspricht das gemessene Signal von 8.500 RU einer Menge an gebundenem Lipid von 6×10^{12} Molekülen pro mm². Da ein Lipidmolekül eine Fläche von etwa 0,65 nm² abdeckt (Angabe von Avanti Polar Lipids, Inc.), ist eine Menge von

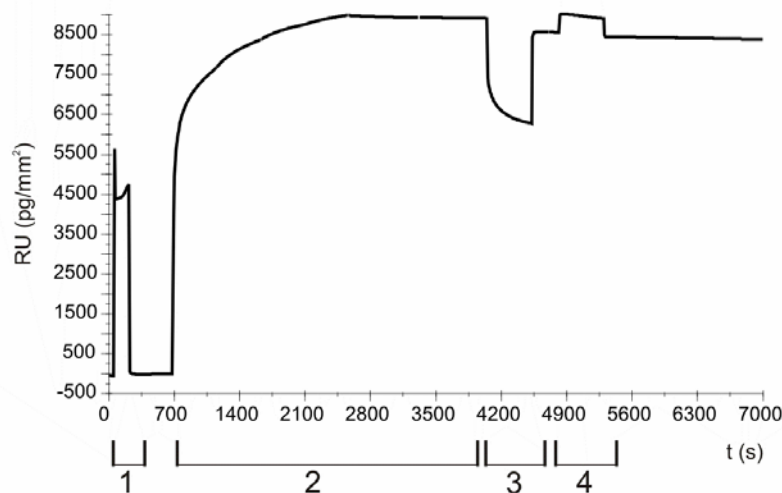


Abb. 3.15: SPR-Messung: Präparation eines Lipidbilayers. Zur Reinigung der Oberfläche des L1-Chips wurden zunächst 80 µl 20 mM CHAPS bei einer Flussrate von 30 µl/min injiziert (1). Anschließend wurden kleine unilamellare Vesikel für 1 h bei einer Flussrate von 10 µl/min über die Oberfläche gegeben (2). Durch die Injektion von 80 µl 50 mM NaOH können Vesikel, die eventuell an dem Bilayer haften entfernt werden (3). Schließlich wurden unspezifische Bindestellen durch die Injektion von 80 µl 1 mg/ml BSA bei einer Flussrate von 10 µl/min blockiert (4).

2×10^{12} Lipidmolekülen notwendig, um eine Fläche von 1 mm^2 in Form eines Monolayers abzudecken. Um die Fläche mit einem Lipidbilayer abzudecken, sind demnach theoretisch 4×10^{12} Lipidmolekülen notwendig. Die gute Übereinstimmung der praktisch bestimmten mit der theoretisch kalkulierten Menge an gebundenen Lipiden lässt auf die Ausbildung eines Lipidbilayers schließen.

Raft ähnliche Modellmembranen wurden auf diese Art vor jeder der nachfolgenden Messreihen präpariert.

3.3.3.2 Die Bindung von CHO-PrP^C an raft ähnliche Modellmembranen wird durch den GPI-Anker vermittelt

Wird CHO-PrP^C in einem kontinuierlichen Fluss über eine derartig präparierte Modellmembran gegeben, kann eine schnelle Assoziation und bei nachfolgendem Spülen mit Puffer eine langsame Dissoziation beobachtet werden (s. Abb. 3.16; durchgezogene Linie). Dies zeigt deutlich die hohe Affinität von CHO-PrP^C zu dem präparierten Lipidbilayer.

Um sicher zu stellen, dass diese Bindung nicht auf einer unspezifischen Wechselwirkung von CHO-PrP^C mit eventuell nicht abgedeckten Bereichen der

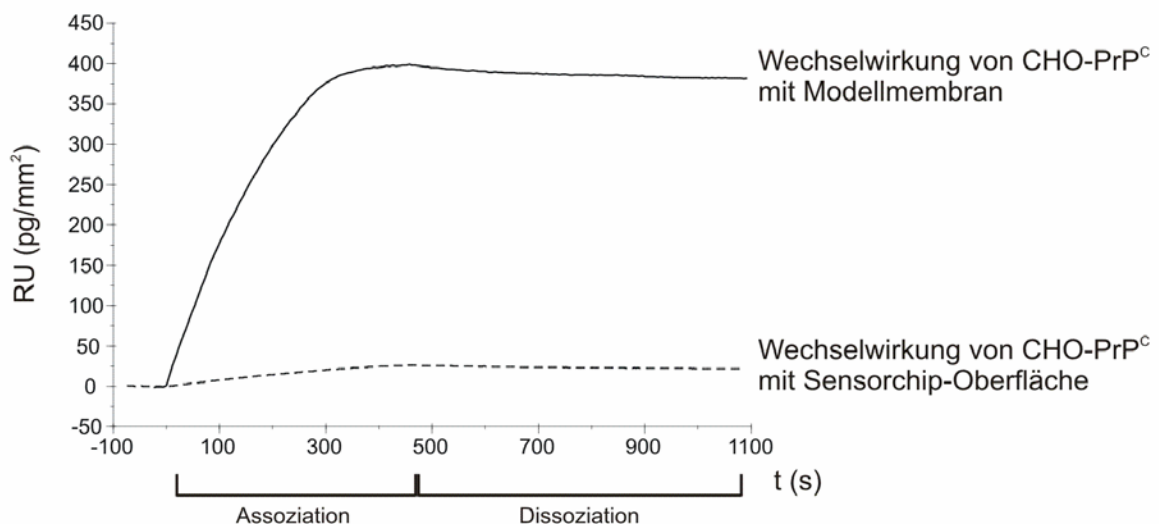


Abb. 3.16: SPR-Messung: Bindung von CHO-PrP^C an raft ähnliche Modellmembranen und an eine unbedeckte Chipoberfläche. CHO-PrP^C wurde mit CBS auf $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ eingestellt und $80 \mu\text{l}$ wurden bei einer Flussrate von $10 \mu\text{l}/\text{min}$ injiziert (Assoziation). Nach der Injektion wurde CBS bei gleich bleibender Flussrate über die Oberfläche gegeben und die Dissoziation für weitere 600 s beobachtet. Die Bindung sowohl an raft ähnliche Modellmembranen (durchgezogene Linie), als auch an eine unbedeckte Chipoberfläche (gestrichelte Linie) wurde verfolgt. Die unbedeckte Chipoberfläche wurde, mit Ausnahme der Zugabe von Lipidvesikeln, zuvor genauso behandelt, wie es für die Herstellung eines Lipidbilayers beschrieben ist (Vgl. Abb. 3.15).

Sensorchip-Oberfläche beruht, wurde als Kontrolle die Bindung von CHO-PrP^C an eine unbedeckte Chip-Oberfläche untersucht (s. Abb. 3.16; gestrichelte Linie). Die Oberfläche wurde hierfür mit CHAPS, NaOH und BSA in gleicher Weise behandelt, wie es für die Herstellung eines Bilayers (s. Abb. 3.15) beschrieben ist. Dabei zeigte sich, dass nahezu keine Bindung von CHO-PrP^C an die unbedeckte Oberfläche eines Sensorchips stattfindet. Somit konnte gezeigt werden, dass die beobachtete Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen auf spezifischen Wechselwirkungen mit dem Lipidbilayer beruht.

Um die Spezifität der beobachteten CHO-PrP^C-Membran-Wechselwirkung genauer zu untersuchen, wurde im Folgenden das Bindungsverhalten von rekPrP(29-231), welches weder die N-Glykosylierungen, noch den GPI-Anker trägt, analysiert. Hierbei stellte sich erneut heraus (Vgl. Kap. 3.3.2), dass rekPrP(29-231) eine wesentlich geringere Affinität zu raft ähnlichen Lipidbilayern aufweist, als CHO-PrP^C (s. Abb. 3.17).

Aufgrund dieser Beobachtung soll zunächst ein Arbeitsmodell bezüglich der unterschiedlichen Bindungen von CHO-PrP^C und rekPrP(29-231) an Modellmembranen aufgestellt werden (s. Abb. 3.18). Nach diesem Modell bindet CHO-PrP^C durch Einlagerung des GPI-Ankers in den Lipidbilayer an die Modellmembran. Da rekPrP(29-231) keinen GPI-Anker trägt, wird in diesem Modell angenommen, dass die geringe Bindung von rekPrP(29-231) an die Modellmembran in Form von Wechselwirkungen mit der Oberfläche des Lipidbilayers stattfindet.

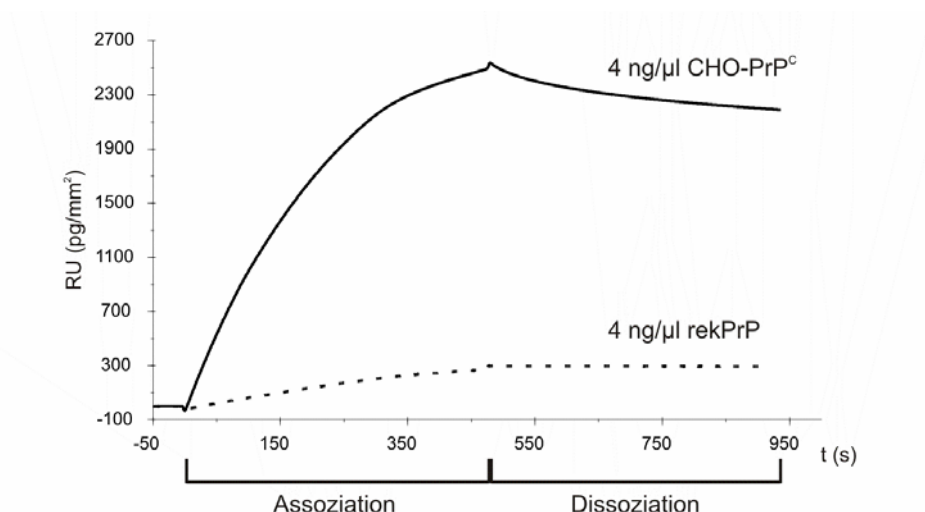


Abb. 3.17: SPR-Messung: Bindung von CHO-PrP^C und rekPrP(29-231) an raft ähnliche Modellmembranen. CHO-PrP^C und rekPrP(29-231) wurden in CBS auf eine Konzentration von 4 ng/µl gebracht und jeweils 80 µl wurden bei einer Flussrate von 10 µl/min injiziert (Assoziation). Nach der Injektion wurde CBS bei gleich bleibender Flussrate über die Oberfläche gegeben und die Dissoziation für weitere 400 s beobachtet.

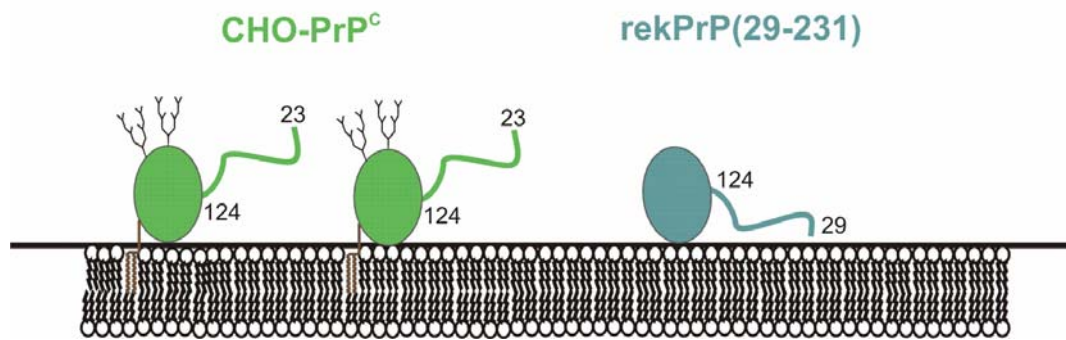


Abb. 3.18: Modell der unterschiedlichen Wechselwirkungen von CHO-PrP^C und rekPrP(29-231) mit Modellmembranen.

Um diese Annahmen weiter zu stützen, wurde weiterhin der Einfluss verschiedener Salzbedingungen auf die Bindung von sowohl CHO-PrP^C, als auch rekPrP(29-231) an raft ähnliche Lipidbilayer untersucht. Da durch hohe Ionenstärken elektrostatische Wechselwirkungen inhibiert werden, während hydrophobe Wechselwirkungen unbeeinflusst bleiben, kann somit der zu Grunde liegende Mechanismus der CHO-PrP^C-Membran-Wechselwirkung genauer untersucht werden. Dabei stellte sich die Affinität von CHO-PrP^C zu raft ähnlichen Lipidbilayern als nahezu unabhängig von der Ionenstärke heraus (s. Abb. 3.19 A). Der dennoch beobachtete geringe Einfluss der Ionenstärke auf den späteren Bereich der Assoziation könnte dadurch erklärt werden, dass CHO-PrP^C zwar überwiegend in Form einer schnellen, salzunabhängigen Reaktion an die Modellmembran bindet, dass aber auch ein geringer Anteil an CHO-PrP^C in Form einer langsameren, salzabhängigen Reaktion mit der Modellmembran wechselwirkt. Die schnelle Bindung von CHO-PrP^C an den Lipidbilayer wird demnach durch hydrophobe Wechselwirkungen bewirkt, während ein geringer Anteil an CHO-PrP^C über elektrostatische Wechselwirkungen mit einer deutlich langsameren Kinetik an den Bilayer bindet.

Im Gegensatz dazu konnte ein deutlicher Einfluss der Ionenstärke auf die Affinität von rekPrP(29-231) zu Modellmembranen festgestellt werden (s. Abb. 3.19. B). So führt die Erhöhung der Ionenstärke von 0 mM auf 137 mM NaCl zu einer drastischen Abnahme sowohl der Assoziation, als auch der Dissoziation von rekPrP(29-231). Dies bedeutet, dass rekPrP(29-231) überwiegend über elektrostatische Wechselwirkungen mit der polaren Oberfläche des Lipidbilayers an die Modellmembran bindet. Diese elektrostatische Bindung von rekPrP(29-231) an raft ähnliche Lipidbilayer erreicht jedoch nicht die Affinität, wie sie für die hydrophobe Wechselwirkung von CHO-PrP^C mit der Modellmembran beobachtet werden kann (s. Abb. 3.19 C).

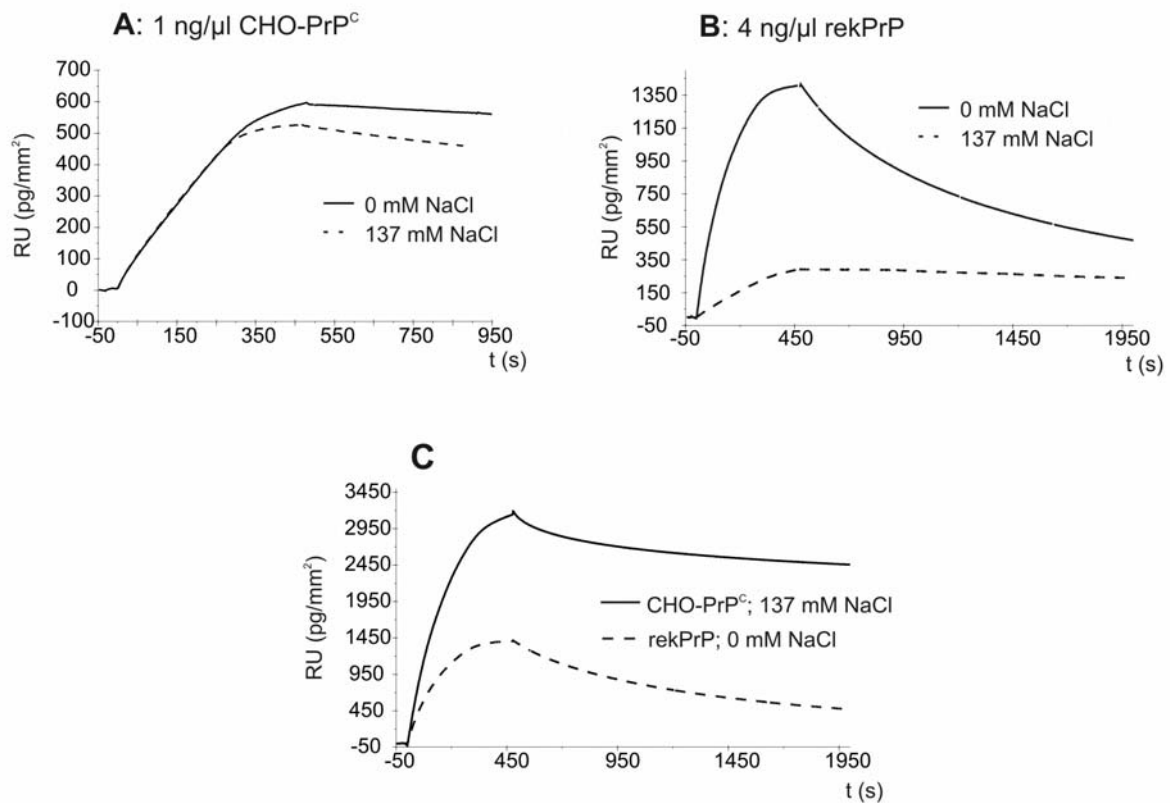


Abb. 3.19: SPR-Messung: Einfluss der Ionenstärke auf die Bindung von CHO-PrP^C und rekPrP(29-231) an raft ähnliche Lipidbilayer. **A:** CHO-PrP^C wurde mit CBS (137 mM NaCl), bzw. mit CB (0 mM NaCl) auf 1 ng/μl eingestellt und jeweils 80 μl wurden bei einer Flussrate von 10 μl/min injiziert. Nach der Injektion wurde CBS, bzw. CB bei gleich bleibender Flussrate über die Oberfläche gegeben und die Dissoziation für weitere 400 s beobachtet. **B:** rekPrP(29-231) wurde mit CBS, bzw. mit CB auf 4 ng/μl eingestellt und jeweils 80 μl wurden bei einer Flussrate von 10 μl/min injiziert. Nach der Injektion wurde CBS, bzw. CB bei gleich bleibender Flussrate über die Oberfläche gegeben und die Dissoziation für weitere 1.500 s beobachtet. **C:** CHO-PrP^C wurde mit CBS und rekPrP(29-231) mit CB auf 4 ng/μl eingestellt. Jeweils 80 μl wurden bei einer Flussrate von 10 μl/min injiziert. Nach der Injektion wurde CBS, bzw. CB bei gleich bleibender Flussrate über die Oberfläche gegeben und die Dissoziation für weitere 1.500 s beobachtet.

Beide Beobachtungen, die geringe Affinität von rekPrP(29-231) und der geringe Einfluss der Ionenstärke auf die Affinität von CHO-PrP^C zu raft ähnlichen Lipidbilayern, führen zu dem Schluss, dass die Bindung von CHO-PrP^C an die Modellmembran durch spezifische, hydrophobe Wechselwirkungen des GPI-Ankers mit dem Bilayer vermittelt wird, was vollkommen mit dem in Abbildung 3.18 dargestellten Modell übereinstimmt.

Da neben dieser qualitativen Aussage ebenso die Kinetik der Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen ausgewertet werden sollte, wurde zunächst die Abhängigkeit

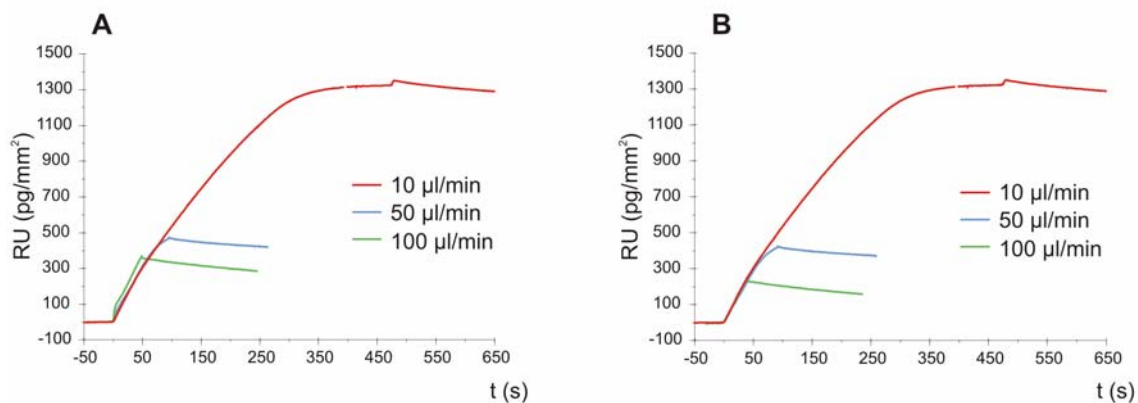


Abb. 3.20: SPR-Messung: Untersuchung der Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen bei verschiedenen Flussraten. **A** CHO-PrP^C wurde in CBS auf eine Konzentration von 2 ng/µl gebracht und jeweils 80 µl wurden bei verschiedenen Flussraten injiziert. Nach der Injektion wurde CBS bei gleich bleibender Flussrate über die Oberfläche gegeben. **B** Die identischen Bindungskurven, wie unter **A**, sind dargestellt, allerdings wurde aus den Bindungskurven, die bei sehr hohen Flussraten von 50 µl/min und 100 µl/min gemessen wurden, der initiale, sprunghafte Anstieg entfernt.

der Bindung von der Flussrate untersucht. Hierbei wurde zunächst eine Abhängigkeit der initialen Assoziationskinetik von der Flussrate beobachtet (s. Abb. 3.20 A). Es stellte sich allerdings heraus, dass die sehr schnelle Signalzunahme zu Beginn der Injektion bei hohen Flussraten unabhängig von der Proteinkonzentration ist (nicht gezeigt). Des Weiteren konnte dieser rapide Signalanstieg ausschließlich bei extrem hohen Flussraten beobachtet werden. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass es sich hierbei vielmehr um einen artefiziellen Effekt, der durch die Ventilumschaltung zu Beginn der Injektion bei sehr hohen Flussraten bewirkt wird und zu einer ungewöhnlich schnellen Zunahme des Brechungsindex an der Oberfläche führt, handelt. Der weitere Verlauf der Bindungskurven wird nicht durch die Flussrate beeinflusst (s. Abb. 3.20 B). Dies lässt darauf schließen, dass die Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen unter den gegebenen Bedingungen keinen Transportkontrollierten Prozess darstellt. Die Geschwindigkeit der Assoziation wird also allein durch die Kinetik der Bindung von CHO-PrP^C an den raft ähnlichen Lipidbilayer bestimmt.

3.3.3.3 Das Gleichgewicht der CHO-PrP^C-Membran-Wechselwirkung wird durch multiple Injektionen erreicht

Bei einer einzelnen Bindungskurve der Assoziation von CHO-PrP^C an Modellmembranen, wie sie in Abbildung 3.16 exemplarisch gezeigt ist, scheint sich bis

zum Ende der Assoziationsphase das Gleichgewicht der Reaktion eingestellt zu haben. Erstaunlicherweise konnte aber beobachtet werden, dass eine erneute Injektion von CHO-PrP^C gleicher Konzentration abermals zu einem schnellen Anstieg des Signals führt und in dem Erreichen eines Plateaus mit höheren RU-Werten resultiert (s. Abb. 3.21 A). Durch eine einzelne Injektion kann das Gleichgewicht der CHO-PrP^C-Membran-Wechselwirkung demnach nicht erreicht werden. Dieser Effekt der sukzessiven Membranbindung von CHO-PrP^C konnte für mehrere repetitive Injektionen, die durch kurze Dissoziationsphasen von etwa 50 s voneinander getrennt sind, beobachtet werden.

Bei genauerer Betrachtung der stufenartigen Bindung fällt auf, dass sich die Bindungskurven der einzelnen Injektionen voneinander in ihrem Verlauf unterscheiden. Um dies näher zu verdeutlichen wurden die einzelnen Bindungskurven von vier aufeinander folgenden Injektionen jeweils auf Null normiert und überlagert (s. Abb. 3.21 B). Diese Darstellung zeigt deutlich die systematische Abnahme der Assoziationsgeschwindigkeit mit steigender Anzahl an Injektionen. Die Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen nähert sich also über multiple Injektionen, unterbrochen von kurzen Dissoziationsphasen, dem Gleichgewicht an.

Aus den kinetischen Untersuchungen kann nicht eindeutig hergeleitet werden, welcher zu Grunde liegende Mechanismus zu der stufenartigen Bindung von CHO-PrP^C an raft

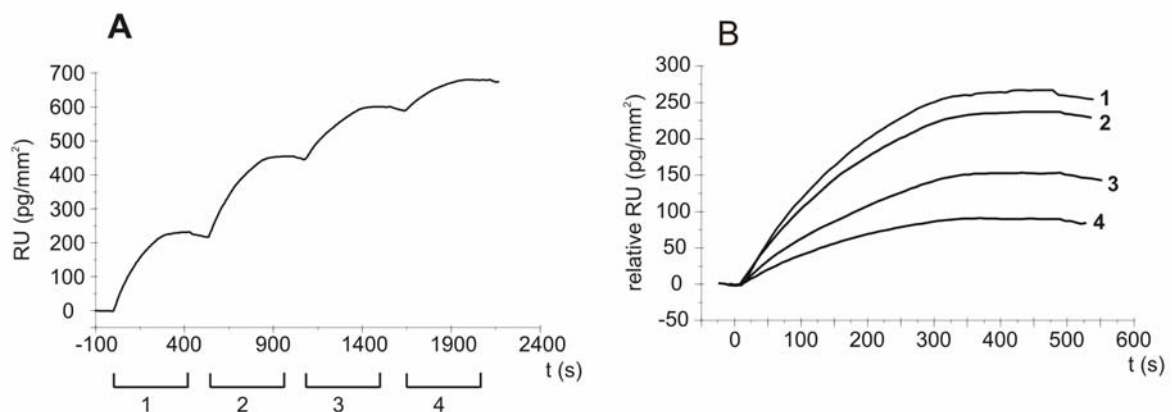


Abb. 3.21: SPR-Messung: Gleichgewichtseinstellung der Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen durch multiple Injektionen. **A:** CHO-PrP^C wurde in CBS auf eine Konzentration von 0,5 ng/μl gebracht und jeweils 80 μl wurden bei einer Flussrate von 10 μl/min injiziert. Nach der Injektion wurde CBS bei gleich bleibender Flussrate über die Oberfläche gegeben und die Dissoziation für etwa 50 s beobachtet. Dies wurde repetitiv für 4 Injektionen durchgeführt. **B:** Die unter A dargestellten Bindungskurven wurden zum besseren Vergleich getrennt und auf Null gebracht. Dabei stellen die Kurven 1 bis 4 die erste bis vierte Injektion dar.

ähnliche Modellmembranen führt. Es werden jedoch in Kapitel 4.5 zwei mechanistische Modelle diskutiert, die zu dieser beobachteten sukzessiven Bindung führen können.

Folgender, beobachteter Zusammenhang lässt sich allerdings zunächst festhalten: Während der kurzen Dissoziationsphasen zwischen den einzelnen Injektionen ist die Abnahme des Signals sehr gering, was bedeutet, dass nur wenige Moleküle von der Membran dissoziieren. Diese Dissoziation führt allerdings dazu, dass während der folgenden Injektion deutlich mehr Moleküle assoziieren können. Daraus folgt, dass die kurzen Dissoziationsphasen bewirken, dass für die Bindung von CHO-PrP^C an die Modellmembran weitere Bindeplätze zugänglich gemacht werden.

Um dennoch eine Vorstellung der gesamten Bindungskurve, die in der sukzessiven Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen enthalten ist, zu bekommen, wurde aus den Bindungskurven repetitiver Injektionen eine Gesamtbindungskurve rekonstruiert. Unter der Annahme, dass das Erreichen einer Sättigung während einer Injektion nicht der Einstellung des Gleichgewichtes, sondern vielmehr einer Blockierung von Bindeplätzen entspricht, die durch die nachfolgende kurze Dissoziationsphase aufgehoben wird, erfolgte diese Rekonstruktion, wie in Abbildung 3.22 A dargestellt. Aus einer derartig rekonstruierten gesamten Bindungskurve lässt sich des Weiteren,

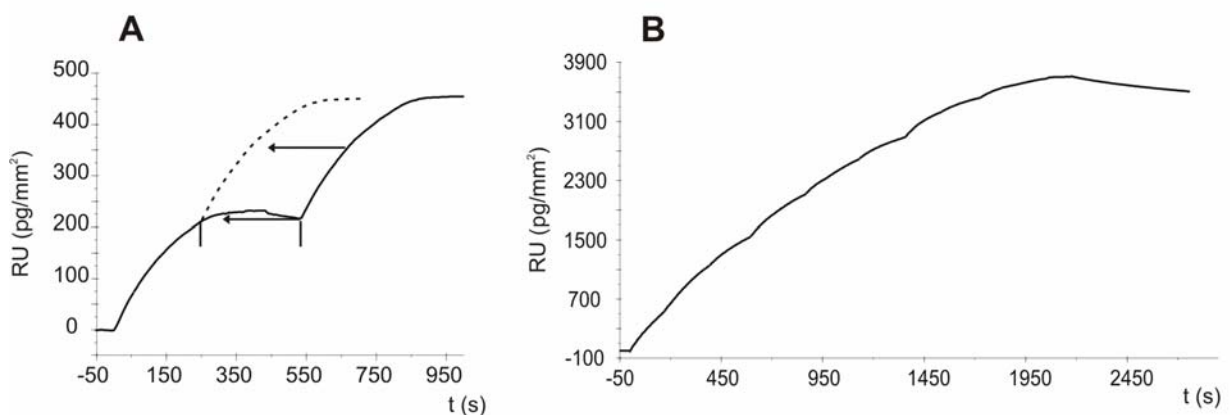


Abb. 3.22: SPR-Messung: Rekonstruktion einer einheitlichen Bindungskurve aus Bindungskurven multipler Injektionen. CHO-PrP^C wurde in CBS auf eine Konzentration von 1 ng/μl gebracht und jeweils 80 μl wurden bei einer Flussrate von 10 μl/min repetitiv injiziert. **A:** Darstellung der Vorgehensweise zur Überlagerung multipler Injektionen. Die einzelnen Bindungskurven wurden entlang der Zeitachse derartig verschoben, dass sie bei gleich bleibendem RU-Wert innerhalb der vorangegangenen Bindungskurve beginnen. Daraus folgt, dass die Reaktion langsamer Kinetik und die kurzen Dissoziationsphasen in der resultierenden Gesamtkurve nicht mehr enthalten sind. **B:** Aus Bindungskurven multipler Injektionen wurde eine einheitliche Bindungskurven wie unter **A** dargestellt rekonstruiert.

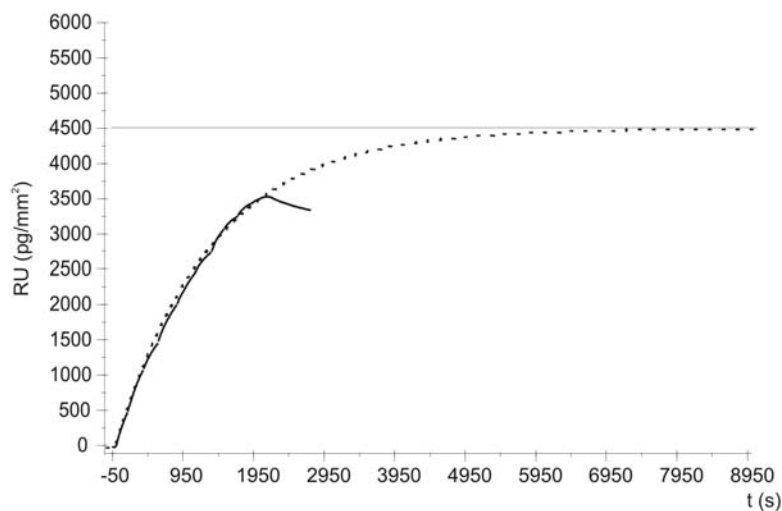


Abb. 3.23: SPR-Messung: Bestimmung des Sättigungswertes der Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen. CHO-PrP^C wurde in CBS auf eine Konzentration von 1 ng/ μ l gebracht und jeweils 80 μ l wurden bei 10 μ l/min repetitiv injiziert. Anschließend wurden die einzelnen Bindungskurven, wie in Abb. 3.22 dargestellt, fusioniert (durchgezogene Linie). Die gestrichelte Linie zeigt die daraus abgeschätzte Gesamtfunktion mit einem Sättigungswert von etwa 4.500 RU (pg/mm^2).

wie in Abbildung 3.23 dargestellt, ein Sättigungswert von etwa 4.500 RU abschätzen. Dies entspricht einer Proteindichte von 4.500 pg, bzw. $7,4 \times 10^{10}$ Molekülen CHO-PrP^C pro mm^2 Oberfläche. Um anhand dieser Beobachtung den Belegungsgrad auf der Oberfläche zu ermitteln, ist es notwendig, die räumliche Ausdehnung von CHO-PrP^C zu kennen. Die dreidimensionale Struktur von PrP^C ist jedoch bis heute nicht aufgeklärt. Aufbauend auf die ermittelte dreidimensionale Struktur des globulären Teils von rekPrP(29-231) (Vgl. Abb. 1.2) wurde durch molekulare Modellierung ein Modell der Struktur von PrP^C der vollen Länge, das die beiden N-verknüpften Glykosylierungen und den GPI-Anker trägt entwickelt (Rudd *et al.*, 2001). Anhand dieses Modells (s. Abb. 3.24) lässt sich eine Oberflächenabdeckung eines PrP^C-Moleküls von etwa 12 nm^2 ($57 \times 28 \text{ \AA}$) abschätzen. Somit würde eine Gesamtabdeckung der Oberfläche von 1 mm^2 durch die Anlagerung von 8×10^{10} PrP^C-Molekülen erreicht werden. Die in dieser Arbeit bestimmte maximale Belegung der Modellmembran mit $7,4 \times 10^{10}$ Molekülen CHO-PrP^C würde demnach einer Abdeckung der Oberfläche von über 90 % entsprechen. Unter Berücksichtigung, dass bei dieser Abschätzung bereits mehrere Annahmen eingegangen sind, ist die Übereinstimmung von theoretischem und experimentellem Wert schon als außergewöhnlich gut zu beurteilen. Es lässt sich allerdings des Weiteren noch einbeziehen, dass PrP^C, welches in CHO-Zellen exprimiert wird, eine stärkere

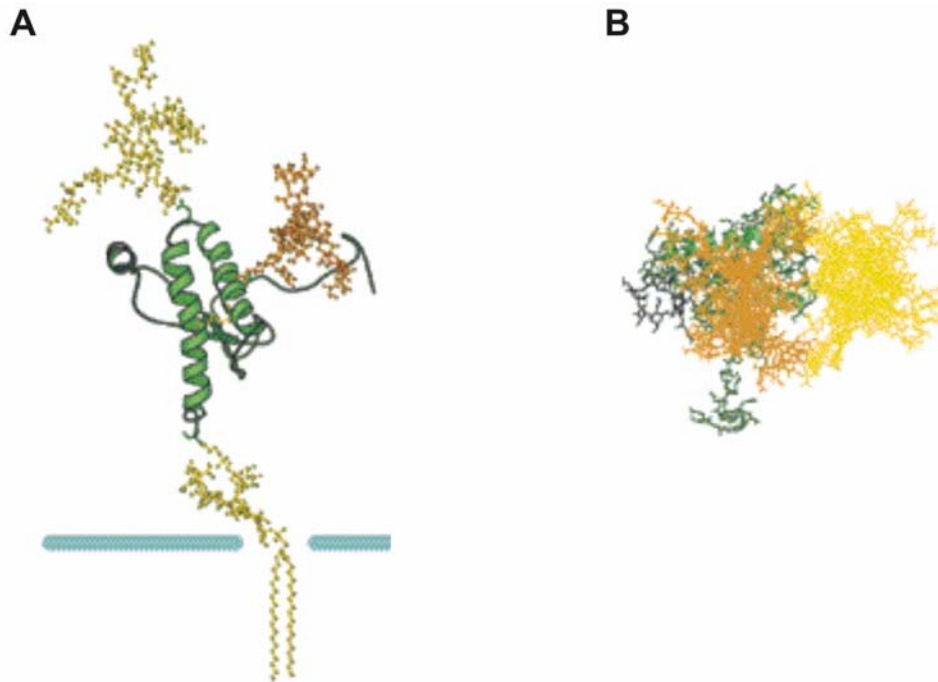


Abb. 3.24: Strukturmodell von PrP^C. Die hier gezeigten Strukturen wurden molekular modelliert. Dabei basierte die Modellierung auf der dreidimensionalen Struktur von rekPrP(90-231) der Sequenz des syrischen Hamsters und der Zusammensetzung der N-Glykosylierungen, wie sie für PrP^C aus syrischen Hamstern bestimmt wurde. (Rudd *et al.*, 2001). **A:** Seitenansicht. **B:** Aufsicht.

Verzweigung und somit eine größere Ausdehnung der N-Glykosylierungen aufweist, als PrP^C, welches im Hirn exprimiert wird. Der ermittelte Belegungsgrad von etwa 90 % entspricht also einem minimalen Wert und es ist eher anzunehmen, dass nahezu die gesamte Oberfläche nach Erreichen der Sättigung durch multiple Injektionen mit CHO-PrP^C abgedeckt ist. Näherungsweise kann deshalb eine Konzentration an Bindeplätzen auf der Oberfläche von 4.500 pg pro mm², bzw. eine Anzahl an Bindeplätzen von $7,4 \times 10^{10}$ pro mm² angenommen werden.

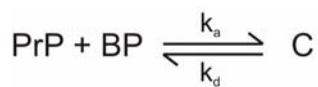
3.3.3.4 Bestimmung der kinetischen Konstanten der Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen

Assoziation:

Die bisherigen Resultate lassen darauf schließen, dass es sich bei der Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen um zwei verschiedene Reaktionen handelt: 1. Eine spezifische Bindung, die durch hydrophobe Wechselwirkungen des GPI-Ankers vermittelt wird und eine schnelle Assoziationskinetik aufweist, und 2. zu einem wesentlich geringeren Anteil eine unspezifische Bindung mit einer deutlich

langsameren Assoziationskinetik (s. Kap. 3.3.3.2). Da im Rahmen dieser Arbeit die natürliche, d.h. die GPI-Anker basierende Wechselwirkung von CHO-PrP^C mit Modellmembranen charakterisiert werden sollte, wurde lediglich die initiale Reaktion, die eine schnelle Assoziationskinetik aufweist ausgewertet. Hierzu wurde der anfängliche Bereich der gemessenen Bindungskurven, der nahezu ausschließlich durch die Kinetik der schnellen Reaktion bestimmt wird, zur Ermittlung der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten herangezogen.

Folgendes allgemeines Reaktionsschema kann für die GPI-Anker basierende Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen angenommen werden:



mit:

PrP = freies CHO-PrP^C

BP = Bindeplatz innerhalb der Membran

C = gebundenes CHO-PrP^C

k_a = Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

k_d = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante.

Daraus resultiert das Geschwindigkeitsgesetz wie folgt:

$$\frac{d[C]}{dt} = k_a [\text{PrP}] [\text{BP}] - k_d [C] .$$

Da die Konzentration an CHO-PrP^C durch den kontinuierlichen Fluss während der gesamten Messung konstant gehalten wird, gilt:

$$\frac{d[C]}{dt} = k_a [\text{PrP}_0] [\text{BP}] - k_d [C] .$$

Für die initiale Bindung kann die Konzentration an gebundenem CHO-PrP^C als Null angenommen werden. Daraus folgt für das Geschwindigkeitsgesetz:

$$\frac{d[C]}{dt} = k_a [\text{PrP}_0] [\text{BP}_0] \quad \text{für } t \rightarrow 0 .$$

Für die Auswertung mit Hilfe dieses initialen linearen Zusammenhangs ist es nicht notwendig, gesamte Bindungskurven durch multiple Injektionen zu generieren. Aus diesem Grund wurde das Bindungsverhalten von verschiedenen CHO-PrP^C-, bzw. rekPrP(29-231)-Konzentrationen bei unterschiedlichen Flussraten während jeweils

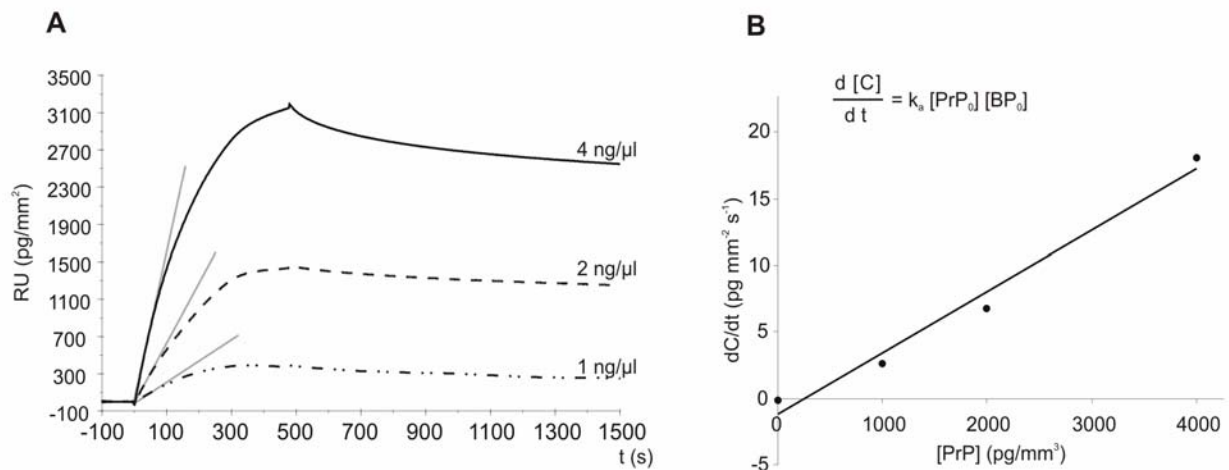


Abb. 3.25: SPR-Messung: Exemplarische Darstellung der Bestimmung der Assoziationsgeschwindigkeit. **A:** CHO-PrP^C wurde in CBS auf die angegebenen Konzentrationen eingestellt und jeweils 80 μ l wurden bei einer Flussrate von 10 μ l/min injiziert. Nach der Injektion wurde CBS bei gleich bleibender Flussrate über die Oberfläche gegeben und die Dissoziation für weitere 1.000 s beobachtet. Die Anfangssteigungen der einzelnen Bindungskurven wurden, wie dargestellt, bestimmt. **B:** Wie unter **A** dargestellt, wurden die initiale Bindungsrate ermittelt und gegen die PrP-Konzentration aufgetragen.

einer einzelnen Injektion gemessen. Exemplarisch ist dies in Abbildung 3.25 für verschiedene CHO-PrP^C-Konzentrationen bei einer Flussrate von 10 μ l/min dargestellt. Wie bereits erwähnt, entsprechen die gemessenen RU-Werte der Konzentration an gebundenem CHO-PrP^C ([C]). Die initialen Bindungsraten $d[C] / dt$ lassen sich also durch Bestimmung der Anfangssteigungen der Bindungskurven ermitteln. Die Auftragung der initialen Bindungsraten gegen die PrP-Konzentration resultiert in einem linearen Zusammenhang (s. Abb. 3.25 B), dessen Steigung definiert ist als:

$$m = \frac{d[C]}{d[PrP_0]} = k_a [BP_0] \quad \text{für } t \rightarrow 0 .$$

Auf diese Weise wurden die Bindungskurven verschiedener PrP-Konzentrationen bei unterschiedlichen Flussraten ausgewertet (s. Abb. 3.26) und die Steigungen ($k_a [BP_0]$) bestimmt. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

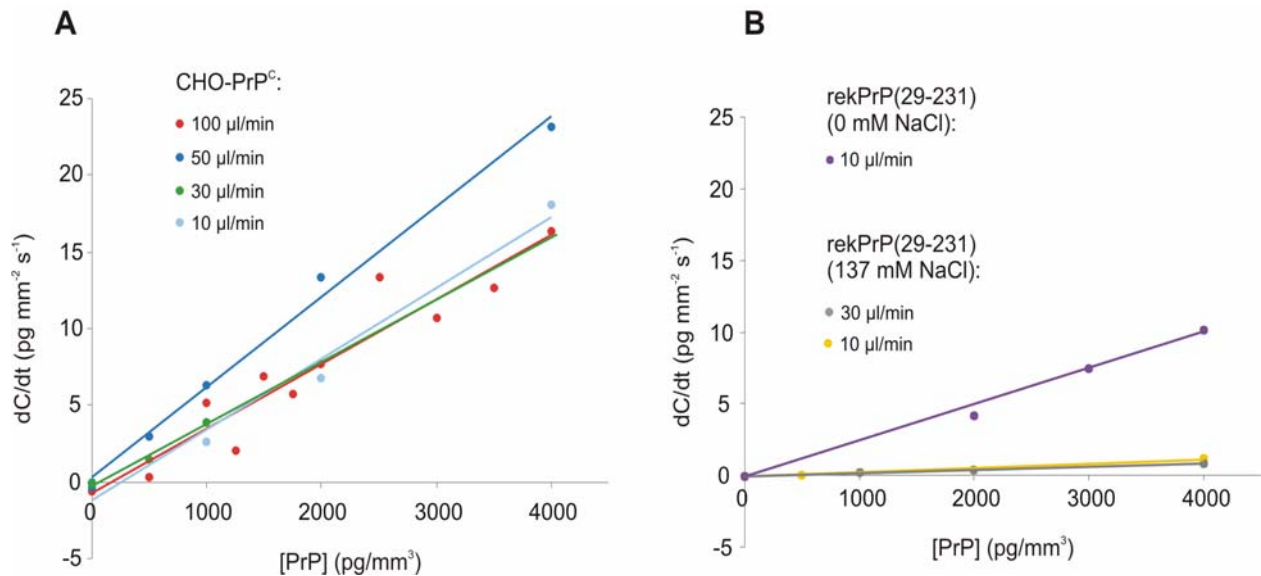


Abb. 3.26: SPR-Messung: Bestimmung der initialen Assoziationsgeschwindigkeit.

A: CHO-PrP^C wurde in CBS auf verschiedene Konzentrationen eingestellt und jeweils 80 µl wurden bei unterschiedlichen Flussrate injiziert. Die Anfangssteigungen, d.h. die initialen Bindungsraten wurden, wie in Abb. 3.25 A dargestellt, bestimmt und gegen die PrP-Konzentration aufgetragen. **B:** rekPrP(29-231) wurde in CBS, bzw. in CB auf verschiedene Konzentrationen eingestellt und jeweils 80 µl wurden bei unterschiedlichen Flussrate injiziert. Die Anfangssteigungen, d.h. die initialen Bindungsraten wurden, wie in Abb. 3.25 A dargestellt, bestimmt und gegen die PrP-Konzentration aufgetragen.

Tab. 3.1. Mittels SPR-Messungen ermittelte Assoziationsgeschwindigkeiten.

Die Abhängigkeit der initialen Bindungsrate von der PrP-Konzentration (k_a [BP₀]) wurde sowohl für CHO-PrP^C, als auch für rekPrP(29-231) bei verschiedenen Flussraten, wie in Abbildung 3.26 dargestellt, bestimmt und gemittelt. Im Falle des CHO-PrP^C wurde die Konzentration an Bindeplätzen ([BP₀]) durch mutiple Injektionen abgeschätzt.

(sd = Standardabweichung; n.b. = nicht bestimmt).

	k_a [BP ₀] ± sd (mm s ⁻¹)	[BP ₀] (BP mm ⁻²)	k_a ± sd (M ⁻¹ s ⁻¹)
CHO-PrP ^C (137 mM NaCl)	$4,7 \times 10^{-3} \pm 0,8 \times 10^{-3}$	$7,4 \times 10^{10}$	$3,9 \times 10^4 \pm 0,7 \times 10^4$
rekPrP(29-231) (137 mM NaCl)	$0,25 \times 10^{-3} \pm 0,07 \times 10^{-3}$	n.b.	n.b.
rekPrP(29-231) (0 mM NaCl)	$2,5 \times 10^{-3}$	n.b.	n.b.

Wie in Kapitel 3.3.3.3 erläutert, kann für die Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen näherungsweise eine Konzentration an Bindeplätzen von etwa 4.500 pg pro mm² angenommen werden, was einer Anzahl an Bindeplätzen von $7,4 \times 10^{10}$ pro mm² entspricht. Daraus resultiert folgende Assoziationsgeschwindigkeitskonstante für die GPI-Anker basierende Bindung von CHO-PrP^C an raft ähnliche Modellmembranen:

$$k_a = 3,9 \pm 0,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}.$$

Weiterhin zeigt die Auswertung der Assoziationsgeschwindigkeiten, dass die Bindung von rekPrP(29-231) bei hoher Ionenstärke (137 mM NaCl) im Vergleich zu der Bindung von CHO-PrP^C an raft ähnliche Modellmembranen eine deutlich geringere initiale Bindungsrate aufweist. Bei niedriger Ionenstärke (0 mM NaCl) wurde für rekPrP(29-231) eine beschleunigte Assoziation ermittelt, was bedeutet, dass die elektrostatische Wechselwirkung von rekPrP(29-231) mit Modellmembranen mit einer erhöhten Assoziationsgeschwindigkeit abläuft. Jedoch erreicht diese Wechselwirkung nicht die initiale Bindungsrate, wie sie für die spezifische Wechselwirkung von CHO-PrP^C beobachtet werden konnte. Da die GPI-Anker basierende Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen nicht durch die Ionenstärke beeinflusst wird (s. Kap. 3.3.3.2), erfolgte hierbei die Bestimmung der kinetischen Konstanten lediglich unter Bedingungen hoher Ionenstärke.

Dissoziation:

Während der Dissoziationsphase fließt in einem kontinuierlichen Fluss Puffer über die Modellmembran. Somit werden dissoziierte Proteine dem Gleichgewicht entzogen. Für die Dissoziation kann also folgendes Reaktionsschema angenommen werden:



Die zeitliche Abnahme von gebundenem PrP wird demnach durch folgendes Geschwindigkeitsgesetz beschrieben:

$$-\frac{d[C]}{dt} = k_d [C].$$

Daraus resultiert das integrierte Geschwindigkeitsgesetz:

$$[C_t] = [C_0] e^{(-k_d (t-t_0))},$$

mit:

$[C_0]$ = Konzentration an gebundenem PrP zu Beginn der Dissoziationsphase

k_d = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante.

Die Auswertung der Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziationsreaktionen erfolgte mit Hilfe der Biacore-Software BiaEvaluation (Version 4.1). Die Ermittlung der Konstanten wird dabei durch eine iterative Auswertung durchgeführt, die auf folgender Form des integrierten Geschwindigkeitsgesetzes beruht:

$$RU_t = RU_{\max} e^{(-k_d (t-t_0))} + \text{Offset}.$$

mit:

$RU_{\max}$ = Amplitude der Reaktion = $[C_0]$

k_d = Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

Offset = RU-Wert für $t \rightarrow \infty$.

Exemplarisch sind Resultate einer derartigen Auswertung verschiedener Bindungskurven in Abbildung 3.27 dargestellt. Für die Bindung von CHO-PrP^C an raft

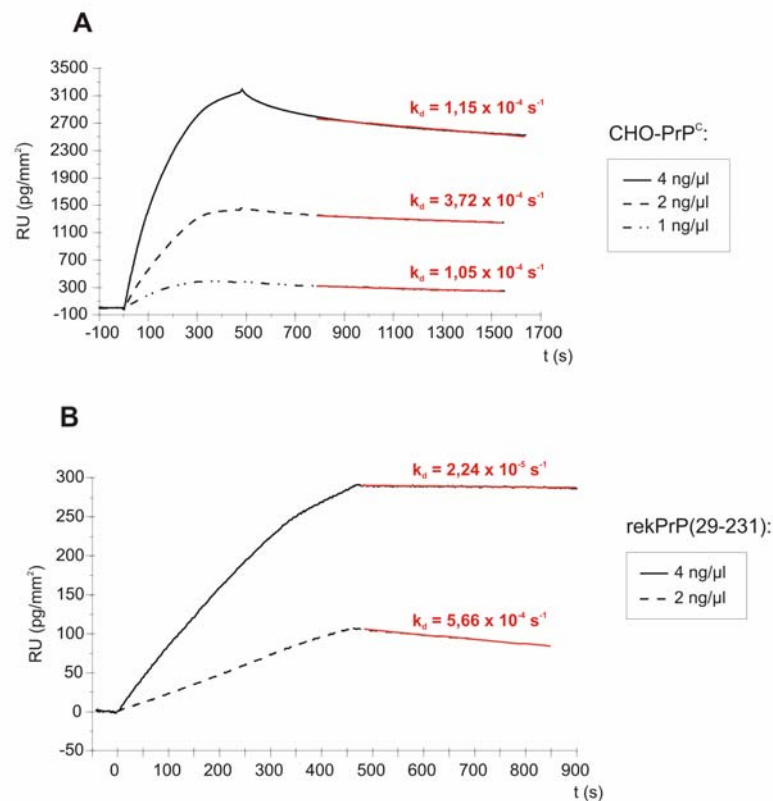


Abb. 3.27: SPR-Messung: Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit der Bindung von rekPrP(29-231), bzw. CHO-PrP^C an raft ähnliche Modellmembranen. CHO-PrP^C (A), bzw. rekPrP(29-231) (B) wurden in CBS auf unterschiedliche Konzentrationen gebracht und jeweils 80 μl wurden bei einer Flussrate von 10 μl/min injiziert. Nach der Injektion wurde CBS bei gleich bleibender Flussrate über die Oberfläche gegeben und die Dissoziation für weitere 1.000, bzw. 400 s beobachtet. Die Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten erfolgte mittels iterativer Auswertung, der als integriertes Geschwindigkeitsgesetz der Zusammenhang: $RU_t = RU_{\max} e^{(-k_d (t-t_0))} + \text{Offset}$ zu Grunde liegt (Software: BiaEvaluation). Das Resultat der so ermittelten Dissoziationskinetiken ist in rot dargestellt.

Tab. 3.2. Mittels SPR-Messungen ermittelte Dissoziationsgeschwindigkeiten.

Wie in Abbildung 3.26 dargestellt, wurden Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten für die Bindung von CHO-PrP^C, bzw. rekPrP(29-231) an raft ähnliche Modellmembranen bestimmt. (sd = Standardabweichung)

	Ionenstärke	$k_d \pm sd \text{ (s}^{-1}\text{)}$
CHO-PrP ^C	137 mM NaCl	$2,6 \times 10^{-4} \pm 1,3 \times 10^{-4}$
rekPrP(29-231)	137 mM NaCl	$3,0 \times 10^{-4} \pm 5,5 \times 10^{-4}$
	0 mM NaCl	$5,6 \times 10^{-3} \pm 0,5 \times 10^{-3}$

ähnliche Modellmembranen stellte sich heraus, dass sie in Form von zwei verschiedenen Reaktionen stattfindet. Wie in Kapitel 3.3.3.3 näher erläutert, kann für die unspezifische Reaktion eine schnellere Dissoziationskinetik angenommen werden. Um also die Dissoziationskinetik der spezifischen, GPI-Anker basierenden Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen zu ermitteln, wurde lediglich der spätere Bereich der Dissoziationsphasen, der hauptsächlich durch die langsame Dissoziationskinetik bestimmt wird, zu der Ermittlung von k_d ausgewertet (s. Abb. 3.27 A). Da für rekPrP(29-231), im Gegensatz zu CHO-PrP^C, lediglich eine Reaktion angenommen wird, wurde hierbei die gesamte Dissoziationsphase zur Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten k_d ausgewertet (s. Abb. 3.27 B).

Auf diese Weise wurden Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten für unterschiedliche PrP-Konzentrationen und Flussraten bestimmt. Die daraus erhaltenen Mittelwerte sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die spezifische Bindung von CHO-PrP^C und die unspezifische Bindung von rekPrP(29-231) an Modellmembranen bei hoher Ionenstärke eine sehr ähnliche Dissoziationskinetik aufweisen. Da sich die ermittelten initialen Bindungsraten (Vgl. Tab. 3.1) allerdings etwa um den Faktor 20 unterscheidet, konnte somit gezeigt werden, dass CHO-PrP^C eine deutlich höhere Affinität zu raft ähnlichen Modellmembranen aufweist.

Für die Bindung von CHO-PrP^C an raft ähnliche Modellmembranen kann aus den ermittelten kinetischen Konstanten die Gleichgewichtskonstante, als Maß für die Affinität, bestimmt werden. Somit ergibt sich folgende Assoziations-, bzw. Dissoziationskonstante:

$$K_a = \frac{k_a}{k_d} = 1,5 \pm 0,8 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$$

$$K_d = \frac{k_d}{k_a} = 6,7 \pm 3,6 \times 10^{-9} \text{ M} .$$

4 Diskussion

Die bisherigen Kenntnisse der molekularen Eigenschaften von PrP beruhen überwiegend auf Untersuchungen an rekPrP, welches in großen Mengen in *E. coli* hergestellt werden kann. Jedoch weist rekPrP nicht die posttranslationalen Modifikationen auf, die sowohl bei PrP^C, als auch bei PrP^{Sc} anwesend sind. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss der Modifikationen auf die grundlegenden molekularen Eigenschaften und die strukturelle Konversion von PrP^C zu untersuchen. Somit wurde zunächst die Präparation von PrP^C aus CHO-Zellen optimiert, um gereinigtes CHO-PrP^C zu erhalten, welches sowohl die beiden N-Glykosylierungen, als auch den GPI-Anker trägt. Im Anschluss wurde der Einfluss der Modifikationen auf die strukturelle Umwandlung von CHO-PrP^C in Lösung untersucht. Da PrP^C *in vivo* über den GPI-Anker in der Zellmembran verankert ist, wurde schließlich die Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen mechanistisch analysiert.

4.1 Reinigung von PrP^C aus CHO-Zellkultur

PrP^C ist ein Membranprotein, welches über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol- (GPI-) Anker extrazellulär in der Plasmamembran verankert ist. Zusätzlich zu dem GPI-Anker trägt PrP^C des Weiteren zwei Asn-verknüpfte Glykosylierungen (N-Glykosylierungen). Neben dem Einfluss auf die Löslichkeit von PrP^C ist anzunehmen, dass die N-Glykosylierungen ebenso Wechselwirkungen von PrP^C mit zellulären Komponenten beeinflussen. Es erscheint somit höchst unwahrscheinlich, dass diese posttranslationalen Modifikationen weder einen Einfluss auf die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc}, noch auf die zelluläre Funktion von PrP^C haben. Dennoch werden sehr viele *in vitro*-Untersuchungen an rekPrP durchgeführt, welches aus überexprimierenden *E. coli* Zelllinien gereinigt wird. Als prokaryotisches Expressionssystem ist *E. coli* jedoch nicht in der Lage den GPI-Anker und die beiden N-Glykosylierungen posttranslational zu verknüpfen, weshalb rekPrP lediglich die unmodifizierte Form von PrP^C darstellen kann. Es lassen sich allerdings sehr große Mengen an rekPrP mit Hilfe dieses Systems herstellen. Dadurch besitzt das prokaryotische System einen entscheidenden, technischen Vorteil gegenüber einem eukaryotischen System oder der Präparation von PrP^C aus tierischem Hirngewebe.

Da PrP^C weniger als 0,1 % des Gesamtproteins im zentralen Nervengewebe ausmacht, erwies sich die Reinigung von PrP^C aus tierischem Hirngewebe als schwierig und die Ausbeute war sehr gering. So wurden verschiedene Protokolle zur Präparation von PrP^C aus Hirngewebe von nicht-infizierten Hamstern etabliert, deren Ausbeuten von 0,7 bis 1,5 µg PrP^C pro g Hirngewebe reichen (Turk *et al.*, 1988; Bendheim *et al.*, 1988; Pan *et al.*, 1992). Diese Protokolle haben allerdings alle gemein, dass zur Solubilisierung von PrP^C und teilweise ebenso während der folgenden Reinigungsschritte entweder Detergentien in sehr hohen Konzentrationen oder denaturierende Agenzien, wie Guanidiniumthiocyanat eingesetzt werden. Diese sehr stringenten Bedingungen wurden gewählt, um eine hohe Effizienz der Solubilisierung zu gewährleisten und ein Ausfallen von PrP^C während der Aufarbeitung zu verhindern. Allerdings müssen diese Protokolle somit als denaturierende Reinigung von PrP^C angesehen werden.

1996 wurde ein Protokoll entwickelt, dass weitaus mildere Bedingungen zur Solubilisierung von PrP^C verwendet (Pergami *et al.*, 1996). Ebenso konnte eine wesentliche Erhöhung der Ausbeute auf 5 µg PrP^C pro g Hirngewebe erreicht werden. Trotz der Steigerung der Ausbeute ist dieses Protokoll zur Reinigung von PrP^C allerdings immer noch mit einem enormen Verbrauch an Versuchstieren verbunden (Das Hirn eines Hamsters wiegt etwa 1 g.). Somit war es von großem Interesse, ein Protokoll zu etablieren, dass die Präparation von vollständig modifiziertem PrP^C aus einer eukaryotischen Zellkultur bei geringst möglichem Einsatz von Detergentien erlaubt.

Die in dieser Arbeit etablierte Reinigung von PrP^C basiert auf CHO-Zellen, als eukaryotisches Expressionssystem. Bereits 1997 wurde die PrP^C-exprimierende CHO-Zelllinie etabliert (Blochberger *et al.*, 1997). Bezogen auf die Gesamtproteinmenge wird PrP^C in dieser Zelllinie im Vergleich zu PrP^C im Hamsterhirn vierzehnfach überexprimiert. Bei der Charakterisierung von CHO-PrP^C wurde allerdings festgestellt, dass CHO-PrP^C ein höheres Molekulargewicht aufweist, als PrP^C aus Hamsterhirn. Die Verknüpfung und Modifikation von Glykosylierungen stellt allgemein einen gewebespezifischen Mechanismus dar. Somit trägt PrP^C, welches in CHO-Zellen exprimiert wird zwar ebenso wie PrP^C aus Hamsterhirn zwei N-Glykosylierungen, jedoch sind diese Zuckerketten größer und stärker verzweigt. Dies führt zu einem apparenten Molekulargewicht von CHO-PrP^C von etwa 34-38 kDa im Vergleich zu PrP^C aus Hamsterhirn mit 33-35 kDa. Diese CHO-Zelllinie und das Ausgangsprotokoll zur Reinigung von CHO-PrP^C wurde von der Arbeitsgruppe von S. B. Prusiner (UCSF, San Francisco) zur Verfügung gestellt.

Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll zur Reinigung von CHO-PrP^C resultiert in einer Ausbeute von 6 bis 10 µg CHO-PrP^C pro g CHO-Zellen. Bei der Präparation von CHO-PrP^C werden ausschließlich milde Detergentien verwendet und deren

Konzentrationen möglichst gering gehalten. So wurde das ursprüngliche Protokoll (Elfrink, 2001) dahingehend optimiert, dass die Konzentration an Zwittergent während der beiden chromatographischen Reinigungsschritte von 0,2 auf 0,15 % herabgesetzt wurde.

Da die genaue Funktion von PrP^C jedoch bis heute nicht bekannt ist (Vgl. Kap. 1.2.4), ist es nicht möglich mit Hilfe eines Aktivitätstestes die native Struktur von PrP^C zu kontrollieren. Dies stellt ein großes Problem bei der Charakterisierung der einzelnen Schritte eines Reinigungsprotokolls dar, da es nicht möglich ist eindeutig festzustellen, ob die gewählten Bedingungen noch als nativ angesehen werden können oder bereits denaturierende Wirkung haben. Die Aktivität des gereinigten CHO-PrP^C konnte somit nicht als Anhaltspunkt für die Optimierung des Reinigungsprotokolls herangezogen werden. Es stand allerdings ein etabliertes System zur Verfügung, welches die strukturelle Konversion von rekPrP(90-231) in eine Isoform mit PrP^{Sc}-charakteristischen Eigenschaften erlaubt (Jansen *et al.*, 2001; Leffers *et al.*, 2004). Somit wurde die Fähigkeit, mit Hilfe dieses Systems die strukturelle Konversion von CHO-PrP^C zu induzieren, zur Optimierung des Präparationsprotokolls herangezogen (Vgl. Kap. 3.1.2). Dabei stellte sich heraus, dass es zwingend notwendig ist, die Aufkonzentrierung des gereinigten Proteins in einem Puffer durchzuführen, der keinerlei Detergentien enthält, um anschließende Konversionsanalysen (Vgl. Kap. 4.3) durchführen zu können.

4.2 Identifikation verschiedener CHO-PrP^C-Populationen unterschiedlicher Kupferaffinität

Der erste chromatographische Reinigungsschritt der in dieser Arbeit vorgestellten Präparation von CHO-PrP^C beruht auf der Affinität von PrP^C zu Kupferionen. Bei Durchführung der Kupfer-Affinitätschromatographie stellte sich heraus, dass CHO-PrP^C in zwei Populationen mit unterschiedlicher Kupferaffinität vorliegt (Vgl. Kap. 3.1.1.1): Eine CHO-PrP^C-Population (CHO-PrP^C-I) wird lediglich unter Bedingungen hoher Stringenz (150 mM Imidazol) von der Kupfer-beladenen Säule eluiert und weist ein Molekulargewicht von 34-38 kDa auf. Um die Bindung der anderen CHO-PrP^C-Population (CHO-PrP^C-II) mit einem Molekulargewicht von 29-33 kDa aufzuheben sind deutlich weniger stringente Bedingungen (10 mM Imidazol) erforderlich.

In der Literatur ist bereits beschrieben, dass im Hirn nicht-infizierter Hamster ebenfalls zwei verschiedene PrP^C-Populationen (PrP^C-I und PrP^C-II) mit unterschiedlicher Kupferaffinität auftreten (Pan *et al.*, 1992). So konnte mittels Kupfer-Affinitätschromatographie gezeigt werden, dass PrP^C-I, welches ein Molekulargewicht von 33-35 kDa aufweist, eine hohe Kupferaffinität besitzt, wohingegen PrP^C-II mit

einem Molekulargewicht von 25-27 kDa eine geringere Kupferaffinität aufweist. Pan *et al.* konnten weiterhin zeigen, dass es sich bei PrP^C-II um eine N-terminal verkürzte Form von PrP^C handelt. Besonders auffällig ist dabei, dass PrP^C-II unter identischen Bedingungen (10 mM Imidazol) von der Kupfersäule eluiert werden kann, wie es in dieser Arbeit für CHO-PrP^C-II beobachtet wurde. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei CHO-PrP^C-II um eine gleichermaßen N-terminal verkürzte Form von CHO-PrP^C handelt. In dem N-Terminus von PrP sind fünf Histidinreste lokalisiert, wovon vier in der Octarepeat-Region liegen (Vgl. Abb. 1.4). Es ist bekannt, dass diese Region für die hohe Affinität von PrP zu Kupferionen verantwortlich ist (Jackson *et al.*, 2001). Die Abwesenheit des N-Terminus und somit auch der Octarepeat-Region könnte somit zu der geringen Kupferaffinität, wie sie für CHO-PrP^C-II beobachtet werden konnte, führen. Die Tatsache, dass zwei verschiedene PrP-Populationen sowohl im Hirn von Hamstern, als auch in CHO-Zellen identifiziert werden konnten, lässt auf einen generellen zu Grunde liegenden Mechanismus schließen. Denkbar wäre hierbei entweder die Expression zwei verschiedener PrP^C-Formen durch alternatives splicing oder eine posttranslational stattfindende enzymatische Abspaltung des N-Terminus. Es bleibt allerdings unklar, welcher genaue Mechanismus *in vivo* für das Vorkommen der zwei verschiedenen Populationen von PrP^C, bzw. CHO-PrP^C verantwortlich ist.

Zur weiteren Reinigung mittels Immunopurifikation wurde ausschließlich CHO-PrP^C-I weiter verwendet, da es sich hierbei um vollständig modifiziertes CHO-PrP^C der vollen Länge handelt.

4.3 *In vitro* Konversion von CHO-PrP^C

4.3.1 Induktion der strukturellen Konversion von CHO-PrP^C

In dieser Arbeit stand erstmals vollständig modifiziertes PrP^C in Mengen und einem Reinheitsgrad, wie es für detaillierte spektroskopische Untersuchungen notwendig ist, zur Verfügung. Dies erlaubte es somit einen möglichen Einfluss der Modifikationen auf die Konversion von PrP^C zu untersuchen.

Die Induktion der Konversion *in vitro* erfolgte mittels eines Konversionssystems, dass für rekPrP(90-231) bereits detailliert untersucht wurde (Jansen *et al.*, 2001; Leffers *et al.*, 2004). Bei diesem System wird die Konversion mit Hilfe sehr geringer Mengen des anionischen Detergenz SDS induziert (Vgl. Abb. 1.5). Die *in vitro* induzierte Konversion von CHO-PrP^C wurde dabei anhand sämtlicher PrP^{Sc}-charakteristischer Eigenschaften (Vgl. Tab. 1.2) mit Ausnahme der Infektiosität verfolgt. So wurde die

Sekundärstruktur, die Löslichkeit und die Proteinase K-Zugänglichkeit von CHO-PrP^C in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration untersucht.

Strukturelle Untersuchungen zeigten, dass die Konversion von gereinigtem CHO-PrP^C unter Zunahme des β -Faltblatt-Anteils und der Bildung von hochmolekularen Aggregaten mittels des SDS-Konversionssystems induziert werden kann. Die Ergebnisse dieser strukturellen Konversion von CHO-PrP^C sind in Abbildung 4.1 zusammengefasst: Nach Einstellen auf 0,1 % SDS liegt CHO-PrP^C zunächst in einer teildenaturierten Konformation vor. Durch folgende schrittweise Verdünnung der SDS-Konzentration wird CHO-PrP^C jedoch in einer überwiegend α -helikalen Konformation stabilisiert. Im Weiteren kommt es zu einer Konformationsänderung unter Zunahme des β -Faltblatt Anteils. Weitere Verdünnung bis hin zu extrem niedrigen SDS-Konzentrationen führt schließlich zur Bildung hochmolekularer CHO-PrP^C-Aggregate. Während der Konversion von CHO-PrP^C konnten demnach sowohl eine lösliche und überwiegend α -helikale Konformation, als auch eine lösliche Konformation mit erhöhtem β -Faltblatt Anteil als Intermediate beobachtet werden. Dieselben strukturellen Intermediate wurden ebenso beobachtet, wenn SDS nicht ausgedünnt, sondern schrittweise zugegeben wurde. Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei der beobachteten *in vitro*-induzierten Konversion von CHO-PrP^C um einen reversiblen Prozess handelt. Die Intermediate der CHO-PrP^C-Konversion wurden in dieser Arbeit neben der Identifikation ihrer Sekundärstruktur nicht genauer analysiert.

Für rekPrP(90-231) ist das Auftreten dieser Intermediate bereits beschrieben (Jansen, *et al.*, 2001; Leffers *et al.*, 2004). Da rekPrP(90-231) in deutlich größeren Mengen zur Verfügung steht, konnten die Intermediate, die während der Konversion von

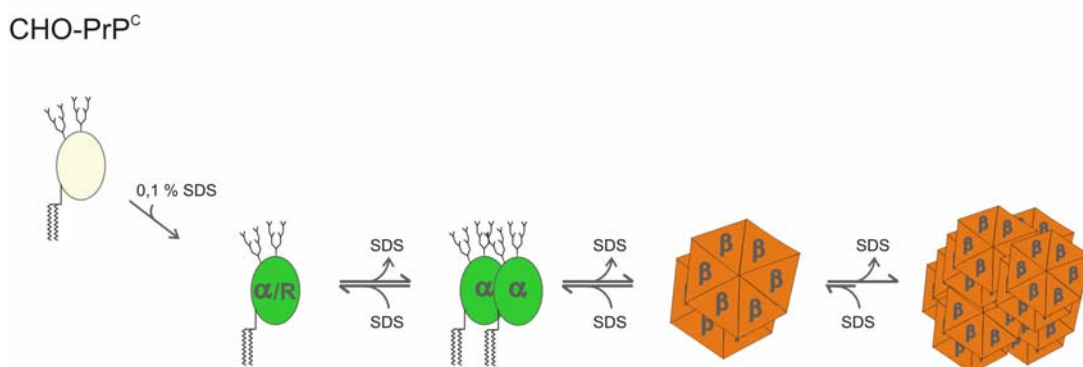


Abb. 4.1: Modell der strukturellen Konversion von CHO-PrP^C. Dieses Modell beruht auf den in dieser Arbeit beobachteten strukturellen Daten der Konversion von CHO-PrP^C in Kombination mit bereits in der Literatur beschriebenen Daten bezüglich der Konversion von rekPrP(90-231) (Jansen *et al.*, 2001; Leffers *et al.*, 2004). (Anmerkung: Zur übersichtlicheren Darstellung sind in den β -Faltblatt-reichen Isoformen von CHO-PrP^C die posttranslationalen Modifikationen nicht angedeutet.)

rekPrP(90-231) gebildet werden, genauer charakterisiert werden. So stellte sich heraus, dass es sich bei dem löslichen Intermediat mit überwiegend α -helikaler Sekundärstruktur um ein PrP-Dimer handelt. Bei der löslichen Konformation mit erhöhtem β -Faltblatt Anteil hingegen handelt es sich um ein Oligomer, das aus etwa 12 bis 16 PrP-Molekülen besteht (Leffers *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte kein genereller Unterschied in dem Mechanismus der Konversion von CHO-PrP^C und rekPrP(90-231), *in vitro* induziert durch geringe Mengen an SDS, identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde die in der Literatur beschriebene Charakterisierung der Intermediate, die während der Konversion von rekPrP(90-231) gebildet werden, in das Modell der *in vitro*-Konversion von CHO-PrP^C (s. Abb. 4.1) mit einbezogen.

Vergleich der SDS-induzierten Konversion von CHO-PrP^C und rekPrP(90-231):

Der Vergleich der SDS-Konzentration, die die strukturelle Konversion von rekPrP(90-231), bzw. CHO-PrP^C induziert (s. Abb. 4.2), zeigt, dass der Übergang von rekPrP(90-231) um etwa 0,01 % zu höheren SDS-Konzentrationen verschoben ist. Diese Verschiebung kann für die Induktion sowohl durch SDS-Zugabe, als auch durch Verdünnung der SDS-Konzentration beobachtet werden. Erklären lässt sich die Verlagerung durch die Tatsache, dass CHO-PrP^C aufgrund der beiden N-verknüpften Glykosylierungen generell eine höhere Löslichkeit aufweist als rekPrP(90-231). Diese *a priori* erhöhte Löslichkeit führt dazu, dass geringere SDS-Konzentrationen nötig sind, um lösliche CHO-PrP^C-Konformationen im Gleichgewicht zu stabilisieren.

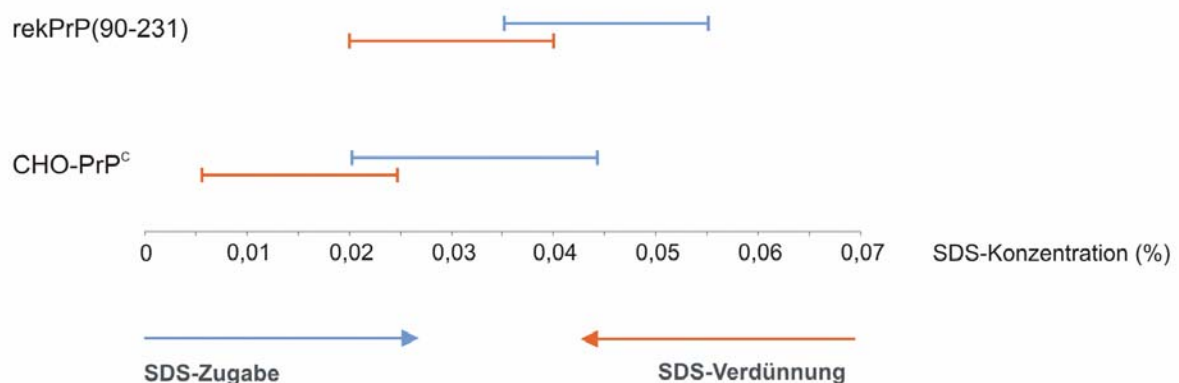


Abb. 4.2: Vergleich der SDS-induzierten strukturellen Konversion von rekPrP(90-231) und CHO-PrP^C. Dargestellt sind die SDS-Konzentrationsbereiche, bei denen die strukturelle Umwandlung von rekPrP(90-231), bzw. CHO-PrP^C hinsichtlich der Sekundärstruktur und der Löslichkeit stattfindet (Vgl. Abb. 3.7).

Wie bereits erläutert, kann der strukturelle Übergang sowohl von rekPrP(90-231), als auch von CHO-PrP^C durch die Zugabe von SDS induziert werden. Im Vergleich dazu ist die Induktion durch Verdünnung der SDS-Konzentration um etwa 0,01 bis 0,015 % zu niedrigeren SDS-Konzentrationen verschoben. D.h., dass im Fall der Induktion durch SDS-Zugabe mehr SDS-Moleküle notwendig sind, um eine lösliche α -helikale Konformation von PrP zu stabilisieren. Um diese Beobachtung erklären zu können, muss zunächst folgender genereller Unterschied der beiden Induktionswege deutlich gemacht werden. Im Falle der Induktion durch SDS-Verdünnung wird zunächst die Bildung einer teildenaturierten Konformation von PrP induziert. Ausgehend davon lassen sich dann die verschiedenen strukturellen Isoformen generieren. Im Falle der Induktion durch SDS-Zugabe hingegen geht die Konversion nicht von einer teildenaturierten Konformation des PrP aus. Es lässt sich demnach annehmen, dass für den Fall der SDS-Zugabe mehr SDS-Moleküle notwendig sind, um die Aktivierungsbarriere zu überschreiten und eine lösliche α -helikale Konformation zu stabilisieren. Aus Untersuchungen der Konversion von rekPrP(90-231) (Leffers *et al.*, 2004) ist bekannt, dass verschiedene Typen von Bindungsplätzen für die hydrophobe Wechselwirkung von SDS mit PrP existieren. Nach Einstellung einer teildenaturierten Konformation von PrP müssen demnach bestimmte Bindungsplätze durch die Dissoziation von SDS zugänglich gemacht werden, um die Konversion des PrP unter Dimerisierung und einer anschließenden Bildung von β -Faltblatt-reichen Oligomeren zu induzieren. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass für diesen Fall der Induktion eine stärkere Verdünnung der SDS-Konzentration notwendig ist, um bereits gebundene SDS-Moleküle von der PrP-Oberfläche zu entfernen. Dadurch werden Bindeplätze auf der PrP-Oberfläche für eine PrP-PrP-Wechselwirkung zugänglich, wodurch es zur Konversion von PrP kommt.

Wie in Kapitel 3.2.3 bereits erwähnt, könnte es sich, zusätzlich zu den bisher aufgeführten Ursachen, bei der beobachteten Verschiebung der SDS-Konzentrationsbereiche, die zur Induktion der Konversion führen, um einen kinetischen Effekt handeln. Die in Abbildung 4.2 dargestellten Übergangsbereiche beruhen auf Untersuchungen nach einer Inkubation der Ansätze für jeweils 20 h. Es ist durchaus denkbar, dass es sich bei der Konversion von PrP um einen so langsamen Prozess handelt, dass diese Inkubationszeit nicht zur Einstellung der Gleichgewichte ausreichend ist und dass sich der beobachtete Unterschied der Übergangsbereiche über einen längeren Zeitraum aufheben könnte.

4.3.2 Induktion partieller Proteinase K-Resistenz von CHO-PrP^C

Wie in dem vorangegangenen Kapitel beschrieben, geht die SDS-induzierte Konversion von CHO-PrP^C mit der Generierung eines deutlich erhöhten β -Faltblatt Anteils und der Bildung von hochmolekularen PrP-Aggregaten einher, was den typischen strukturellen Eigenschaften von PrP^{Sc} entspricht. Ein weitaus charakteristischeres Merkmal von PrP^{Sc} ist jedoch seine außergewöhnliche partielle Resistenz gegenüber proteolytischer Verdauung mittels Proteinase K (PK). Dabei kommt es zu einer N-terminalen Verkürzung von PrP^{Sc}, die unter Beibehaltung der Infektiosität zur Akkumulation eines C-terminalen Fragmentes, PrP 27-30, führt (Vgl. Abb. 1.1). Es stellte sich somit die Frage, ob die strukturelle Umwandlung von CHO-PrP^C zu einem erhöhten β -Faltblatt Anteil neben der Bildung von hochmolekularen Aggregaten ebenso mit der Generierung dieser PrP^{Sc}-charakteristischen PK-Resistenz einhergeht.

Die in Kapitel 3.2.4 beschriebene Analyse der PK-Zugänglichkeit verschiedener CHO-PrP^C-Konformationen zeigt, dass sowohl lösliches CHO-PrP^C mit einer überwiegend α -helikalen Struktur, als auch β -Faltblatt-reiche hochmolekulare CHO-PrP^C-Aggregate zunächst eine partielle Resistenz aufweisen. Durch die Verwendung eines Antikörpers (R1), dessen Epitop im C-Terminus der PrP-Sequenz lokalisiert ist, konnte gezeigt werden, dass diese CHO-PrP^C-Fragmente durch eine N-terminale Verkürzung des Proteins entstanden sind. Jedoch weisen die resultierenden C-terminalen Fragmente in Abhängigkeit von der CHO-PrP^C-Konformation deutliche Unterschiede auf (s. Abb. 4.3). So wird das Fragment, welches durch PK-Verdauung von löslichem und α -strukturiertem CHO-PrP^C zunächst gebildet wird, von dem Antikörper 3F4 nicht erkannt. Zusätzlich stellte sich heraus, dass dieses Fragment durch weitere Verdauung mit PK schnell vollständig abgebaut wird. Dies lässt darauf schließen, dass es sich hierbei nicht um die PrP^{Sc}-spezifische PK-Resistenz, sondern vielmehr um das kurzzeitige Auftreten eines natürlichen intermediären Abbauproduktes handelt. Es ist in der Literatur bereits beschrieben, dass PrP^C, welches aus dem Hirn nicht-infizierter Hamster stammt, ebenfalls ein kurzzeitig auftretendes Abbauprodukt bei proteolytischer Verdauung mittels PK aufweist (Buschmann *et al.*, 1998). So konnte durch detailliertes *epitope mapping* gezeigt werden, dass dieses Abbauprodukt ein C-terminales Fragment von PrP^C darstellt, wobei der N-terminale Abbau bis zu einem Bereich zwischen den Aminosäuren 114 und 144 stattgefunden haben muss. Weiterhin ist aus NMR- spektroskopischen Analysen bekannt, dass der N-terminale Bereich von rekPrP(29-231) von Aminosäure 29 bis 124 als lange, flexible Kette aus dem C-terminalen, gut strukturierten Bereich hervorragt (Donne *et al.*, 1997). Proteolytische Verdauung mittels Proteinase K stellt zwar einen Sequenz-

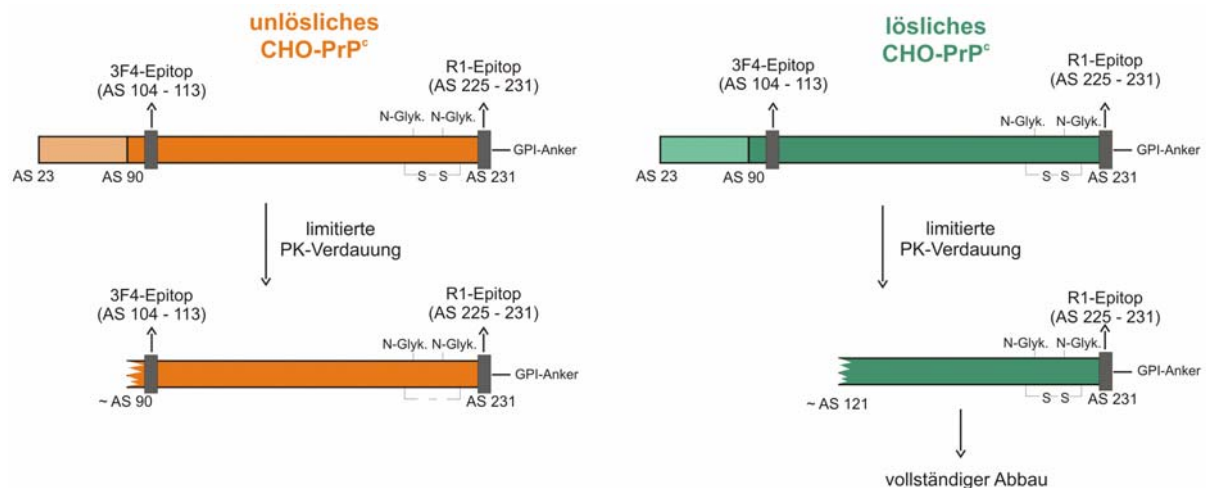


Abb. 4.3: Generierung partieller PK-Resistenz von CHO-PrP^C. Basierend auf Daten aus *epitope mapping*-Experimenten mit Hilfe der angegebenen Antikörper in Verbindung mit bereits bekannten Daten aus der Literatur (s. Text) wurden die Fragmente, die durch limitierte PK-Verdauung von verschiedenen CHO-PrP^C-Konformationen entstehen, wie dargestellt zugeordnet.

unabhängigen Prozess dar, jedoch können strukturierte Bereiche des abzubauenen Proteins, wie α -Helices und β -Faltblätter durchaus die Enzym-Substrat Interaktion behindern. Dies lässt darauf schließen, dass der proteolytische Abbau sowohl von PrP^C, als auch von löslichem CHO-PrP^C in Form einer zweistufigen Kinetik abläuft, wobei zunächst der N-terminal gelegene flexible Teil und in einer langsameren Kinetik im Folgenden dann der strukturierte C-terminale Teil degradiert wird.

Durch PK-Verdauung von β -Faltblatt-reichen CHO-PrP^C-Aggregaten hingegen akkumuliert ein Fragment, welches von dem Antikörper 3F4 erkannt wird. Des Weiteren stellte sich heraus, dass dieses Fragment durch N-terminale Abspaltung von etwa 68 Aminosäuren entstanden ist. Diese beiden Merkmale stellen charakteristische Eigenschaften des PK-resistenten Fragmentes PrP 27-30 dar, welches aus natürlichem PrP^{Sc} gebildet werden kann. Es lässt sich also festhalten, dass die in dieser Arbeit erzielte strukturelle Konversion von CHO-PrP^C neben der Zunahme des β -Faltblatt Anteils und der Bildung von hochmolekularen Aggregaten ebenso zu der Ausbildung der PrP^{Sc}-charakteristischen Schnittstelle für PK mit anschließender Resistenz führt.

Vergleich mit anderen Konversionssystemen:

Bei der SDS-induzierten Konversion von rekPrP(90-231) (Jansen *et al.*, 2001; Leffers *et al.*, 2004), lässt sich die Generierung der PrP^{Sc}-charakteristischen PK-Resistenz nicht untersuchen, da das Ausgangsmaterial bereits die PrP 27-30 entsprechende verkürzte Form von rekPrP darstellt.

Ein Weiteres Konversionssystem erzielte die strukturelle Konversion von PrP der vollen Länge, welches zwar den GPI-Anker, jedoch nicht die beiden N-Glykosylierungen trägt (Xiong *et al.*, 2001). Bei diesem System wird die Konversion ebenfalls mit Hilfe eines Dezergerenz induziert. So führt die Einstellung auf 0,01 % Sarkosyl zu der Umfaltung von PrP unter Zunahme des β -Faltblatt Anteils und der Aggregation von PrP unter der Ausbildung von fibrillären Strukturen. Jedoch konnte die Generierung der PrP^{Sc}-charakteristischen PK-Resistenz in diesem System nicht beobachtet werden. Schließlich wurde ein Konversionssystem beschrieben, welches zur Generierung der PrP^{Sc}-charakteristischen PK-Resistenz *in vitro* führt (Baskakov, 2004; Bocharova *et al.*, 2005). Die Induktion der Konversion erfolgt bei diesem System durch die Einstellung von rekPrP(23-230) auf 1 M GdnHCl, 3 M Harnstoff und 150 mM NaCl bei neutralem pH-Wert. Die strukturelle Konversion geht dabei mit der Bildung von amyloiden Fibrillen bestehend aus β -Faltblatt reichem rekPrP(23-230) einher. Mit Hilfe dieses Systems ist es weiterhin erstmals gelungen, lösliches und nicht-infektiöses rekPrP(89-230) *in vitro* in eine infektiöse Form, die so genannten synthetischen Prionen, zu überführen (Legname *et al.*, 2004). In diesem Zusammenhang lässt sich der Einfluss der posttranslationalen Modifikationen auch im Hinblick auf Infektiosität diskutieren: Wie bereits in Kapitel 1.3 ausführlich beschrieben, weisen die synthetischen Prionen allerdings eine deutlich geringere Infektiosität auf als natürliche Prionen. So konnte die Infektiosität der synthetischen Prionen nur unter Verwendung von transgenen Mäusen, welche die verkürzte Form des PrP (PrP^C(89-230)) überexprimieren, nachgewiesen werden. Nach zweiter Passage in Wildtyp-Mäuse wurde allerdings eine deutliche Zunahme der Infektiosität festgestellt. Dies bedeutet, dass die erste Passage in transgenen Mäusen als eine natürliche Amplifikation der Infektiosität angesehen werden kann. Während dieser Amplifikation kommt es demnach zur Konversion von vollständig modifiziertem und hoch infektiösem PrP. Die weniger infektiösen synthetischen Prionen hingegen bestehen aus rekPrP(89-230), welches weder die beiden N-Glykosylierungen, noch den GPI-Anker trägt. Diese Untersuchungen lassen somit darauf schließen, dass die posttranslationalen Modifikationen zwar nicht zwingend notwendig sind, um Infektiosität zu generieren, aber dennoch dazu führen, dass der erzielte Grad an Infektiosität deutlich gesteigert wird. Demnach kann angenommen werden, dass die posttranslationalen Modifikationen einen Einfluss auf die Spezifität der Konversion haben. Hierbei ist ein direkter Einfluss der N-Glykosylierungen auf die Interaktion von PrP^C mit PrP^{Sc}-Keimen durchaus denkbar. Für den GPI-Anker hingegen ist es weitaus wahrscheinlicher, einen indirekten Einfluss in Form der natürlichen Lokalisation von PrP^C in der Membrenumgebung anzunehmen.

Zusammenfassend deuten diese Untersuchungen darauf hin, dass verschiedene Eigenschaften von PrP^{Sc} gegeben sein müssen, um die *in vitro*-Generierung von Infektiosität, vergleichbar zu der Infektiosität von natürlichem PrP^{Sc}, zu ermöglichen:

- Sekundärstruktur: hoher β -Faltblatt Anteil
- Ultrastruktur: amyloide Fibrillen
- PK-Zugänglichkeit: partielle Resistenz
- kovalente Modifikationen: N-Glykosylierungen und GPI-Anker

In dieser Arbeit konnte die Konversion von vollständig modifiziertem CHO-PrP^C in eine β -Faltblatt-reiche Konformation und als Folge daraus die Generierung partieller PK-Resistenz gezeigt werden. Demnach sind drei dieser Eigenschaften, die mit der Infektiosität korrelieren, erfolgreich kombiniert worden. Weitere Untersuchungen bezüglich der Bildung von amyloiden Fibrillen bestehend aus CHO-PrP^C und die Analyse von eventuell generierter Infektiosität stehen jedoch noch aus.

In der Literatur ist bereits ein System beschrieben, das die Generierung von fibrillären Strukturen bestehend aus PrP^C, welches aus Hamsterhirn gereinigt wurde, ermöglicht (Leffers *et al.* 2005). Die Konversion von PrP^C wurde in diesem System durch Einstellen der Probe auf 0,01 % SDS und 250 mM NaCl induziert. Allerdings war hierfür eine sehr lange Inkubationszeit von etwa 5 Wochen notwendig und die Ausbeute an fibrillären Strukturen in Bezug auf die eingesetzte Menge an PrP^C blieb mit etwa 15 % sehr gering. Die eingestellten Bedingungen wurden aus detaillierten Konversionsanalysen von rekPrP(90-231) abgeleitet. Da die Reinigung von PrP^C aus Hamsterhirn mit einer sehr geringen Ausbeute verbunden ist, lassen sich die oben erwähnten Bedingungen bezüglich der Ausbeute an fibrillären Strukturen von PrP^C nicht systematisch optimieren. Wie in dieser Arbeit anhand des Vergleiches der strukturellen Konversion von rekPrP(90-231) und CHO-PrP^C festgestellt werden konnte, haben die posttranslationalen Modifikationen jedoch einen Einfluss auf die Bedingungen, die die Konversion von PrP^C induzieren können. Dies lässt annehmen, dass die geringe Ausbeute an fibrillären Strukturen von PrP^C darauf zurückzuführen ist, dass die Bedingungen nicht optimal gewählt waren. Des Weiteren konnte im Tierversuch keine Infektiosität derartig präparierter fibrillärer Strukturen von PrP^C detektiert werden. Dies lässt nicht zwingend darauf schließen, dass die gebildeten PrP^C-Fibrillen keine Infektiosität aufwiesen, da es ebenso denkbar ist, dass die Mengen an Infektiosität, die in diesem System eventuell generiert werden konnten, unter der Nachweisgrenze des Infektiositätstests lagen. Dies erscheint umso wahrscheinlicher durch Berücksichtigung der Tatsache, dass die Präparation von PrP^C-Fibrillen mit einer sehr geringen Ausbeute verbunden war. Da CHO-PrP^C in deutlich größeren Mengen präpariert werden kann, eröffnet sich nun die Möglichkeit,

dass System hinsichtlich der Ausbeute an CHO-PrP^C-Fibrillen zu optimieren und bezüglich eventuell generierter Infektiosität erneut zu untersuchen.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Konversionssysteme, die die strukturelle Umwandlung von PrP *in vitro* untersuchen, haben alle gemein, dass sie in Lösung durchgeführt werden. Auch bei dem, in dieser Arbeit angewandten, SDS-System findet die Konversion von CHO-PrP^C in Lösung statt. PrP^C ist *in vivo* allerdings in der Plasmamembran in bestimmten Mikrodomänen, den so genannten rafts, verankert (Vey *et al.*, 1996). Es ist anzunehmen, dass diese Membranlokalisation durchaus einen Einfluss auf die Struktur und Orientierung von PrP^C hat. Des Weiteren muss beachtet werden, dass durch die Verankerung von PrP^C in der Membran die Dreidimensionalität der Lösung auf zwei Dimensionen eingeschränkt wird. Wie in Kapitel 1.4 (Zwei-Phasen-Modell) bereits näher erläutert, weisen einige Untersuchungen darauf hin, dass die Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} an der Membranoberfläche stattfindet. So konnte *in vivo* beobachtet werden, dass PrP^C und PrP^{Sc} in rafts kolokalisiert sind (Vey *et al.*, 1996; Naslavsky *et al.*, 1997) und dass die PrP^{Sc}-induzierte Konversion die Verankerung von PrP^C über den GPI-Anker in rafts zwingend erfordert (Kaneko *et al.*, 1997).

Unter Berücksichtigung dieses Hintergrundes wurde die SDS-induzierte Konversion von rekPrP(90-231) verschiedentlich als ein Membran simulierender Effekt von SDS diskutiert (Jansen *et al.*, 2001; Leffers *et al.*, 2004). Als Detergenz weist SDS durchaus ähnliche Eigenschaften, wie z. B. den amphiphilen Charakter, wie natürliche Lipide auf. Diese Interpretation der SDS-Wirkung gilt natürlich umso mehr für CHO-PrP^C, da hier der GPI-Anker als natürlicher Wechselwirkungspartner vorhanden ist. Somit würde die Induktion der Konversion von CHO-PrP^C durch Verdünnung der SDS-Konzentration *in vivo* dem Herauslösen von PrP^C aus der Plasmamembran entsprechen (Vgl. Abb. 1.8).

Die Tatsache, dass CHO-PrP^C den GPI-Anker trägt, eröffnet jedoch die Möglichkeit zur Rekonstitution von CHO-PrP^C in Modellmembranen. Dadurch lässt sich das Konversionssystem der *in vivo* Situation deutlich näher bringen.

4.4 Rekonstitution von CHO-PrP^C in Modellmembranen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Rekonstitution von CHO-PrP^C in Modellmembranen durch zwei unabhängige Methoden nachgewiesen werden. So wurde zunächst mittels Dichtegradientenzentrifugation die Bindung von CHO-PrP^C an raft ähnliche Lipidvesikel beobachtet (Vgl. Kap. 3.3.2). Die Durchführung von SPR (surface plasmon resonance)-Messungen erlaubte es im Folgenden die Wechselwirkung von CHO-PrP^C mit raft ähnlichen Lipidbilayern (im Folgenden

Modellmembranen genannt) quantitativ zu untersuchen und sogar kinetisch aufzulösen (Vgl. Kap. 3.3.3). In einer anderen Studie (Critchley *et al.*, 2004) wurde mittels SPR-Messungen bereits die Kinetik der Bindung von verschiedenen rekPrP(90-231)-Isoformen (α PrP und β PrP) an Modellmembranen untersucht. Da rekPrP allerdings keinen GPI-Anker trägt, erlaubt dieses System keine Schlussfolgerungen bezüglich der natürlichen Wechselwirkung von PrP^C mit Membranen. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenso die Bindung von rekPrP(29-231) an Modellmembranen untersucht. Jedoch diene hier dieser Ansatz vielmehr als Kontrolle der Spezifität der beobachteten Wechselwirkung von CHO-PrP^C mit Modellmembranen. Die Tatsache, dass rekPrP(29-231) eine deutlich geringere Affinität zu Modellmembranen aufweist, lässt auf die hohe Spezifität der Bindung von CHO-PrP^C schließen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Affinität von CHO-PrP^C zu Modellmembranen nahezu unabhängig von der Ionenstärke ist. Da hydrophobe Wechselwirkungen nicht von der Ionenstärke beeinflusst werden, lässt dies darauf schließen, dass die beobachtete Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen durch hydrophobe Wechselwirkungen des GPI-Ankers mit der Modellmembran vermittelt wird. Somit ist es erstmals gelungen, gereinigtes PrP^C über die natürlichen Wechselwirkungen des GPI-Ankers mit Lipiden in eine Modellmembran einzulagern.

Die Sättigung der Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen lässt sich allerdings nur durch repetitive Injektionen, unterbrochen von kurzen Dissoziationsphasen erreichen (Vgl. Kap. 3.3.3.3). Solche multiplen Injektionen führen zu einer stufenartigen Bindung von CHO-PrP^C an die Modellmembran (Vgl. Abb. 3.21). Während der kurzen Dissoziationsphasen zwischen den einzelnen Injektionen ist die Abnahme des Signals sehr gering, was bedeutet, dass nur wenige Moleküle von der Membran dissoziieren. Diese Dissoziation führt allerdings dazu, dass während der folgenden Injektion deutlich mehr Moleküle assoziieren können. Daraus folgt, dass die kurzen Dissoziationsphasen bewirken, dass für die Bindung von CHO-PrP^C an die Modellmembran weitere Bindeplätze zugänglich gemacht werden. Wie bereits erwähnt, kann anhand der in dieser Arbeit durchgeführten kinetischen Untersuchungen nicht eindeutig hergeleitet werden, welcher zu Grunde liegende Mechanismus zu dieser stufenartigen Bindung von CHO-PrP^C an raft ähnliche Modellmembranen führt. Es lässt sich jedoch festhalten, dass es während der kurzen Dissoziationsphasen zu einer Umstrukturierung kommen muss, welche bewirkt, dass mehr Bindeplätze innerhalb der Modellmembran zugänglich gemacht, bzw. neu geschaffen werden. Hierfür wäre eine Organisation der verschiedenen Lipide innerhalb der Modellmembran, eine strukturelle Umwandlung von CHO-PrP^C oder ein Übergang von verschiedenen Typen der Bindung von CHO-PrP^C an die Modellmembran denkbar. Im Folgenden sollen zwei mechanistische Modelle

formuliert werden, die zu der beobachteten sukzessiven Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen führen können:

Es ist bekannt, dass sich raft ähnliche Mikrodomänen innerhalb von künstlich hergestellten Modellmembranen durch Lipid-Lipid-Interaktionen bilden können und dass GPI-geankerte Proteine hauptsächlich in Bereichen dieser Mikrodomänen an Modellmembranen binden (Dietrich *et al.* 2001; Saslowsky *et al.* 2002). Es ist also davon auszugehen, dass es sich, bei den in dieser Arbeit präparierten raft ähnlichen Lipidbilayern, um inhomogene Systeme mit unterschiedlichen Bindeplätzen handelt. Somit könnte die beobachtete stufenartige Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen dadurch erklärt werden, dass es während der kurzen Dissoziationsphasen zwischen den einzelnen Injektionen zu einer Reorganisation der Lipide, bzw. der gebundenen Proteine kommt. Dies könnte dazu führen, dass weitere Bindeplätze innerhalb der Membran neu geschaffen, bzw. zugänglich gemacht werden.

Eine weitere mögliche Erklärung für die beobachtete stufenartige Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen lässt sich unter Berücksichtigung der geringen Affinität von rekPrP(29-231) herleiten. Da CHO-PrP^C und rekPrP(29-231) die identische Aminosäuresequenz aufweisen, lässt sich annehmen, dass CHO-PrP^C neben der spezifischen, GPI-Anker basierenden Wechselwirkung ebenso die für rekPrP(29-231) beobachtete unspezifische Wechselwirkung mit der Modellmembran eingehen kann (Vgl. Abb. 3.18). Diese Art der ungeordneten Wechselwirkung von einem CHO-PrP^C-Molekül mit der Oberfläche des Bilayers könnte zu einer Blockierung von mehreren hydrophoben Bindeplätzen innerhalb der Membran führen. Wenn diese unspezifische Bindung während der folgenden kurzen Dissoziationsphase aufgehoben wird, würde dies dazu führen, dass weitere hydrophobe Bindeplätze innerhalb der Membran für die GPI-Anker basierende Wechselwirkung zugänglich gemacht werden.

Ebenso könnte es sich bei dem zugrunde liegenden Mechanismus um eine Kombination aus den beiden vorgestellten Modellen handeln. Diese Kombination führt zu folgendem, favorisierten Modell des Mechanismus der Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen: Die Bindung wird hierbei als ein zweistufiger Prozess angenommen. Zunächst bindet CHO-PrP^C unspezifisch an die Oberfläche des Lipidbilayers. Im Anschluss daran kommt es zu einer spezifischen Einlagerung des GPI-Ankers in die Modellmembran. Durch die ungeordnete Bindung vieler CHO-PrP^C-Moleküle an die Oberfläche wird jedoch eine Umstrukturierung, sei es der Lipidmoleküle oder der spezifisch eingelagerten CHO-PrP^C-Moleküle zunächst verhindert. Erst während der kurzen Dissoziationsphasen kommt es zur Ablösung von unspezifisch gebundenem CHO-PrP^C. Dies hat zur Folge, dass es zur Umstrukturierung innerhalb des Lipidbilayers kommt, wodurch mehr Bindeplätze bei der folgenden Injektion von CHO-PrP^C zur Verfügung stehen.

Die Bedeutung der hier dargestellten Mechanismen sollte jedoch nicht überbewertet werden, da sie lediglich mögliche Erklärungsansätze für die stufenartige Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen, die in dem experimentellen Ansatz beobachtet wurde, darstellen und nicht in Bezug auf den *in vivo*-Mechanismus der Membranbindung von PrP^C diskutiert werden.

Die Bestimmung der kinetischen Konstanten zeigte, dass sich die Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen durch eine schnelle Assoziationskinetik ($k_a = 3,9 \pm 0,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und eine langsame Dissoziationskinetik ($k_d = 2,6 \pm 1,3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) auszeichnet. In Anwesenheit einer Modellmembran liegt CHO-PrP^C demnach überwiegend in der membranständigen Form und nur zu einem sehr geringen Anteil in Lösung vor.

Um diesen Zusammenhang weiter zu veranschaulichen, soll im Folgenden die Konzentration an freiem CHO-PrP^C, welches sich im Gleichgewicht mit gebundenem CHO-PrP^C befindet, mit Hilfe der ermittelten kinetischen Konstanten bestimmt werden: Die Rate der Dissoziation und der Assoziation sind definiert als:

Dissoziationsrate:

$$\frac{d [\text{PrP}_{\text{frei}}]}{d t} = k_d [\text{BP}_{\text{geb}}] = k_d ([\text{BP}_{\text{ges}}] - [\text{BP}_{\text{frei}}]);$$

Assoziationsrate:

$$\frac{d [\text{PrP}_{\text{geb}}]}{d t} = k_a [\text{BP}_{\text{frei}}] [\text{PrP}_{\text{frei}}].$$

mit:

PrP_{frei} = freies CHO-PrP^C

PrP_{geb} = gebundenes CHO-PrP^C

BP_{frei} = freie Bindeplätze

BP_{geb} = gebundene Bindeplätze

BP_{ges} = gesamte Bindeplätze

Das Gleichgewicht ist dadurch definiert, dass die Dissoziationsrate genau der Assoziationsrate entspricht:

$$k_d ([\text{BP}_{\text{ges}}] - [\text{BP}_{\text{frei}}]) = k_a [\text{BP}_{\text{frei}}] [\text{PrP}_{\text{frei}}].$$

Für die Konzentration an freiem CHO-PrP^C im Gleichgewicht gilt somit:

$$[\text{PrP}_{\text{frei}}] = \frac{k_d}{k_a} \frac{[\text{BP}_{\text{ges}}] - [\text{BP}_{\text{frei}}]}{[\text{BP}_{\text{frei}}]}.$$

Durch die Einführung des Besetzungsgrades θ der Bindeplätze mit:

$$\theta = \frac{[\text{BP}_{\text{geb}}]}{[\text{BP}_{\text{ges}}]} = \frac{[\text{BP}_{\text{ges}}] - [\text{BP}_{\text{frei}}]}{[\text{BP}_{\text{ges}}]}$$

ergibt sich für die freie Konzentration an CHO-PrP^C folgender Zusammenhang:

$$[\text{PrP}_{\text{frei}}] = \frac{k_d}{k_a} \frac{\theta}{1 - \theta}.$$

Mit einem Wert für K_d von etwa 7×10^{-9} M, wie er in dieser Arbeit bestimmt wurde, kann somit folgende Situation an der Oberfläche der Modellmembran beschrieben werden:

relative Belegung der Bindeplätze	Besetzungsgrad θ	$[\text{PrP}_{\text{frei}}]$
10 %	0,1	8×10^{-10} M
50 %	0,5	7×10^{-9} M
90 %	0,9	6×10^{-8} M

Bei einer relativen Belegung der Bindeplätze von 10 % beträgt die Konzentration an freiem CHO-PrP^C lediglich 0,8 nM. Eine Erhöhung des Besetzungsgrades führt zwingend ebenso zu einer Erhöhung der Konzentration an freiem CHO-PrP^C, jedoch ist bei einer relativen Belegung der Bindeplätze von 90 % die CHO-PrP^C-Konzentration in Lösung mit 60 nM immer noch sehr gering. Bei Belegung von 50 % der Bindeplätze, was im allgemeinen als Halbsättigung bezeichnet wird, weist die Konzentration an freiem CHO-PrP^C mit 7 nM genau den Wert der Dissoziationskonstanten auf. Dies zeigt deutlich, dass die Konzentration an freiem CHO-PrP^C, welches sich im Gleichgewicht mit gebundenem CHO-PrP^C befindet, stets sehr gering ist.

4.5 Das Zwei-Phasen-Modell der Konversion von CHO-PrP^C

In Kapitel 1.4 wurde das Zwei-Phasen-Modell der Prion-Replikation bereits ausführlich erläutert (Vgl. Abb. 1.8). Der in diesem Modell postulierte Mechanismus der Replikation berücksichtigt die Verteilung von PrP^C zwischen der Plasmamembran und dem Extrazellulärraum. Da in dieser Arbeit genau diese Verteilung untersucht wurde,

stellt sich somit die Frage, ob die erzielten Ergebnisse mit den Mechanismen, wie sie im Zwei-Phasen-Modell gefordert werden, in Einklang zu bringen sind.

Die kinetischen Analysen zeigten, dass sich die Bindung von CHO-PrP^C an Modellmembranen durch eine schnelle Assoziation und eine langsame Dissoziation auszeichnet. Das Gleichgewicht der CHO-PrP^C-Membran-Wechselwirkung liegt demnach weit auf der Seite der membranständigen Form des CHO-PrP^C. Wie im Vorrangegangenen Kapitel erläutert, ist die Konzentration an freiem CHO-PrP^C, auch bei einer sehr hohen relativen Belegung der Bindeplätze von 90 %, mit etwa 60 nM immer noch sehr gering. Dies entspricht genau dem Zusammenhang, wie er im Zwei-Phasen-Modell postuliert wurde (s. Abb. 4.4). Des Weiteren geht das Modell von einer spontanen Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} beim Übergang von der Membranoberfläche in das wässrige Medium aus. Da spontane Erkrankungen jedoch nur sehr selten und ausschließlich in einem hohen Lebensalter auftreten, muss dieser Übergang zwingend als sehr unwahrscheinlich angenommen werden. Dieses sehr seltene Ereignis der spontanen Konversion von PrP^C nach Verlassen der Membranumgebung lässt sich demnach experimentell nur schwer erfassen. Mit Hilfe des SDS-Konversionssystems kann die Wahrscheinlichkeit der Konversion jedoch deutlich erhöht werden. Durch die Annahme, dass die Verdünnung der SDS-Konzentration die Dissoziation von CHO-PrP^C von der Membran *in vitro* simuliert, können die Experimente der SDS-Verdünnung als künstliche Verschiebung des

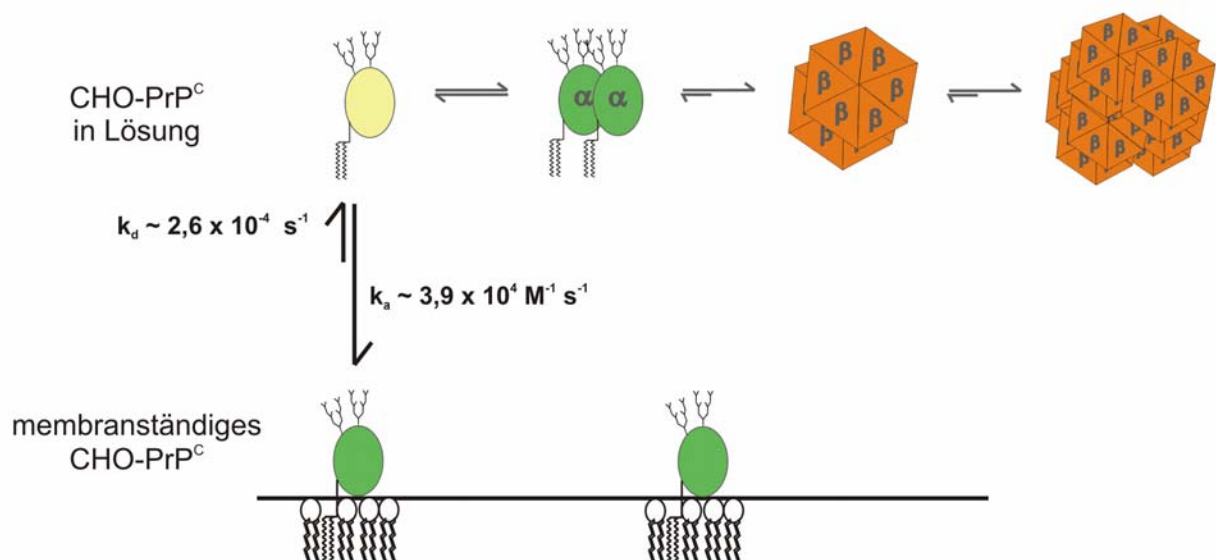


Abb. 4.4: Zwei-Phasen-Modell der CHO-PrP^C-Konversion. In diesem Modell sind die Ergebnisse der SDS-induzierten Konversion von CHO-PrP^C und der kinetischen Analyse der CHO-PrP^C-Membran-Wechselwirkung zusammengefasst.

Gleichgewichtes der CHO-PrP^C-Membran-Bindung angesehen werden. Diese Experimente erlauben somit Rückschlüsse auf die Konversion von CHO-PrP^C nach dem Übergang von CHO-PrP^C in die wässrige Lösung. Da die Verdünnung der SDS-Konzentration zu einer strukturellen Konversion von CHO-PrP^C unter Ausbildung β -Faltblatt-reicher Aggregate führt, kann somit angenommen werden, dass der Übergang von PrP^C aus der Membran in den Extrazellulärraum tatsächlich zu der Konversion von PrP^C führen kann, wie es im Zwei-Phasen-Modell postuliert wurde.

4.6 Ausblick

Erweiterung der strukturellen Umwandlung von CHO-PrP^C:

Wie in Kapitel 4.3.2 bereits näher erläutert, müssen verschiedene Eigenschaften von PrP gegeben sein, um die *in vitro*-Generierung von Infektiosität, vergleichbar zu der Infektiosität von natürlichem PrP^{Sc}, zu ermöglichen. Neben der Zunahme der β -Faltblatt Struktur und der Aggregation von vollständig modifiziertem PrP, was zu der Ausbildung der partiellen PK-Resistenz führt, zählt hierzu ebenso die Generierung von amyloiden Fibrillen. Da in dieser Arbeit die Reinigung von vollständig modifiziertem CHO-PrP^C optimiert werden konnte, eröffnet sich die Möglichkeit, die Bildung amyloider Fibrillen, bestehend aus CHO-PrP^C, und eventuell dadurch generierte Infektiosität zu untersuchen. Dadurch ließen sich weitere Einblicke in den Einfluss der posttranslationalen Modifikationen auf die Spezifität der Konversion erlangen.

***In vitro*-Untersuchungen der keiminduzierten Konversion:**

Das Zwei-Phasen-Modell der Prion-Replikation (Vgl. Kap. 1.4 und Kap. 4.5) postuliert, dass die spontane Konversion von PrP^C einen sehr seltenen Prozess darstellt, wodurch sie sich experimentell nur schwer erfassen lässt. Somit ist es notwendig, die Konversion zu induzieren, um sie mechanistisch untersuchen zu können. In dieser Arbeit erfolgte die Induktion der Konversion von CHO-PrP^C mit Hilfe des Detergenz SDS. *In vivo* hingegen wird die Konversion von PrP^C durch eine Infektion mit Prionen induziert. Das Zwei-Phasen-Modell postuliert, dass ein Prion Partikel die sehr schnelle Anlagerung und Konversion eines intermediären Zustandes von PrP^C im Extrazellulärraum induziert. Dies führt dazu, dass freies PrP^C, welches sich in wässriger Lösung befindet, dem Gleichgewicht der PrP^C-Membran-Wechselwirkung entzogen wird. Dadurch verschiebt sich die Reaktion und es kommt zu einer beschleunigten Neubildung infektiöser Partikel.

In dieser Arbeit konnte ein System etabliert werden, welches die Rekonstitution von CHO-PrP^C in Modellmembranen erlaubt. Somit besteht nun die Möglichkeit, den Mechanismus der Infektion, wie er im Zwei-Phasen-Modell postuliert ist, experimentell zu untersuchen. Diese Untersuchung ließe sich durch Zugabe von spezifischen Keimen, in Form von gereinigtem PrP^{Sc} oder PrP 27-30, zu membranständigem CHO-PrP^C durchführen.

Entwicklung von Therapeutika:

Für die Entwicklung von Therapeutika werden grundsätzlich zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Ein Ansatz hat die Entwicklung von so genannten *β-sheet-breakern* zum Ziel. Diese Substanzen werden dabei dahingehend optimiert, dass sie spezifisch an Prionen binden und im Folgenden eine Strukturumwandlung von PrP^{Sc} und somit die Auflösung der Partikel induzieren. Der zweite Ansatz verfolgt nicht das Ziel Prionen aufzulösen, sondern vielmehr, PrP^C in seiner natürlichen Konformation zu stabilisieren und somit die Konversion zu inhibieren. Hierbei werden die Substanzen dahingehend optimiert, eine möglichst hohe Affinität zu der natürlichen Konformation von PrP^C aufzuweisen. Es ist anzunehmen, dass die spezifische Verankerung von PrP^C über den GPI-Anker in die Plasmamembran einen Einfluss auf die Struktur von PrP^C hat. Des Weiteren bewirkt die Bindung von PrP^C an die Plasmamembran eine Orientierung von PrP^C, wodurch die Zugänglichkeit verschiedener Bereiche von PrP^C beeinflusst wird. Die Möglichkeit gereinigtes CHO-PrP^C in Modellmembranen zu verankern, erlaubt es also Therapeutika hinsichtlich ihrer Affinität zu membranständigem PrP^C zu optimieren.

5 Zusammenfassung

Prion-Krankheiten sind benannt nach dem außergewöhnlichen Erregertyp, der sie hervorruft, den Prionen. Prionen unterscheiden sich von anderen Erregertypen dadurch, dass sie zum größten Teil aus Protein, dem so genannten Prion Protein (PrP) bestehen und keine codierende Nukleinsäure besitzen. Bei dem Prion Protein handelt es sich um ein wirtseigenes Protein, dass in zwei verschiedenen Isoformen auftritt, der zellulären Form, PrP^C, und der krankheitsassoziierten Form, PrP^{Sc}, welche in infektiösen Prion Partikeln akkumuliert ist. Beide Isoformen besitzen identische Primärsequenzen und tragen die identischen posttranslationalen Modifikationen. Bei diesen Modifikationen handelt es sich um einen C-terminal angehängten Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) und um zwei N-verknüpfte Glykosylierungen. Eine deutliche Unterscheidung von PrP^C und PrP^{Sc} ist allerdings hinsichtlich einiger physikalisch-chemischer Eigenschaften möglich. So weist PrP^C eine überwiegend α -helikale Sekundärstruktur auf, ist in milden Detergentien löslich und sensitiv gegenüber proteolytischer Verdauung mittels Proteinase K (PK). PrP^{Sc} hingegen weist einen deutlich erhöhten Anteil an β -Struktur auf, bildet unlösliche, hochmolekulare Aggregate und besitzt eine partielle Resistenz gegen PK-Verdauung. Es wird angenommen, dass die Ausbildung von Prion-Krankheiten durch die Konversion von PrP^C zu der infektiösen Isoform PrP^{Sc} hervorgerufen wird. Die Konversion entspricht dabei einer Konformationsänderung des Prion Proteins, wobei es zu keinerlei kovalenten Modifikationen kommt. Prionkrankheiten können sowohl spontan auftreten, als auch genetisch bedingt sein oder durch eine Infektion induziert werden.

Bei den meisten *in vitro* durchgeführten Konversionsanalysen wird rekombinant hergestelltes Prion Protein (rekPrP), exprimiert in *E. coli*, verwendet. Als prokaryotisches Expressionssystem ist *E. coli* jedoch nicht in der Lage, rekPrP posttranslational durch Verknüpfung der beiden N-Glykosylierungen und des GPI-Ankers zu modifizieren. Derartige Untersuchungen können demnach nicht den Einfluss der Modifikationen auf die Konversion von PrP erfassen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zunächst die Reinigung von PrP^C, welches in einer eukaryotischen Zellkultur exprimiert wurde (CHO-PrP^C), optimiert. CHO-PrP^C trägt sowohl die beiden N-Glykosylierungen, als auch den GPI-Anker, wodurch es ermöglicht wird, den Einfluss der Modifikationen auf die Konversion zu erfassen. Hierzu wurden zunächst die Eigenschaften von CHO-PrP^C in Lösung untersucht. Dabei konnte die Konversion von CHO-PrP^C zu einer Isoform mit einem deutlich erhöhten β -Faltblatt-Anteil *in vitro* induziert werden. Diese Konversion geht mit der

Ausbildung von hochmolekularen Aggregaten einher, welche die identische partielle Resistenz gegen proteolytische Verdauung mit PK aufweisen, wie sie für PrP^{Sc} beschrieben ist. Somit konnten drei der PrP^{Sc}-charakteristischen Eigenschaften, die mit der Infektiösität korrelieren, erfolgreich kombiniert werden.

Diese Konversionsanalysen fanden in Lösung statt. PrP^C ist allerdings *in vivo* über den GPI-Anker in der Plasmamembran in bestimmten Mikrodomänen, den so genannten rafts, verankert. Da in dieser Arbeit erstmals gereinigtes PrP^C, welches den GPI-Anker trägt, zur Verfügung stand, wurde des Weiteren der Mechanismus der Einlagerung von CHO-PrP^C in raft-ähnliche Modellmembranen untersucht. Es wurde ein System etabliert, welches die Rekonstitution von CHO-PrP^C in raft-ähnliche Modellmembranen über spezifische Wechselwirkungen des GPI-Ankers mit der Membran erlaubt.

6 Literaturverzeichnis

- Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A., Clarke, M. C. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*; **1967**. 214: 764-766
- Baskakov, I. V. Autokatalytic conversion of recombinant prion proteins displays a species barrier. *J. Biol. Chem.*; **2004**. 279(9): 7671-7677
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*; **1986**. 46: 417-428
- Bendheim, P. E., Potempska, A., Kascsak, R. J., Bolton, D. C. Purification and partial characterization of the normal cellular homologue of the scrapie agent protein. *J. Infect. Dis.*; **1988**. 158: 1198-1208
- Benes, M., Billy, D., Benda, A., Speijer, H., Hof, M., Hermens, W. T. Surface-dependent transitions during self-assembly of phospholipid membranes on mica, silica and glass. *Langmuir*; **2004**. 20: 10129-10137
- Blochberger, T. C., Cooper, C., Peretz, D., Tatzelt, J., Griffith, O. H., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B. Prion protein expression in Chinese hamster ovary cells using a glutamine synthetase selection and amplification system. *Prot. Eng.*; **1997**. 10(12): 1465-1473
- Bocharova, O. V., Breydo, L., Parfenov, A. S., Salnikov, V. V., Baskakov, I. V. *In vitro* conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP^{Sc}. *J. Mol. Biol.*; **2005**. 346: 645-659
- Bolton, D. C., McKinley, M. P., Prusiner, S. B. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*; **1982**. 218: 1309-1311
- Brahms, S., Brahms, J. Determination of protein secondary structure in solution by vacuum ultraviolet circular dichroism. *J Mol Biol.*; **1980**. 138(2):149-178
- Brown, D. A., London, E. Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes? *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; **1997**. 240, 1-7.
- Brown, D. R., Schulz-Schäfer, W. J., Schmidt, B., Kretzschmar, H. A. Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to reduced SOD-1 activity. *Exp. Neurol.*; **1997**. 146: 104-112
- Brown, D. R., Besinger, A. Prion protein expression and superoxide dismutase activity. *Biochem. J.*; **1998**. 334: 423-29

- Brown, D. R., Hafiz, F., Glasssmith, L. L., Wong, B., Jones, I. M., Clive, C., Haswell, S. J. Consequences of manganese replacement of copper for prion protein function and proteinase resistance. *EMBO J.*; **2000**. 19(6): 1180-1186
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W. Transmission to mice indicates that "new variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature*; **1997**. 389: 498-501
- Bruce, M. E., McConnell, I., Fraser, H., Dickinson, A. G. The disease characteristics of different strains of scrapie in sinc congenic mouse lines: implications for the nature of the agent and host control of pathogenesis. *J. Gen. Virol.*; **1991**. 72: 595-603
- Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M., Weisman, C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*; **1992**. 356: 577-582
- Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., Weissmann, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*; **1993**. 73: 1339-1347
- Buschmann, A., Kuczius, T., Bodemer, W., Groschup, M. H. Cellular prion proteins of mammalian species display an intrinsic partial proteinase K resistance. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*; **1998**. 253: 693-702
- Cassirer, R. Über die Traberkrankheit der Schafe: pathologisch-anatomische und bakterielle Untersuchung. *Pathol. Anat. Physiol.*; **1898**. 153: 89-110
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., Soto, C. *In vitro* generation of infectious scrapie prions. *Cell*; **2005**. 121(22): 195-206
- Chandler, R. L. Encephalopathy in mice produced by oculation with scrapie brain material. *Lancet*; **1961**. 1: 1378-1379
- Chesebro B., Race R., Wehrly K., Nishio J., Bloom M., Lechner D., Bergstrom S., Robbins K., Mayer L., Keith J. M., Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*; **1985**. 315(6017): 331-333
- Cohen, F. E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R. J., Prusiner, S. B. Structural clues to prion replication. *Science*; **1994**. 264: 530-531
- Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., Hill, A. F. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*; **1996**. 383(6602): 685-690
- Come, J. H., Fraser, P. E., Lansbury, P. T. A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding. *PNAS USA*; **1993**. 90(13): 5959-5963.

- Cuille, J., Chelle, P. L. La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? C. R. Acad. Sci. Paris; **1936**. 203: 1552-1554
- Dickinson, A. G., Meikle, V. M. H. Host-genotyp and agent effects in scrapie incubation: change in allelic interaction with different strains of agent. Molec. Gen. Genet.; **1971**. 112: 73-79
- Dietrich, C., Bagatolli, L. A., Volovyk, Z. N., Thompson, N. L., Levi, M., Jacobson, K., Gratton, E. Lipid rafts reconstituted in model membranes. Biophys J.; **2001**. 80(3): 1417-1428
- Donne, G. H., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E., Dyson, H. J. Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N-terminus is highly flexible. PNAS. USA; **1997**. 94(25): 13452-13457
- Eigen, M. Prionics or the kinetic basis of prion diseases. Biophys. Chem.; **1996**. 63: A1-A18
- Elfrink, K. Aufreinigung und Charakterisierung von Prion Protein aus Zellkultur und Gewebe tierischen Ursprungs. Diplomarbeit. **2001**
- Elfrink, K., Riesner, D. Purification of PrP^C. Methods and tools in Biosciences and Medicine: Techniques in Prion Research.; **2004**. ed. by S. Lehmann and J. Grassi (Birkhäuser Verlag Basel) 4-15
- Fraser, H., Dickinson, A. G. The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. J Comp Pathol.; **1968**. 78(3): 301-311
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B., Cohen, F. E. Evidence for assembly of prions with left-handed β -helices into trimers. PNAS; **2004**. 101(22): 8342-8347
- Hay, B., Barry, R. A., Lieberburg, I., Prusiner, S. B., Lingappa, V. R. Biogenesis and transmembrane orientation of the cellular isoform of the scrapie prion protein. Mol-Cell-Biol.; **1987**. 7(2): 914-920
- Heukeshoven, J., Dernick, R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamid gels and the mechanism of silver staining. Electrophor.; **1986**. 6:103-112
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S. The same prion strain causes vCJD and BSE. Nature; **1997**. 398: 448-450
- Hjelmeland, L. M., Chrambach, A. Solubilization of functional membrane proteins. Meth. Enzym.; **1984**. 104: 305-318
- Hornemann, S., Schorn, C., Wüthrich, K. NMR structure of the bovine prion protein isolated from healthy calf brains. EMBO rep.; **2004**. 5: 1159-1164

- Hundt, C., Peyrin, J-M., Haik, S. Identification of interaction domains of the prion protein with its 37-kDa/67-kDa laminin receptor. *EMBO J.*; **2001**. 20: 5876-5886
- Jackson, G. S., Murray, I., Hosszu, L. L. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *PNAS*; **2001**. 98: 8531-8535
- Jansen, K., Schafer O., Birkmann E., Post K., Serban H., Prusiner S. B., Riesner D. Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form. *Biol Chem.*; **2001**. 382(4): 683-691
- Jansen, K., Dimere und Oligomere des Prion Proteins als Modell für den Umwandlungsmechanismus von der zellulären Isoform des Prion Proteins in die pathogene Form. Dissertation; Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf; **2002**
- Jarret, J. T., Lansbury, P. T. Seeding "one-dimensional crystallisation" of amyloid: A pathogenic mechanism in alzheimer's disease and scrapie? *Cell*; **1993**. 73: 1055-1058
- Jeffrey, M., Goodsir, C. M., Bruce, M. E., McBride, P. A., Fraser, J. R. In vivo toxicity of prion protein in murine scrapie: ultrastructural and immunogold studies. *Neuropathol-Appl-Neurobiol.*; **1997**. 23(2): 93-101
- Kascsak, R. J., Rubenstein, R., Merz, P. A., Carp, R. I., Robakis, N. K., Wisniewski, H. M., Diringer, H. Immunological comparison of scrapie-associated fibrils isolated from animals infected with four different scrapie strains. *J Virol.*; **1986**. 59(3): 676-683
- Kellings, K., Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S. B., Riesner, D. Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocussing gel electrophoresis (RGGE). *J. Gen. Virol.*; **1992**. 73: 1025-1029
- Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. H., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T., Caughey, B. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*; **1994**. 370(6489): 471-474
- Kretschmann, E. & Raether, H. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light. *Z. für Naturforsch.*; **1968**. 23: 2135-2136
- Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E., DeArmond, S. J. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am. J. Path.*; **1986**. 122: 1-5
- Lasmezas, C. I., Desley, J. P., Demaimay, R. BSE transmission to macaques. *Nature*; **1996**. 381: 743-744
- Leffers, K. W., Schell, J., Jansen, K., Lucassen, R., Kaimann, T., Nagel-Steger, L., Tatzelt, J., Riesner, D. The structural transition of the Prion Protein into its pathogenic conformation is induced by unmasking hydrophobic sites. *JMB*; **2004**. 344: 839-853

- Leffers, K. W., Wille, H., Stöhr, J., Junger, E., Prusiner, S. B., Riesner D. Assembly of natural and recombinant prion protein into fibrils. *Biol. Chem.*; **2005.**; (in press.)
- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H-O. B., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B. Synthetic wild-type mammalian prions. *Science*; **2004.** 30; 305(5684): 673-676
- Liu, H., Farr-Jones, S., Ulyanov, N. B., Llinas, M., Marqusee, S., Groth, D., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., & James, T. L. Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90-231). *Biochem.*; **1999.** 38: 5362-5377
- Lucassen, R., Nishina K, Supattapone S. In vitro amplification of protease-resistant prion protein requires free sulfhydryl groups. *Biochem.*; **2003.** 42(14): 4127-4135
- Marsh, R. F., Kimberlin, R. H. Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology and pathogenesis. *J. Inf. Dis.*; **1975.** 131: 104-110
- Masters, C. L., Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. Jr. 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.*; **1981.** 104(3): 559-588
- Mehlhorn, I., Groth, D., Stockel, J., Moffat, B., Reilly, D., Yansura, D., Willet, W. S., Baldwin, M., Fletterick, R., Cohen, F. E., Vandlen, R., Henner, D., Prusiner, S. B. High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochem.*; **1996.** 35: 5528-5537
- Meyer, N., Rosenbaum, V., Schmidt, B., Gilles, K., Mirenda, C., Groth, D., Prusiner, S. B., Riesner, D. Search for a putative scrapie genome in purified prion fractions reveals a paucity of nucleic acids. *J. Gen. Virol.*; **1991.** 72: 37-49
- Narwa, R., Harris, D. A. Prion protein carrying pathogenic mutations are resistant to phospholipase cleavage of their glycolipid anchor. *Biochem.*; **1999.** 38: 8770-8777
- Naslavsky, N., Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A. Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J. Biol. Chem.*; **1997.** 272, 6324-6331
- Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*; **1985.** 40: 735-746
- Otto, A. A new method for exciting non-radioactive surface plasma oscillations. *Phys.Stat.Sol.*; **1968.** 26: 99-101
- Pan, K. M., Stahl, N., Prusiner, S. B. Purification and properties of the cellular prion protein from Syrian hamster brain. *Prot. Science*; **1992.** 1: 1343-1352

- Pauly, P. C., Harris, D. A. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J. Biol. Chem.*; **1998**. 273: 33107-33110
- Pergami, P., Jaffe, H., Safar, J. Semipreparative chromatographic method to purify the normal cellular isoform of the prion protein in nondenatured form. *Anal. Biochem.*; **1996**. 236: 63-73
- Post, K., Pitschke, M., Schaefer, O., Wille, H., Appel, T. R., Kirsch, D., Mehlhorn, I., Serban, H., Prusiner, S. B., Riesner, D. Rapid acquisition of beta-sheet structure in the prion protein prior to multimer formation. *Biol. Chem.*; **1998**. 379(11): 1307-1317
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., McKinley, M. P. Thiocyanate and hydroxyl ions inactivate the scrapie agent. *PNAS USA*; **1981**. 78: 4606-4610
- Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*; **1982**. 216: 136-144
- Prusiner, S. B., Bolton, D. C., Groth, D. F. Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochem.*; **1982a**. 21: 6942-6950
- Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F., Glenner, G. G. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*; **1983**. 35(1): 349-358
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Bolton, D. C., Kent, S. B., Hood, L. E. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell*; **1984**. 38(1): 127-134
- Prusiner, S. B., Scott, M., Foster, D. Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication. *Cell*; **1990**. 63: 673-686
- Prusiner, S. B. Molecular biology of prion diseases. *Science*; **1991**. 252: 1515-1522
- Prusiner, S. B. Prion Diseases and the BSE crisis. *Science*; **1997**. 278: 245-251
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., Wüthrich, K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*; **1996**. 382: 180-182
- Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, H., Groth, D., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B. Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *J. Virol.*; **1996**. 70(3): 1714-1722
- Roos, R., Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J. Jr. The clinical characteristics of transmissible Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*; **1973**. 96: 1-20

- Rudd, P. M., Wormald, M. R., Wing, D. R., Prusiner, S. B., Dwek, R. A. Prion glycoprotein: Structure, dynamics and roles for the sugars. *Biochem.*; **2001**. 40: 3759-3766
- Saborio, G. P., Permanne, B., Soto, C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*; **2001**. 411(14): 810-813
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med.*; **1998**. 4(10): 1157-1165
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*; **1989**. Band second edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
- Sanders, P. G., Wilson, R. H. Amplification and cloning of the Chinese hamster glutamine synthetase gene. *EMBO*; **1984**. 3(1): 65-71
- Saslowsky, D. E., Lawrence, J., Ren, X., Brown, D. A., Henderson, R. M., Edwardson, J. M. (2002). Placental alkaline phosphatase is efficiently targeted to rafts in supported lipid bilayers. *J Biol Chem.*; **2002**. 277(30): 26966-26970
- Schroeder, R., London, E., Brown, D. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behaviour. *PNAS*; **1994**. 91, 12130-12134
- Somerville, R. A., Chong, A., Mulqueen, O. U., Birkett, C. R., Wood, S. C., Hope, J. Biochemical typing of scrapie strains. *Nature*; **1997**. 386(6625): 564
- Tobler, I., Gaus, S. E., Deboer, T. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*; **1996**. 380: 639-642
- Turk, E., Teplow, D. B., Hood, L. E., Prusiner, S. B. Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins. *Eur. J. Biochem.*; **1988**. 176: 21-30
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *PNAS USA*; **1996**. 93: 14945-14949
- Waggoner, D. J., Drisaldi, B., Bartnikas, T. B. Brain copper content and cuproenzyme activity do not vary with prion protein expression level. *J. Biol. Chem.*; **2000**. 275: 7455-7458
- Wang, T. Y., Leventis, R., Silvius, J. R. Fluorescence-based evaluation of the partitioning of lipids and lipidated peptides into liquid-ordered lipid microdomains: A model for molecular partitioning into lipid rafts. *Biophys. J.*; **2000**. 79, 919-933

- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., Smith, P. G. A new variant Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*; **1996**. 347: 921-925
- Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A., Prusiner, S. B. Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *PNAS USA*; **2002**. 99(6): 3563-3568
- Xiong, L. W., Raymond, L. D., Hayes, S. F., Raymond, G. J., Caughey, B. Conformational change, aggregation and fibril formation induced by detergent treatments of cellular prion protein. *J. Neurochem.*; **2001**. 19: 669-678