Massenspektrometrische Strukturuntersuchungen an Monomeren und Dimeren des Prion-Proteins

Inaugural-Dissertation

zur

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

vorgelegt von

Tina Katharina Kaimann

aus Essen

November 2006

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

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

Referent:Prof. Dr. D. RiesnerKoreferent:Prof. Dr. H.-D. Höltje

Tag der mündlichen Prüfung: 17.November 2006

Inhaltsverzeichnis

1		EIN	ILEITUNG	1
	1.1	Gru	Indprinzip der Proteinfaltung	1
	1.2	Pro	tein-Fehlfaltungskrankheiten	3
	1.3	Tra	nsmissible Spongiforme Enzephalopathien	5
	1.3	.1	Scrapie	7
	1.3	.2	Bovine Spongiforme Enzephalopathie	7
	1.3	.3	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	8
	1.4	Eig	enschaften des Erregers	9
	1.5	Das	s Prion-Protein	10
	1.5	.1	Molekulare Struktur von PrP ^C und PrP ^{Sc}	10
	1.5	.2	Prozessierung von PrP ^C	11
	1.5	.3	3D-Struktur von PrP ^C und PrP ^{Sc}	12
	1.5	.4	Funktion von PrP ^C	14
	1.6	Mo	delle zur Prion-Replikation	14
	1.7	In v	<i>itro</i> Konversion	16
	1.8	Dim	nere des Prion-Proteins	19
	1.9	Fra	gestellung	19
2		MA	TERIAL UND METHODEN	21
	2.1	Che	emikalien	21
	2.2	Puf	fer und Lösungen	21
	2.3	Reł	combinantes Prion-Protein	22
	2.4	Pro	teinkonzentrationsbestimmung	22
	2.4	.1	Absorptionsmessung	22
	2.4	.2	Micro BCA-Test	22
	2.5	Der	naturiende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-	
		PA	GE)	23

	2.5.	1 Verwendete Lösungen für die SDS-PAGE	24
	2.5.	2 Proteinstandard	25
	2.6	Silberfärbung von Proteingelen	25
	2.7	Coomassie-Färbung von Proteingelen	26
	2.8	Semi-Dry-Western-Blot	26
	2.9	Dot-Blot	27
	2.10	Immunologischer Proteinnachweis	27
	2.11	Löslichkeitsbestimmung durch differentielle	
		Ultrazentrifugation	28
	2.12	Circulardichroismus- (CD-) Spektroskopie	28
	2.13	Chemischer Crosslink von Proteinen	30
	2.14	Tryptische In-Gel-Verdauung	31
	2.15	Reversed-phase-Chromatographie für die LC-MS-Kopplun	g.
			32
	2.16	Massenspektrometrische Analyse von Proteinen und	
		Peptiden	33
	2.16	6.1 Grundprinzip massenspektrometrischer Messungen	33
	2.16	6.2 Aufbau eines Massenspektrometers	33
	2.16	6.3 Ionisierungsprinzip der Elektrospray-Ionisation	35
	2.16	6.4 Bestimmung der Primärstruktur von Peptiden mittels Tandem-	
		Massenspektrometrie	37
	2.17	Selektive Acetylierung N-terminaler Aminogruppen durch	
		Jodessigsäureanhydrid	40
	2.18	Modell-Erstellung des PrP-Dimers	41
3		ERGEBNISSE	43
	3.1	In vitro Konversion von rek PrP(90-231) in Anwesenheit vo	n
		SDS als experimentelle Grundlage für Crosslink-Studien	43
	3.2	Strukturanalyse durch chemisches Crosslinking mit EDC	46

	3.3	Er	mittlung der Crosslink-Positionen in PrP-Dimeren und	_
		M	onomeren	48
	3.3	.1	Direkte (statische) massenspektrometrische Analyse tryptisch	her
			Peptide von rek PrP nach In-Gel-Verdauung	49
	3.3	.2	Direkte (statische) massenspektrometrische Analyse tryptisch	her
			Peptide von quervernetzten PrP-Mono- und –Dimeren	55
	3.3	.3	Nachweis von Crosslink-Peptiden in PrP-Di- und -Monomere	n
			mittels ESI-LC-MS-Kopplung	59
	3.3	.4	N-terminale Acetylierung von PrP: Intra- versus intermolekul	are
			Quervernetzung	67
	3.4	Di	mere als Vorstufe zur amyloiden Fibrille	71
	3.5	Mo	odell für ein PrP-Dimer	75
				70
4		וט	SKUSSION	76
	4.1	Ch	emisches Crosslinking zur Analyse von Protein-Prote	ein-
		W	echselwirkungen	76
	4.2	We	echselwirkungsstellen in PrP-Di- und –Monomeren	78
	4.2	.1	Zur Struktur des PrP-Monomers	80
	4.2	.2	Zur Struktur des PrP-Dimers	82
	4.2	.3	Inter- oder intramolekulare Interaktion?	83
	4.2	.4	Modell für ein PrP-Dimer	83
	4.2	.5	Dimere als Aggregationsintermediate	85
	4.3	Be	deutung der Dimere	88
	4.4	Au	sblick	89
5		Ζl	JSAMMENFASSUNG	90
_		.		• -
6		L		92

Abkürzungsverzeichnis

heta	Elliptizität
Abb.	Abbildung
Ambic	Ammoniumbicarbonat-Puffer
amu	Atomare Masseneinheit (engl.: atomic mass unit)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Rinderserumalbumin
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
C	Celsius
CD	Circulardichroismus
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CL	Crosslink
CWD	Chronisch-zehrende Krankheit
C_{lpha}	α-Kohlenstoffatom
Da	Dalton
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimid Hydrochlorid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde
Kap.	Kapitel
LC	Flüssigkeitschromatographie
Μ	Molar
m/z	Masse-Ladungs-Verhältnis
MALDI	Matrix-unterstützte-Laserdesorptions-Ionisation
min	Minute

MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
NaPi	Natriumphosphat-Puffer
NMR	Kernmagnetische Resonanz
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PK	Proteinase K
PMCA	Protein misfolding cyclic amplification
PrP	Prion-Protein
PrP*	Übergangszustand des Prion-Proteins
PrP ^C	zelluläres Prion-Protein
PrP ^{Sc}	pathologische Scrapie-Isoform des Prion-Proteins
Q-TOF	Quadrupol-Time-of-Flight
rek	rekombinant
S.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHa	Syrischer Goldhamster
Tab.	Tabelle
TBST	Tris Buffer Sodium Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	Flugzeit (engl.: time of flight)
Tris	Tris-methylaminomethan
TSE	Transmissible Spongiforme Enzephalopathie
UV	Ultraviolet
vCJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
vgl.	vergleiche
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
3	Extinktionskoeffizient

1 Einleitung

1.1 Grundprinzip der Proteinfaltung

Die dreidimensionale Struktur von Proteinen und damit der Prozess der Proteinfaltung haben eine fundamentale Bedeutung für biologische Systeme. Sehr viele Prozesse innerhalb von Zellen benötigen die Hilfe von Proteinen und nur richtig gefaltete Proteine können ihre Funktion exakt erfüllen.

Ein früher Prozess in der Proteinfaltung ist die Ausbildung von Sekundärstrukturelementen, wie z.B. α -Helix und β -Faltblatt, deren genaue Struktur über die Konformation des Peptidrückgrads definiert ist. Die verschiedenen Konformationen resultieren aus der eingeschränkten Rotationsfreiheit der Bindungen auf beiden Seiten des α -Kohlenstoffatoms (C_{α}). Die gesamte Information für die native dreidimensionale Struktur eines Proteins ist allein durch die intrinsischen Eigenschaften der Aminosäuresequenz festgelegt (Anfinsen, 1973). Native Strukturen sind demnach unter physiologischen Bedingungen die thermodynamisch stabilsten Konformationen und weisen ein Minimum an freier Energie auf. Dies ist zumindest für den überwiegenden Teil der nativen Strukturen zutreffend (Dobson, 1998). Um dieses Energieminimum zu finden, müssten alle möglichen Konformationen eines Proteins "ausprobiert", d.h. durchlaufen werden, was eine nahezu astronomische Zeitspanne benötigen würde. Tatsächlich verläuft die Faltung der meisten Proteine in vitro und in vivo jedoch innerhalb von Sekunden oder Minuten, z.T. sogar schneller. Diese Unstimmigkeit in der berechneten und tatsächlich notwendigen Zeit für die korrekte Proteinfaltung wurde als Levinthalsches Paradoxon bekannt (Levinthal, 1968). Um diesen Widerspruch aufzuklären, wurden seitdem anhand theoretischer Überlegungen und experimenteller Beobachtungen verschiedene Mechanismen der Proteinfaltung postuliert (zur Übersicht s. Yon, 2002).

Mittlerweile ist klar, dass die Faltung eher ein progressiver bzw. sequentieller Prozess der Bildung von unterschiedlichen, teilweise gefalteten Strukturen ist, die auf verschiedenen Wegen gebildet werden können. Nicht-native Wechselwirkungen sind im Mittel instabiler als korrekte native, was bedeutet, dass letztere länger existieren können. So werden die teilweise korrekten Zwischenzustände gewissermaßen bewahrt, bis schließlich die energieminimierteste Struktur erreicht ist (zur Übersicht s. Dobson, 2003; Dobson, 2004). Dem Modell nach verläuft die Proteinfaltung entlang eines sogenannten Faltungstrichters, der die Energielandschaft und damit die freie Energie des konkreten Proteins widerspiegelt (s. Abb. 1.1).



 Abb. 1.1 Beispiele für Faltungstrichter. Links: Für ein sich schnell faltendes Protein N: Native Struktur. Rechts: Für ein Protein, das in einem lokalen Minimum (A) "gefangen" werden kann und das globale Minimum (B) nur sehr langsam erreicht (Chan & Dill, 1998).

Die Breite des Trichters stellt die Entropie und die Höhe die freie Energie des Systems dar. Eine sich faltende Peptidkette kann auf vielen verschiedenen Wegen unter Ausbildung diverser Intermediate den nativen Zustand erreichen. Dabei können sich Strukturen bilden, die kinetisch stabil sind und in lokalen Energieminima "gefangen" sind, ohne das globale Minimum zu erreichen. Bei entsprechenden Veränderungen der Umgebungsbedingungen oder bei Aggregation können nicht-native Konformationen auch thermodynamisch stabiler sein. Die meisten Proteine durchlaufen in ihrem Faltungsprozess einen Zustand, den man als "molten globule" bezeichnet (Ptitsyn *et al.*, 1990). Dabei handelt es sich um eine kondensierte Form, die schon Sekundärstrukturelemente der nativen Struktur enthält, jedoch noch eine instabile, fluktuierende Tertiärstruktur aufweist. Erst nach Erreichen dieses Zustandes werden die Sekundärstrukturelemente exakt angeordnet, der hydrophobe Kern korrekt gepackt, die Disulfidbrücken aus- oder umgebildet und in oligomeren Proteinen die Untereinheiten assembliert (Yon, 2002).

Innerhalb der Zelle spielen Chaperone als Faltungshilfen eine große Rolle. Chaperone interagieren mit den ungefalteten bzw. nur teilweise strukturierten Proteinen durch hydrophobe Wechselwirkungen. Molekulare Chaperone erhöhen nicht die Bildungsrate einzelner Konformationen, sie erhöhen jedoch die Effizienz mit der die native Konformation gebildet wird, indem konkurrierende Prozesse, wie z.B. die Aggregation, reduziert werden (Yon, 2002). Die korrekte Faltung von Proteinen ist von entscheidender Bedeutung für den Organismus. Bei Fehlfaltungen verlieren Proteine oftmals ihre biologische Aktivität, aggregieren oder entwickeln sogar pathogene Funktionen. In den Zellen sorgt normalerweise die Kontrollmaschinerie dafür, dass die Proteine entweder ihre richtige Faltung einnehmen, z.B. durch die Hilfe der Chaperone, oder selektiert und im Proteasom degradiert werden. Funktioniert dieses System nicht korrekt, können falsch gefaltete Proteine in den Zellen nicht abgebaut werden und bilden vielfach unlösliche Ablagerungen, wie z.B. ungeordnete Aggregate oder amyloide Fibrillen (s. Abb. 1.2).



Abb. 1.2 Schematische Darstellung der verschiedenen Zustandsformen von Proteinen im Überblick (verändert nach Dobson, 2003). U: ungefaltetes Protein, I: Faltungsintermediat, N: nativer Zustand.

1.2 Protein-Fehlfaltungskrankheiten

Fehlgefaltete Proteine sind Ursache für eine Reihe von Krankheiten. Fehlfaltungen von Proteinen können zum einen darin resultieren, dass die Proteine nicht ihre eigentliche Lokalisation in der Zelle erreichen und damit nicht ihre zugedachten Funktionen ausüben können. Zum anderen können sich die fehlgefalteten Proteine intra- oder häufiger extrazellulär zu Aggregaten zusammenlagern. Tab. 1.1 gibt einen Überblick über einige Krankheiten, die durch fehlgefaltete Proteine verursacht werden (zum Überblick s. Thomas *et al.*, 1995; Dobson, 2004).

Krankheit	Protein	Betroffenes Organ	Molekulare Erscheinung
Zystische Fibrose	Cystic fibrosis trans- membrane regulator (CFTR)	Vorw. Lunge, Bauchspeicheldrüse, Dünndarm	Fehlfaltung
Phenylketonurie	Phenylalanin-Hydroxylase	systemisch	cytosolische Aggregation
Chorea Huntington	Huntingtin	Gehirn	Fehlfaltung/Aggregation
Sichelzellenanämie	Hämoglobin	Erythrozyten	Fehlfaltung/Aggregation
Alzheimersche Krankheit	Amyloid-beta-Peptid/Tau	Gehirn	Fehlfaltung/Aggregation
Parkinsonsche Krankheit	α -Synuclein	Gehirn	cytosolische Aggregation (Lewy bodies)
Transmissible Spongiforme Enzephalopathie	Prion-Protein	Gehim	Fehlfaltung/Aggregation
Amyotrophe Lateralsklerose	Superoxiddismutase	Nervensystem	Fehlfaltung/Aggregation
Grauer Star	Kristalline	Augenlinse	Fehlfaltung/Aggregation

Tab. 1.1	Zusammenfassung verschiedener Protein-Fehlfaltungskrankheiten
	(verändert nach Thomas <i>et al.</i> , 1995).

Der Begriff Amyloid wurde von Virchow 1854 geprägt; ursprünglich um Stärkeähnliches Material zu beschreiben, das aus humanem Hirngewebe isoliert worden war und sich, ebenso wie Stärke, durch Jod anfärben lies. Später wurde diese Substanz jedoch als Peptid identifiziert, welches heute als Amyloid-beta bekannt ist (Glenner & Wong, 1984). Der Begriff Amyloid bezeichnet inzwischen fibrilläre Proteinaggregate mit einigen spezifischen optischen Eigenschaften nach Bindung bestimmter Farbstoffe. Dazu gehören z.B. Thioflavin T und Kongorot. Die Bindung von Thioflavin T an amyloide Fibrillen führt zu einer Fluoreszenzerhöhung des Farbstoffs. Durch die Bindung von Kongorot verschiebt sich das Absorptionsspektrum des Farbstoffs zu längeren Wellenlängen (Bathochromie) und in polarisiertem Licht ist eine gold-grüne Doppelbrechung zu beobachten. Elektronenmikroskopisch erscheinen solche Proteinaggregate als langgestreckte unverzweigte Fasern. Durch Röntgenbeugungsanalysen konnte die Struktur als sogenannte "cross-beta"-Struktur identifiziert werden. Es handelt sich dabei um eine β -Faltblattstruktur, bei der die β -Stränge senkrecht zur Fibrillenachse angeordnet sind (Sunde & Blake, 1997). Die Fähigkeit amyloide Strukturen zu bilden ist nicht nur auf Proteine beschränkt, die mit bestimmten Krankheiten in Verbindung stehen, sondern scheint eher eine allgemeine Fähigkeit von Polypeptiden zu sein. Unter bestimmten Bedingungen lassen sich verschiedenste Proteine, wie z.B. die SH3-Domäne der PI3-Kinase (Guijarro *et al.*, 1998), eine Domäne des Fibronectins (Litvinovich *et al.*, 1998), Myoglobin (Fandrich *et al.*, 2001) und die Acyl-Phosphatase (Chiti *et al.*, 1999), zu amyloiden Fibrillen umlagern.

Viele Krankheiten, die durch Fehlfaltung von Proteinen entstehen, können mit solchen amyloiden Proteinablagerungen einhergehen. Die Akkumulation von amyloiden Ablagerungen ist eng mit Degenerationen und Läsionen des Gewebes verknüpft. Ob amyloide Ablagerungen jedoch tatsächlich die Ursache für die Degenerationen sind, ist noch nicht endgültig geklärt. Hier sollen im Besonderen die neurodegenerativen Krankheiten betrachtet werden (vgl. Tab. 1.1). Es gibt einerseits sowohl Hinweise dafür, dass amyloide Fibrillen der eigentliche Auslöser der Neurodegeneration sind, andererseits wurden auch experimentelle Hinweise dafür geliefert, die die oligomeren Vorstufen der Fibrillen als die eigentlich neurotoxischen Spezies identifizierten (zum Überblick s. Caughey & Lansbury, 2003; Soto, 2003; Meredith, 2005). Einige Experimente mit fibrillärem rekombinantem Prion-Protein an Zellkulturen zeigten, dass Fibrillen toxisch wirken können (Novitskaya et al., 2006). Die Kolokalisation von Neuronen-Untergang und amyloiden Ablagerungen, die vielfach beobachtet wird, sowie eine Reihe von Studien u.a. mit fibrillärem Aβ-Peptid in Zellkultursystemen (Lorenzo & Yankner, 1994; Forloni, 2000), sprechen ebenfalls für die Toxizität der amyloiden Fibrillen. Aus anderen Studien geht hervor, dass gerade präfibrilläre Spezies neurotoxische Eigenschaften haben. Dies wurde u.a. auch für das A β -Peptid und α -Synuclein sowie für zwei nicht krankheitsassoziierte Proteine gezeigt (Walsh, 2002; Conway, 2001; Bucciatini, 2002). Letztendlich bleibt die Kontroverse ungeklärt, obwohl mittlerweile eher nicht-fibrilläre Vorstufen als die entscheidenden Auslöser der Neurotoxizität angesehen werden. Da amyloide Fibrillen im Gleichgewicht mit ihren Vorstufen stehen, sind sie ebenfalls ein Teil der Pathogenese.

1.3 Transmissible Spongiforme Enzephalopathien

Zu den neurodegenerativen Krankheiten gehören u.a. auch die Transmissiblen Spongiformen Enzephalopathien (TSE). Die Bezeichnung leitet sich von den schwammartigen (spongiformen) Veränderungen im Gehirngewebe und der Übertragbarkeit (transmissibel) ab. Eine Besonderheit der TSE ist, dass sie nicht nur durch eine Infektion hervorgerufen werden können, sondern auch spontan oder genetisch bedingt auftreten. Die TSE zeichnen sich besonders durch ihre langen Inkubationszeiten aus, die im Bereich von Monaten bis hin zu Jahren liegen. Gefolgt werden diese von Symptomen wie Koordinations- und Bewegungsstörungen sowie Demenz, die durch die Zerstörung des Nervengewebes verursacht werden. Die prominenteste pathologische Veränderung ist die Vakuolisierung des Neuropils und der Verlust der Neuronen, welche zu den schwerwiegenden schwammartigen Degenerationen des Gehirns führen. Diese sind meist begleitet von der sogenannten Astrogliose, bei der es sich um eine abnormal starke Vermehrung von Astrozyten und Mikrogliazellen handelt (Rezaie & Lantos, 2001). Zudem treten extrazelluläre, vielfach fibrilläre, proteinöse Ablagerungen auf, die als amyloide Plaques bezeichnet werden (Merz *et al.*, 1981) und auf der molekularen Ebene aus dem wirtseigenen Prion-Protein bestehen (vgl. Kap. 1.4). Nach einer langen Inkubationszeit folgt ein schneller Krankheitsverlauf mit den oben beschriebenen Symptomen, der schließlich zum Tode führt (zum Überblick der TSE s. Belay, 1999; Chesebro, 2003).

Krankheit	Wirt	Ätiologie	Erstmals beschrieben
Scrapie	Schaf, Ziege	sporadisch, infektiös	1759, J. G. Leopold
Creutzfeldt-Jakob-Krankheit	Mensch	sporadisch, genetisch, infektiös	1920, H. G. Creutzfeldt 1921, A. Jakob
Gerstmann-Sträussler-Scheinker- Syndrom	Mensch	sporadisch, genetisch	1936, J. G. Gerstmann <i>et al.</i>
Kuru	Mensch	infektiös	1957, V. C. Gajdusek <i>et al.</i>
Chronisch-zehrende Krankheit	Hirsch	Infektiös	1980, E. S. Williams & S. Young
Fatale familiäre Insomnie	Mensch	genetisch	1986, E. Lugaresi <i>et al.</i>
Bovine Spongiforme Enzephalopathie	Rind	infektiös	1987, G. A. H. Wells <i>et al.</i>
Neue Variante der CJD	Mensch	infektiös	1996, R. G. Will <i>et al.</i>

Tab. 1.2	Zusammenfassung einiger	Transmissibler S	Spongiformer	Enzephalopathien.
----------	-------------------------	------------------	--------------	-------------------

Zu den TSE gehören u.a. Scrapie bei Schafen und Ziegen, die Bovine Spongiforme Enzephalopathie bei Rindern, die chronisch-zehrende Krankheit bei bestimmten nordamerikanischen Hirscharten, die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und Kuru bei Menschen. Tab. 1.2 gibt einen Überblick über einige TSE von Mensch und Tier.

1.3.1 Scrapie

Scrapie bei Schafen und Ziegen ist die am weitesten verbreitete und am längsten bekannteste TSE. Scrapie tritt in fast allen schafhaltenden Ländern auf. Es treten Symptome wie Zittern, Bewegungsstörungen und Juckreiz auf. Daher rührt auch der Name Scrapie (engl.: sich kratzen). 1936 konnte schließlich experimentell gezeigt werden, dass Scrapie eine übertragbare Krankheit ist (Cuillé & Chelle, 1936). Der Ausbruch der Scrapie ist zumeist bei Schafen im Alter von 2-5 Jahren zu beobachten, wobei angenommen wird, dass sich Schafe bereits bei der Geburt oder durch die Aufnahme von infiziertem Plazentamaterial mit Scrapie anstecken können (Pattison *et al.*, 1972; Pattison *et al.*, 1974). 1961 gelang Chandler die experimentelle Übertragung von Scrapie auf die Maus (Chandler, 1961). Später wurde sie ebenfalls auf den Syrischen Goldhamster übertragen (Marsh & Kimberlin, 1975). Erst dadurch stand durch die sehr viel kürzeren Inkubationszeiten von wenigen Monaten ein geeignetes Tiermodell für die weitere Erforschung zur Verfügung.

1.3.2 Bovine Spongiforme Enzephalopathie

Seit dem ersten Auftreten der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) Mitte der 80er Jahre hat die Krankheit durch die folgende Epidemie (s. Tab. 1.2) ein besonderes Interesse erfahren. Der Ursprung dieser Krankheit ist bislang nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass die Verfütterung von mit Scrapie-Material kontaminiertem Tiermehl die BSE hervorgerufen hat. Erst die Erniedrigung der Temperatur bei der Tiermehlherstellung und die damit einhergehende unzureichende Dekontaminierung des infektiösen sehr hitzeresistenten Erregers im Futtermittel, ermöglichte so die epidemische Ausbreitung der BSE (Wells et al., 1991). Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die BSE-Epidemie ursprünglich durch ein spontanes Auftreten in einzelnen Rindern initiiert wurde (Phillips et al., 2000) und so der Erreger in die Tiermehle gelangen konnte. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass die orale Aufnahme von einem Gramm Hirngewebe erkrankter Rinder ausreichend ist, um ein Tier zu infizieren (Anderson et al., 1996). Die BSE macht sich durch Symptome wie Übererregbarkeit, Nervosität, Überempfindlichkeit auf Geräusche sowie Bewegungsstörungen bemerkbar. Die Tiere erkrankten zum Großteil im Alter von ca. 5 Jahren, wobei das minimale Alter, das bisher erfasst wurde, 20 Monate betrug (Bradley & Wilesmith, 1993). Bislang sind über 184.000 Fälle¹ von BSE in mehr als 25 Ländern diagnostiziert worden. Die überwiegende Mehrheit der Fälle stammte aus Großbritannien.

¹ Die Daten wurden entnommen aus: World Organisation of Animal Health <u>http://www.oie.int./eng/info/en_esb.htm</u> (Stand: Juni 2006)

1.3.3 Creutzfeldt-Jakob-Krankheit

Die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) ist nach Creutzfeldt und Jakob benannt, die diese Krankheit 1920/1921 erstmals unabhängig voneinander beschrieben (s. Tab. 1.2). Die CJD stellt die häufigste menschliche TSE dar, mit einem Vorkommen von ca. einem Fall pro eine Million Einwohner pro Jahr. Ihre Ätiologie kann sporadischer, genetischer oder infektiöser Natur sein. Ca. 85% der CJD-Fälle sind auf die sporadische Form zurückzuführen (Belay, 1999). Das Durchschnittsalter bei Einsetzen der Krankheit beträgt etwa 60 Jahre mit einem Krankheitsverlauf von etwa 8 Monaten (Brown *et al.*, 1994). Die genetisch bedingte Form der CJD macht etwa 5-15% der Gesamtfallzahlen aus. Sie wird autosomal-dominant vererbt. Sehr selten sind auch iatrogene Fälle von CJD zu verzeichnen, die durch Transplantation von Augenhornhaut oder Hirnhaut erkrankter, aber nicht als solche erkannter, Patienten oder durch kontaminierte chirurgische Instrumente oder durch Verabreichung von Wachstumshormonen induziert wurden. Die CJD äußert sich durch eine progressive Demenz, Sehstörungen und eine Reihe verschiedener neurologischer Symptome.

Zwischen 1994 und 1996 wurden einige Fälle einer neuen Form der CJD (vCJD: variante CJD) in England beobachtet, die im Gegensatz zur sporadischen oder familiären CJD, eher jüngere Menschen im Alter von durchschnittlich 28 Jahren betraf (Will et al., 1996). Dieser Unterschied sowie eine unterschiedliche Pathologie, die sich unter anderem in einem verlängerten Krankheitsverlauf äußert, ließen den Schluss zu, dass es sich um eine komplett neue Form der CJD handeln muss. Das ursprünglich alleinige Auftreten der neuen Variante in Großbritannien führte schon früh zu der Vermutung, dass ein Zusammenhang mit BSE, die ebenfalls hauptsächlich in Großbritannien auftrat, besteht. Experimentell konnte eine Ähnlichkeit von BSE und vCJD basierend auf Läsionsmustern in Mäusehirnen und neuropathologischen Befunden nach Übertragung auf Makaken den Verdacht noch erhärten (Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997; Lasmezas et al., 1996; Lasmezas et al., 2001). Diese Daten zu Grunde legend, herrscht mittlerweile die Meinung vor, dass vCJD durch den Konsum von mit BSE-Material kontaminierten Produkten hervorgerufen wurde. Bis jetzt wurden 192 vCJD-Fälle² in verschiedenen Ländern, u.a. Frankreich, Niederlande, Irland und USA, identifiziert.

² Die Daten wurden entnommen aus: The UK National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit <u>http://www.cjd.ed.ac.uk/vcjdworld.htm</u> (Stand: Juli 2006)

1.4 Eigenschaften des Erregers

Die britische Strahlenbiologin Tikvar Alper unternahm Ende der 60er Jahre die ersten Versuche den Erreger der Scrapie-Krankheit durch UV-Licht und ionisierende Strahlung unschädlich zu machen (Alper, 1967). Nukleinsäuren lassen sich durch eine solche Behandlung in der Regel zerstören, der Scrapie-Erreger war jedoch erstaunlich resistent gegenüber diesen Methoden. Diese Ergebnisse ließen darauf schließen, dass der Erreger nicht aus Nukleinsäuren bestand. Protein-zerstörende Methoden konnten den Erreger jedoch inaktivieren (Prusiner *et al.*, 1982b). Neben der fehlenden Immunantwort sprachen diese Befunde schon zu diesem Zeitpunkt gegen die bis *dato* bekannten Erregerklassen, wie Viren, Bakterien oder Pilze, die zur Vermehrung auf Nukleinsäuren angewiesen sind. Der Erreger war offenbar proteinöser Natur. Prusiner (1982a) postulierte 1982 demzufolge, dass der Scrapie-Erreger großteils aus Proteinen bestehen müsse. Er führte den Begriff Prion ein, bei dem es sich um ein Akronym für "proteinaceous infectious particle" handelt.

Die Aufreinigung des Erregers zeigte, dass der Hauptbestandteil tatsächlich ein 27-30 kDa großes Protein war (Prusiner et al., 1982c), das Prion-Protein (PrP). Später konnte anhand einer cDNA nachgewiesen werden, dass das Prion-Protein ein wirtseigenes Protein ist (Oesch et al., 1985), das während der Aufreinigung N-terminal verkürzt wurde. Es ist bei allen Säugetieren zu finden, und wird lebenslang exprimiert (Basler et al., 1986). PrP^C wird in hohem Maße in Neuronen produziert, ist aber auch in anderen Geweben wie z.B. Herz- und Skelettmuskelzellen zu finden mit Ausnahme von Leber und Pankreas (Weissmann, 1994). PrP^C wird vom Gen *PRNP* kodiert und liegt beim Menschen auf Chromosom 20. Es musste demnach die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass PrP zwei Formen annehmen kann: eine zelluläre gesunde und eine pathogene Form. Die zelluläre Isoform wurde als PrP^C (C für zellulär; engl.: cellular) und die pathogene als PrP^{Sc} (Sc für Scrapie) bezeichnet. In ihrer chemischen Konstitution, d.h. Aminosäureseguenz inklusive der posttranslationalen Modifikationen, sind die beiden Formen nicht zu unterscheiden (Stahl et al., 1993). Hierzu ist allerdings zu bemerken, dass die Glykosylierungen, die beide Konformationen tragen können, per se heterogen sind, so dass diese Strukturen in PrP^C und PrP^{Sc} differieren können (Rudd et al., 1999, Rudd et al., 2001). Sie besitzen jedoch unterschiedliche biochemische Eigenschaften (s. Kap. 1.5.1). In der Nur-Protein-Hypothese nach Prusiner wird das Prion-Protein als alleiniger Bestandteil des Erregers angesehen (Prusiner, 1989). Diese Theorie widersprach dem Dogma der Molekularbiologie, welches besagt, dass für die Vermehrung eines Erregers Nukleinsäuren essentiell sind. Die Suche nach solchen kodierenden Nukleinsäuren war jedoch erfolglos. Es wurde sogar gezeigt, dass

Nukleinsäuren mit mehr als 25 Nukleotiden als Bestandteil des Erregers ausgeschlossen werden können (Kellings *et al.*, 1992; Safar *et al.*, 2005a). Nach dem Prion-Modell ist PrP^C für die Vermehrung des Erregers zwingend erforderlich, denn PrP^{0/0}-Mäuse, die PrP nicht exprimieren können, lassen sich nicht durch Prionen infizieren und übertragen die Krankheit auch nicht (Büeler *et al.*, 1993; Prusiner *et al.*, 1993).

1.5 Das Prion-Protein

1.5.1 Molekulare Struktur von PrP^c und PrP^{sc}

Die zelluläre Isoform, PrP^C, lässt sich über einen bislang nicht genau verstandenen Mechanismus in die krankheitsassoziierte Form, PrP^{Sc}, überführen. Diese Umwandlung beinhaltet eine Änderung der Sekundärstrukturanteile von 42% α -Helix und 3% β -Faltblatt in PrP^C auf 30% α -Helix und 43% β -Faltblatt in PrP^{Sc} (Pan et al., 1993). Besonders gravierend ist dabei die enorme Zunahme an β-Faltblatt-Struktur in PrP^{Sc}. Ein weiterer Unterschied besteht in der außerordentlich hohen Resistenz von PrP^{Sc} gegen eine limitierte Verdauung mit Proteinase K (PK), bei der die meisten Proteine, wie auch PrP^C, degradiert werden. Im Zuge dieser Proteolyse wird ein N-terminales Fragment von PrP^{Sc} abgebaut, wohingegen der C-terminale Teil (im Hamster Prion-Protein, SHaPrP, Aminosäuren 90-231) beständig sind. Allein diese Eigenschaft ermöglichte die erste Aufreinigung von Infektiosität als sogenannte Prion-Rods, auch PrP 27-30 genannt, mit dem apparenten Molekulargewicht von 27-30 kDa (Prusiner et al., 1982c, McKinley et al., 1983). Dieses verkürzte Fragment trägt noch uneingeschränkte Infektiosität. Die meisten routinemäßig eingesetzten BSE-Schnell-Tests beruhen auf dem Nachweis dieser Eigenschaft von PrP^{Sc} (zum Überblick s. Soto, 2004). Bemerkenswerterweise wurde jedoch gezeigt, dass ca. 90% des PrP^{Sc}, isoliert aus Hirnen von CJD-Patienten, PK-sensitiv war (Safar et al., 2005b).

Ein weiteres Unterscheidungsmerkmal von PrP^{C} und PrP^{Sc} ist das Löslichkeitsverhalten. PrP^{C} ist in milden Detergenzien löslich; PrP^{Sc} hingegen ist unter den selben Bedingungen unlöslich und bildet hochmolekulare Aggregate und z.T. amyloide Fibrillen. Versuche PrP^{Sc} durch Ultraschallbehandlung und Detergenzien in Lösung zu bringen, führten zur Bildung von löslichen Oligomeren und zu einer Änderung der Sekundärstrukturanteile hin zu höheren α -Helix-Anteilen. Die entstandenen Oligomere wiesen nur noch eine sehr geringe Infektiosität auf (Riesner *et al.*, 1996). Dies deutet auf einen Zusammenhang zwischen dem Aggregatzustand und der Infektiosität hin.

1.5.2 Prozessierung von PrP^c

Nach der Translation der PrP-mRNA wird N-terminal ein Signalpeptid für den Transport in das Endoplasmatische Retikulum (ER) abgeschnitten. Ein weiteres Signalpeptid am C-Terminus vermittelt im ER die Anbringung eines Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol- (GPI-) Ankers (Stahl *et al.*, 1987). Darüber hinaus werden die beiden Cystein-Reste an Postion 179 und 214 über eine Disulfid-Brücke miteinander verknüpft (Turk *et al.*, 1988). An den Positionen Asn 181 und Asn 197 kann das Prion-Protein N-Glykosylierungen tragen (Endo *et al.*, 1989), wobei drei verschiedene Glykoformen des PrP entstehen: unglykosyliertes, mono-glykosyliertes und di-glykosyliertes PrP. Das vollständig posttranslational modifizierte PrP wird zur Zellmembran transportiert und dort außen in Caveo-lae-ähnlichen Domänen über den GPI-Anker angebracht (Taraboulos *et al.*, 1995; Vey *et al.*, 1996). PrP^C hat in diesem Zustand ein Molekulargewicht von 33-35 kDa für die di-glykosylierte Form. In Abb. 1.3 ist das Prion-Protein des Syrischen Goldhamsters (*Mesocricetus auratus*) in seiner Primärstruktur inklusive der posttranslationalen Modifikationen schematisch dargestellt.



Abb. 1.3 Schematische Darstellung des PrP^{c} des Syrischen Goldhamsters (SHaPrP). Aminosäuren 1-22 und 232-254: Signalpeptide, Aminosäuren: 51-91: Okta-Repeats, α -helikale Struktur: grüne Kästen; β -Faltblatt-Struktur: rote Kästen; Aminosäurefarbcode: negativ geladene (saure) AS = rot, positiv geladene (basische) AS = blau, neutral hydrophile AS = violett, hydrophobe AS = braun (bei pH 7) (Dumpitak & Riesner, 2003).

1.5.3 3D-Struktur von PrP^c und PrP^{sc}

Erstmals wurde die dreidimensionale Struktur vom Prion-Protein der Maus mittels NMR-Spektroskopie anhand rekombinant hergestelltem Prion-Protein (rek PrP) ermittelt (Riek et al. 1996). Später kamen Strukturen verschiedener Spezies hinzu, u.a. die des Syrischen Goldhamsters (Liu et al., 1999). Der Cterminale Teil ist globulär und beinhaltet drei α -Helices (α -Helix 1: 145–153, α -Helix 2:172–194 und α -Helix 3: 200–226 in SHaPrP) und zwei kurze β -Faltblatt-Bereiche (B-Strang 1: 129–133 und B-Strang 2: 160–163 in SHaPrP). Die Nterminale Region zeigt keine einheitliche Struktur und wird daher als flexibel betrachtet. In Abb. 1.4 ist die komplette Tertiärstruktur des SHaPrP(90-231), das der Sequenz des PrP 27-30 entspricht, dargestellt. Bei den in den oben genannten NMR-Studien verwendeten rekombinaten Prion-Proteinen (rek PrP) handelt es sich um Konstrukte, die in E.Coli-Zellen exprimiert wurden. Aufgrund des prokaryotischen Systems trägt solches rek PrP keine posttranslationalen Modifikationen. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die ermittelten Tertiärstrukturen, die sich zwischen den verschiedenen Spezies kaum unterscheiden, tatsächlich der Struktur von natürlichem PrP^C entsprechen. 1D-NMR-Spektren von PrP^C, aufgereinigt aus Kälberhirnen, zeigten keinen Unterschied zu Spektren von rekombinantem PrP. Dies ließ den Schluss zu. dass natürliches PrP^C trotz der posttranslationalen Modifikationen die gleiche globuläre Struktur aufweist wie rek PrP (Hornemann et al., 2004).



Abb. 1.4 Tertiärstruktur des rekombinanten Prion-Proteins des Syrischen Goldhamster SHaPrP(90-231) bestimmt anhand von NMR-Experimenten (verändert nach Liu *et al.*, 1999). Für PrP^{Sc} konnte bis heute keine hochauflösende Struktur ermittelt werden, was wahrscheinlich in seiner Aggregatstruktur begründet liegt. Röntgenbeugungs-Experimente konnten belegen, dass es sich bei PrP 27-30 um eine "crossbeta"-Struktur handelt, wie es für amyloide Fibrillen (s. Kap. 1.2) typisch ist (Nguyen et al., 1995). In speziellen Präparationen von PrP 27-30 konnten auch 2D-Kristalle erzeugt werden. Anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen dieser Kristalle konnte ein Modell der PrP 27-30-Struktur erstellt werden (Wille et al., 2002; Govaerts et al., 2004). Das Modell beinhaltet die Ausbildung einer linksgängigen β-Helix des N-terminalen Teils, lediglich die beiden C-terminalen Helices bleiben weitgehend intakt (s. Abb. 1.5). Da es sich hier um ein Modell für PrP 27-30 handelt, finden die N-terminalen Aminosäuren der vollen PrP-Sequenz vor Proteinase K Verdauung hier keine Berücksichtigung. Sie sind aus sterischen Gründen mit dem Modell der Fibrille (Abb. 1.5 C) nicht vereinbar. Vor kurzem konnte jedoch gezeigt werden, dass PrP der vollständigen Sequenz ebenfalls in der Lage ist amyloide Fibrillen zu bilden (Leffers et al., 2005; Bocharova et al., 2005; Lührs et al., 2006). Somit ist nicht endgültig geklärt, ob sich aus dem Modell auch die Bildung solcher Volllängen-Fibrillen ableiten ließe bzw. ob sich die Fibrillen von PrP 27-30 und PrP^{Sc} der vollen Länge grundlegend unterscheiden.



Abb. 1.5 Strukturmodell für PrP^{Sc} beruhend auf elektronenmikroskopischen Daten von 2D-Kristallen. A: Monomereinheit für PrP^{Sc} B: Es wird angenommen, dass die Monomereinheiten Trimere bilden, die, wie in C zu einer Fibrille assembliert werden können (Govaerts *et al.*, 2004).

Die wesentlichen Unterscheidungsmerkmale von PrP^C und PrP^{Sc} sind in Tab. 1.3 zur Übersicht gegenübergestellt.

Eigenschaft	Zelluläre Form (PrP ^c)	Pathogene Form (PrP ^{sc})
Infektiosität	nicht infektiös	infektiös
Löslichkeit	löslich in milden Detergenzien	unlöslich
Aggregatzustand	monomer	hochmolekulare Aggregate
Sekundärstruktur	überwiegend α -helikal	überwiegend β-Faltblatt
Proteinase K Sensitivität	vollständig abbaubar	teilweise C-terminal resistent

Tab. 1.3 Übersicht über die Eigenschaften von PrP^c und PrP^{sc}.

1.5.4 Funktion von PrP^c

Die zelluläre Funktion des PrP^C konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. PrP^{0/0}-Mäuse, die kein PrP exprimieren können, entwickeln sich normal und zeigen keine auffälligen Symptome (Büeler *et al.*, 1992). Einzig ein leicht veränderter Schlafrhythmus konnte festgestellt werden (Tobler *et al.*, 1996). Aus zahlreichen Studien konnten eine Reihe von möglichen Funktionen für PrP^C postuliert werden. Darunter sind Hinweise, dass PrP eine wichtige Rolle bei der zellulären Resistenz gegen oxidativen Stress spielt (Milhavet & Lehmann, 2002), und dass PrP an Signaltransduktion-Wegen in Zellen beteiligt ist (Mouillet-Richard *et al.*, 2000). Weiterhin gibt es Anzeichen für eine essentielle Funktion von PrP im Zink und Kupfer Metabolismus (Pauly & Harris, 1998; Kretzschmar *et al.*, 2000; Watt & Hooper, 2003; Brown, 2005) und in der synaptischen Signalübertragung (Collinge *et al.*, 1994).

In jüngster Zeit verhärten sich jedoch Hinweise, dass es sich bei PrP um ein neuroprotektives Protein handelt, insbesondere im Zusammenhang mit dem von Bax induzierten Zelltod (zum Überblick s. Roucou & LeBlanc, 2005). Diese Annahme wird zudem dadurch bekräftigt, dass durch PrP-Überexpression neuronale Zellen aus Zellkulturen, sowie einige Säugetier-Zelllinien und Hefezellen vor pro-apoptotischen Reizen geschützt werden (Li & Harris, 2005). Überdies konnte PrP eine Bedeutung in der Erneuerung von blutbildenden Stammzellen im Knochenmark beigemessen werden (Zhang *et al.*, 2006), was ebenfalls auf eine anti-apoptotische Aktivität von PrP hindeutet.

1.6 Modelle zur Prion-Replikation

Nach der Nur-Protein-Hypothese besteht der Erreger der Prion-Krankheiten allein aus der pathogenen Isoform des zellulären Prion-Proteins (s. Kap. 1.4).

Diese Isoform wird demnach repliziert, indem zelluläres PrP über einen nicht exakt aufgeklärten Mechanismus in die pathogene Form umgewandelt wird. Im Wesentlichen können zwei Modelle der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} herausgestellt werden: das Heterodimer-Modell (Cohen *et al.*, 1994) (s. Abb. 1.6) und das Modell der keimabhängigen Polymerisation (Jarret & Lansbury, 1993) (s. Abb. 1.7).

Im Heterodimer-Modell ist der initiierende Schritt die Bildung eines teildenaturierten Zwischenzustandes (PrP*), ähnlich dem "molten globule", mit dem PrP^C im Gleichgewicht steht. Exogenes PrP^{Sc}, eingebracht durch eine Infektion, kann mit PrP* eine Bindung eingehen und ein Heterodimer bilden. PrP* wird bei diesem Prozess in PrP^{Sc} umgewandelt. Es resultiert ein Homodimer, welches nach Dissoziation erneut PrP^{Sc}-Moleküle für die Umwandlung von PrP* liefert. Es handelt sich bei dem Mechanismus um eine Autokatalyse bei dem das Gleichgewicht der gesamten Reaktion auf der Seite von PrP^{Sc} liegt. Die Menge des PrP^{Sc} könnte somit von beliebig geringen Konzentrationen ausgehend exponentiell ansteigen.



Abb. 1.6 Heterodimer-Modell der Prion-Replikation (nach Cohen et al., 1994).

Die spontane Umwandlung muss allerdings laut Eigen (1996) extrem langsam verlaufen, anderenfalls müsste PrP^{Sc} auch ohne Infektion akkumulieren (Eigen, 1996). Im Falle einer Infektion müsste die Umwandlung durch die Katalyse unrealistisch stark beschleunigt sein, damit es überhaupt zum Krankheitsfalle käme. Eigen stellte daher das kooperative Prusiner-Modell auf, bei dem mehrere PrP^{Sc}-Moleküle kooperativ an PrP^C binden müssen, um die Umwandlung zu PrP^{Sc} zu induzieren.

Das Modell nach Jarret und Lansbury beschreibt die Möglichkeit der keimabhängigen Polymerisation bzw. der linearen Kristallisation als Mechanismus der Prion-Replikation. Das Gleichgewicht liegt hier, im Gegensatz zum Heterodimermodell, auf der Seite von PrP^C. Der kritische Schritt ist die Bildung eines Polymerisationskeims, bzw. dessen Zugabe z.B. durch eine Infektion. Erst nach Erreichen einer kritischen Größe ist die Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} günstig und kann schnell ablaufen. Eine Schwäche dieses Modells ist die Dissoziation der anwachsenden Aggregate, die stattfinden muss, um die Ausbreitung einer Infektion zu ermöglichen.



Abb. 1.7 Modell zur keiminduzierten Polymerisation (nach Jarret & Lansbury, 1993).

1.7 In vitro Konversion

In einer Reihe von Studien wurden schon früh gute Hinweise dafür geliefert, dass Prionen als Krankheitserreger ausschließlich aus Protein bestehen (vgl. Kap. 1.4). Darunter die Erkenntnis, dass PrP^C-knock-out-Mäuse nicht empfänglich für eine Infektion mit PrP^{Sc} sind (Büeler et al., 1993), dass hoch aufgereinigtes PrP^{Sc} Infektiosität trägt (Prusiner et al., 1984), und dass die Infektiosität proportional zur PrP^{Sc}-Konzentration ist (Gabizon et al., 1988). Die Beteiligung von Nukleinsäuren konnte dagegen ausgeschlossen werden (Safar et al., 2005a). Aber erst durch eine *in vitro* Umwandlung von reinem PrP^C in infektiöses PrP^{Sc} kann eindeutig belegt werden, dass die Prion-Hypothese zutreffend ist. Ein Konversionssystems, in dem radioaktiv markiertes PrP^C in zell-freier Lösung zu einer PK-resistenten Form, ähnlich PrP^{Sc}, umgewandelt werden konnte, machte große Hoffnung auf eine schnelle Aufklärung in diesem Punkt (Kocisko et al., 1994). Neu erzeugte Infektiosität konnte mit diesem System dennoch nicht nachgewiesen werden (Hill et al., 1999). Der letztendliche Beweis der Prion-Hypothese also ließ trotz intensiver Studien lange auf sich warten. Erst vor kurzem konnte in zwei unabhängigen Experimenten Infektiosität erzeugt werden.

Legname et al. (2004) stellten in vitro aus reinem rekombinantem Prion-Protein der Maus, der verkürzten Sequenz 89-230, amyloide Fibrillen her. Diese Fibrillen wiesen eine geringe Infektiosität auf, wenn sie in transgene Mäuse inokuliert wurden, die das gleiche Konstrukt vor einem PrP^{0/0}-Hintergrund stark überexprimierten. Nach Passage in Wildtyp-Mäuse entsprach die Infektiosität etwa der natürlicher Prionen. Die Herstellung der Fibrillen bzw. dieser sogenannten "synthetischen Prionen" erfolgte unter teildenaturierenden Bedingungen bei relativ hohen Proteinkonzentrationen und saurem pH-Wert. Durch einen anderen Ansatz zeigten Castilla et al. (2005) die Neusynthese von Infektiosität in vitro allerdings unter Verwendung von Hirnextrakt. Hierfür wurde eine Methode angewendet, mit der PrP^{sc} in Hirngewebe vervielfältigt werden kann: die zyklische Amplifikation von fehlgefalteten Proteinen, PMCA (engl.: protein misfolding cyclic amplification), (Saborio et al., 2001). Durch die PMCA wurde PrP^C in Hirnhomogenat, durch Zugabe geringer Mengen PrP^{Sc}, zu PrP^{Sc} umgewandelt. Durch mehrere Zyklen der PrP^{Sc}-Amplifikation konnte der ursprünglich eingesetzte PrP^{Sc}-Keim ausgedünnt werden, so dass Präparationen erzielt werden konnten, die nur neu gebildetes PrP^{Sc} enthielten. Im Tierversuch konnte dessen Infektiosität daraufhin bestätigt werden.

Beide Arbeiten kommen dem Beweis der Prion-Hypothese sehr nahe, erbringen ihn jedoch nicht endgültig. Im Falle der Arbeit von Legname *et al.* (2004) wurde kritisiert, dass es nicht auszuschließen ist, dass die verwendeten transgenen Mäuse, die das verkürzte Konstrukt PrP(89-230) stark überexprimieren, spontan eine TSE-ähnliche Krankheit ausbilden können, obwohl eine solche in Kontrollexperimenten nicht gefunden wurde. Zudem ist der Infektiositätstiter noch wesentlich geringer als der natürlicher Prionen. In der Studie von Castilla *et al.* (2005) bleibt, durch die Verwendung von Hirnhomogenat als PrP^C-Reservoir und PrP^{Sc}-Quelle, die Rolle von anderen Komponenten für die Infektiosität unklar. Zudem ist keine tatsächliche *de novo* Infektiosität durch Verwendung des PrP^{Sc}-Keims erzeugt worden.

Trotz der Annäherung an die Grundlage der Infektiosität von Prionen, ist es noch weitestgehend rätselhaft, was PrP diese Eigenschaft verleiht. Fest steht, dass Infektiosität stets mit der Oligomerisierung von PrP verknüpft ist (vgl. Kap. 1.5.1). Ob tatsächlich die hochmolekularen Fibrillen Träger der Infektiosität sind, ist allerdings umstritten. Selbst die Arbeit von Legname *et al.* (2004) ist kein eindeutiger Beweis, dass die Infektiosität in der fibrillären Natur von PrP zu suchen ist. Besonders die Tatsache, dass die Infektiosität bezogen auf die PrP-Menge ungewöhnlich gering war, könnte darauf hindeuten, dass nur ein geringer Teil der PrP-Moleküle in eine infektiöse Form überführt werden konnte, die unter der Masse der Fibrillen nicht nachzuweisen waren. Diese Vermutung muss wieder stärker in Betracht gezogen werden, denn für PrP wurde vor kur-

zem behauptet, dass unter Umständen nicht die großen wohl geordneten Fibrillen, sondern kleinere Oligomere die größte Infektiosität aufweisen können (Silveira *et al.*, 2005). Danach hätten Partikel von 300-600 kDa die größte Infektiosität pro PrP-Einheit, was 14-18 PrP-Molekülen entspricht. Größere, sowie kleinere Spezies waren deutlich weniger infektiös. Für sehr kleine Oligomere (4-6 PrP-Moleküle) aus solubilisiertem PrP^{Sc} konnte auch in unserer Arbeitsgruppe der Verlust an Infektiosität gezeigt werden, während die Infektiosität von 14-18 Oligomeren trotz Anwendung ähnlicher Methoden nicht gefunden wurde (Riesner *et al.*, 1996).

In einem von unserer Arbeitsgruppe erstellten *in-vitro*-Konversionssystem lassen sich, neben der Bildung von amorphen Aggregaten und amyloiden Fibrillen, auch oligomere Zwischenzustände durch Variation submizellarer SDS-Konzentrationen einstellen (Post *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 2001; Leffers *et al.*, 2005) (s. Abb. 1.8). Mit dem System lassen sich der Sekundärstrukturübergang von α -helix-reich zu β -faltblatt-reich und die Aggregation zu amorphen und fibrillären Aggregaten von PrP nachvollziehen. Dabei hat PrP bei den membran-ähnlichen Bedingungen zwischen 0,2-0,055% SDS eine α -helix-reiche Struktur und in eher wässrigem Milieu <0,055% SDS einen erhöhten β -Faltblattanteil. Die Einstellung von stabilen Intermediaten, wie α -helikalen Dimeren und β -faltblatt-reichen Oligomeren, eröffnet die Möglichkeit genauere Untersuchungen zur Beschaffenheit dieser frühen Zwischenstufen durchzuführen, was die Aufklärung des Mechanismus der Prion-Replikation voran brächte.



Abb. 1.8 Schematische Darstellung der in vitro Konversion des Prion-Proteins mittels SDS (nach Leffers *et al.*, 2005).

1.8 Dimere des Prion-Proteins

In einem Aggregationsprozess ist der kleinstmögliche Komplex ein Dimer. Im vorher erläuterten Heterodimermodell wird ein ebensolches als Initialpunkt für die Bildung von PrP^{Sc} angesehen (vgl. Kap. 0). Dass ein PrP-Dimer tatsächlich in vivo eine Relevanz haben könnte, kann aus verschiedenen Arbeiten geschlossen werden. Der Versuch den Scrapie-Erreger durch hoch dosierte ionisierende Strahlung zu inaktivieren, erlaubte die Bestimmung einer "Treffer-Größe" von 55 kDa, was etwa einem PrP-Dimer entspricht (Bellinger-Kawahara et al., 1988). In Scrapie-infizierten Zellkulturen ebenso wie in infizierten Hamster-Hirnen konnte ein kovalent verknüpftes PrP-Dimer von 60 kDa nachgewiesen werden, von dem vermutet wird, dass es sich um ein dimeres Intermediat zwischen PrP^C und PrP^{Sc} handelt (Priola et al., 1995). Auch für natürliches bovines PrP^C konnte die Existenz eines dimeren Zustandes nachgewiesen werden (Meyer et al., 2000). Welche Bedeutung die Ausbildung von Dimeren im Konversionsprozess von PrP^C zu PrP^{Sc} tatsächlich haben, ist bislang nicht geklärt. Fest steht jedoch, dass eine Charakterisierung solcher Komplexe entscheidend zum Verständnis der Umwandlung beitragen kann.

1.9 Fragestellung

Durch die Umwandlung der zellulären Isoform des Prion-Proteins, PrP^C, in die krankheitsassoziierte Isoform, PrP^{Sc}, wird ein Prozess in Gang gesetzt, auf dem die Pathogenität der Prionen beruht. Die Konformationsänderung beim Übergang von PrP^C zu PrP^{Sc} stellt dabei ein sehr entscheidendes Ereignis dar. Der Mechanismus, welcher der Bildung von PrP^{Sc} zu Grunde liegt, ist jedoch noch weitgehend unverstanden. Die Interaktion von PrP^C und PrP^{Sc} hat nach dem Prion-Modell und allen denkbaren Replikationsmechanismen eine fundamentale Bedeutung. Allgemein stellen Dimere die kleinstmöglichen PrP-Komplexe dar und könnten so den Initialpunkt für eine PrP^{Sc}-Replikation bilden. Nach derzeitigem Wissensstand liegt PrP^C unter nativen Bedingungen (neturalem pH-Wert) zudem mehr als Dimer, denn als Monomer vor. Aus diesem Grund ist die strukturelle Untersuchung und insbesondere die Identifikation der nichtkovalenten Wechselwirkungen innerhalb von PrP-Dimeren von besonderem Interesse. Dies nicht zuletzt auch deshalb, da in der aktuellen Literatur Di- und Oligomere vermehrt als die eigentlich neurotoxischen Agenzien bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen diskutiert werden (Chiesa et al., 2001; Walsh et al., 2002; Silveira et al., 2005; s. auch Kap. 1.2).

Um die Prozesse der Konformationsumwandlung auf der molekularen Ebene zu verstehen, ist die Aufklärung der Tertiärstrukturen von Intermediaten der Konversion unerlässlich. Ziel dieser Arbeit ist daher die Charakterisierung der PrP-Dimere als Intermediate des Umwandlungsprozesses und die exakte Lokalisierung der Kontaktstellen der PrP-Monomere innerhalb solcher Komplexe. Dies ermöglicht Rückschlüsse auf deren Bildung und Struktur und damit auf den Mechanismus der Prion-Replikation. Ein besonderer Schwerpunkt ist hierbei die vergleichende Untersuchung von Dimeren als Vorstufen zu amorphen Aggregaten bzw. amyloiden Fibrillen. Eventuell auftretende Unterschiede in den nichtkovalenten Wechselwirkungen dieser Dimere würden die Aufklärung des Strukturumwandlungsprozesses entscheidend voranbringen.

Mit dem in unserer Arbeitsgruppe etablierten *in-vitro*-Konversionssystem (vgl. Kap. 1.7) können Dimere des Prion-Proteins stabil eingestellt und so einer weiteren Untersuchung zugänglich gemacht werden. Es konnte im Verlauf dieser Arbeit weiterhin gezeigt werden, dass mit Hilfe des Konversionssystems durch Zugabe von NaCl auch die Bildung von amyloiden Fibrillen induziert werden kann (Leffers *et al.*, 2005), was die Möglichkeit der Charakterisierung der Intermediate dieses Prozesses eröffnet.

Die nicht-kovalenten Wechselwirkungen in PrP-Dimeren sollten durch eine chemische Quervernetzung gewissermaßen eingefroren werden. Somit spiegeln die neuen kovalenten Bindungen die Kontaktstellen von Struktur-Domänen innerhalb der Komplexe wider. Mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen sollten diese Kontaktstellen auf der Sequenz-Ebene exakt bestimmt werden. Gerade in den letzten Jahren hat diese Methodik zur Aufklärung von Wechselwirkungen in Proteinkomplexen, die anderenfalls nur schwer den gängigen Sturkturanalysemethoden zugänglich gemacht werden können, bereits eine breite Anwendung gefunden (zum Überblick Sinz, 2006). Für alle Versuche sollte rekombinantes PrP(90-231) eingesetzt werden, das der Sequenz des infektiösen, PK-resistenten PrP 27-30 entspricht. Die ermittelten Daten sollten als Grundlage für die Entwicklung und Berechnung eines neuen Modells für ein PrP-Dimer dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden bei den üblichen Herstellern für Laborchemikalien bezogen und entsprechen, wenn nicht anders erwähnt, dem Reinheitsgrad "pro analysi". Zum Ansetzen von Lösungen wurde hochreines "Milli-Q-Wasser" verwendet, im Folgenden als $H_2O_{deion.}$ bezeichnet. $H_2O_{deion.}$ wurde mit der hauseigenen Anlage für deionisiertes Wasser mit nachgeschaltetem Wasseraufbereitungssystem EPA Est. 41237-MA-1 (Millipore GmbH, Neu Isenburg, Deutschland) hergestellt. Alle angesetzten Lösungen wurden durch 0,2 µm Membranfilter (MN Sterilizer, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) sterilfiltriert.

2.2 Puffer und Lösungen

NaPi (Natriumphosphatpuffer)

- 100 mM Na₂HPO₄ (Dinatriumhydrogenphosphat) und
- 100 mM NaH₂PO₄ (Natriumdihydrogenphosphat)

wurden durch Mischen auf den gewünschten pH-Wert von 7,2 eingestellt. Verwendet wurde, wenn nicht anders erwähnt, eine 1:10 Verdünnung, also 10 mM Natriumphosphat. Dieser wird nachfolgend kurz als NaPi bezeichnet.

TBST (Tris Buffered Sodium Tween)

- 10 mM Tris/HCl pH 8
- 150 mM NaCl
- 0,01 % Tween 20 (v/v)

Ambic (Ammoniumbicarbonatpuffer)

25 mM NH₄HCO₃ (Ammoniumhydrogencarbonat) pH 8

2.3 Rekombinantes Prion-Protein

Rekombinantes Prion-Protein (90-231), das der Sequenz des PrP 27-30 des Syrischen Goldhamsters *Mesocricetus auratus* entspricht, nachfolgend kurz als rek PrP bezeichnet, wurde uns von der Arbeitsgruppe von Prof. S. B. Prusiner als HPLC-aufgereinigtes Lyophilisat zur Verfügung gestellt und von unserer Arbeitsgruppe selbst aus *E. coli* nach dem Protokoll Mehlhorn *et al.* (1996) aufgereinigt. Das als Lyophilisat vorliegende rek PrP wurde vor der Verwendung denaturiert und renaturiert, um das Protein in seine native Struktur zu überführen (Jansen, 1998). Zur Aufbewahrung und als Stammlösung wurde rek PrP in 0,2% SDS 10 mM NaPi gelöst und bei -20°C gelagert.

2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

2.4.1 Absorptionsmessung

Die Konzentration von Proteinen in Lösung kann spektralphotometrisch bestimmt werden. Messgröße ist dabei die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die Messungen wurden mit dem Spektralphotometer DU 640 (Beckman, Palo Alto, USA) durchgeführt. Der Extinktionskoeffizient von rek PrP bei 280 nm wurde anhand der Aminosäurezusammensetzung berechnet (Gill & von Hippel, 1989) und beträgt 1,496 OD_{280nm} bei 1 mg/ml rek PrP. Berechnungsgrundlage ist dabei denaturiertes Protein, weshalb alle Messungen in 6 M Harnstoff durchgeführt wurden.

2.4.2 Micro BCA-Test

Diese Proteinkonzentrationsbestimmung beruht auf der Kombination der Biuret-Reaktion mit der selektiven Bicinchoninsäure- (BCA-) Komplexierung von Cu⁺. In alkalischer Umgebung reduzieren Proteine Cu²⁺ zu Cu⁺, welches dann mit zwei BCA-Molekülen einen Chelatkomplex bildet, der bei einer Wellenlänge von 562 nm absorbiert (Smith *et al.*, 1985; Wiechelman *et al.*, 1988). Formel 2.1 zeigt den Mechanismus dieser Reaktion.

Formel 2.1

Protein (Peptidbindung)	+	Cu ²⁺	OH⁻►	Tetradentat-Cu ⁺ -Komplex
Cu⁺-Komplex	+	BCA		BCA-Cu ⁺ -Komplex

Zur Durchführung dieser Konzentrationsbestimmung wurde das Micro BCA Protein Assay KitTM (Pierce, Rockford, IL, USA) verwendet. Die Proteinkonzentration kann anhand einer Eichreihe mit bekannter Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 562 nm ermittelt werden. Die Messungen wurden wie vom

Hersteller beschrieben vorgenommen. Für jede Messreihe wurde eine Eichreihe mit BSA als Standardprotein und Konzentrationen von 0,5-40 ng/µl eingesetzt. Die Konzentrationen der zu messenden Proben lagen in diesem Konzentrationsbereich, anderenfalls wurden Verdünnungen angefertigt. Zu je 0,5 ml Proteinlösung wurden 0,5 ml "Working Reagent" pipettiert, das aus 25 Teilen Reagent A (basischer Puffer), 24 Teilen Reagent B (BCA-Lösung) und 1 Teil Reagent C (Kupfersulfatlösung) bestand. Alle Proben wurden für 1 h bei 60°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 562 nm gemessen.

Ein Vorteil dieser Methoden gegenüber anderen Proteinbestimmungen ist, dass die Messung auch in Anwesenheit von SDS durchgeführt werden kann.

2.5 Denaturiende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können mit Hilfe einer denaturierenden diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll von Sambrook et al. (1989) in einer Hoefer SE 600 Gelelektrophoresekammer von Pharma Biotech (San Francisco, USA) mit vertikalen Gelplatten (14x14x0,15 cm) bzw. mit einer Mini-Protean II Gelkammer (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) für kleine Gele (8x7,3x0,075 cm). Zunächst wurde ein 12–15 % iges Trenngel gegossen, wobei die Prozentigkeit des Acrylamids je nach Fragestellung eingestellt werden kann, und mit wassergesättigtem Isopropanol überschichtet. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol abgegossen und ein 3-5 % iges Sammelgel auf das Trenngel geschichtet. Die Proben wurden vor dem Auftragen 1:1 bzw. 1:5 mit dem entsprechenden Auftragspuffer gemischt, zur kompletten Denaturierung 5 min bei 95°C inkubiert und nach Abkühlen auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1 x Lämmli-Puffer mit 0,1% SDS für 15-30 min bei 180 V und anschließend bei 300 V durchgeführt bis die gewünschte Trennstrecke erreicht war. Für kleine Gele erfolgte die Elektrophorese entsprechend für 15 min bei 100 V und anschließend für 30-45 min bei 200 V. Zur Molekulargewichtsbestimmung der zu untersuchenden Proteine wurde ein Marker mit einem Proteinstandard aufgetragen (s.Tab. 2.1).

2.5.1 Verwendete Lösungen für die SDS-PAGE

Acrylamid-Stammlösung (30:0,8)

v/v)
١

0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid (w/v)

Die Lösung wurde nach dem Ansetzen für mindestens 30 min mit Amberlite MB3 gerührt, um die freie Acrylsäure zu binden. Die Lösung wurde anschließend filtriert, um Amberlite MB3 abzutrennen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

10 x Gelelektrophoresepuffer nach Lämmli

0,25	Μ	Tris pH 8,3
1,9	М	Glycin

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

Trenngel (12-15%)

380	mМ	Tris/HCl pH 8,8
12-15	%	Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)
0,1	%	SDS (w/v)
0,1	%	TEMED (v/v)
0,1	%	APS (v/v)
Sammelgel		
124	mМ	Tris/HCI pH 6,8

- 3-5 % Acrylamid/Bisacrylamid (30:0,8)
- 0,1 % SDS (w/v)
- 0,1 % TEMED (v/v)
- 0,1 % APS (v/v)

2 x Auftragspuffer nach Lämmli

- 375 mM Tris/HCl pH 6,8
 - 2 % 2-Mercaptoethanol (v/v)
 - 20 % Glycerin (v/v)
 - 4 % SDS (w/v)
 - 1 Spatelspitze Bromphenolblau/50 ml

6 x Auftragspuffer nach Lämmli

1,05 M	Tris/HCI pH 6,8
--------	-----------------

- 9,3 % DTT (Dithiothreitol) (w/v)
- 30 % Glycerin (v/v)
- 10 % SDS (w/v)
 - 1 Spatelspitze Bromphenolblau/50 ml

2.5.2 Proteinstandard

Es wurde der RainbowTM-Molekulargewichtsmarker von Amersham Pharmacia Biotech als Proteinstandard verwendet.

gefärbte Proteine	Molekulargewicht [kDa]
Myosin	220
Phosphorylase b	97
Rinderserumalbumin	66
Ovalbumin	45
Carboanhydrase	30
Trypsininhibitor	20,1
Lysozym	14,3

Tab. 2.1 Molekulargewichte des Proteinstandards

2.6 Silberfärbung von Proteingelen

Mit Hilfe der Silberfärbung von Gelen nach SDS-PAGE kann unter optimalen Bedingungen bis zu 1 ng Protein pro Bande nachgewiesen werden (Heukeshoven & Dernick, 1985). Die Silberfärbung ist damit sensitiver als die Coomassie-Färbung (s. Kap. 2.7); sie lässt aber keine quantitativen Aussagen zu.

Fixieren:	50% Ethanol, 10% Essigsäure	20 min (optional über Nacht)
Waschen:	10% Ethanol, 5% Essigsäure	10 min
Oxidieren:	0,05% Natriumcarbonat,	1 min
	0,15% Kaliumhexacyanoferrat,	
	0,3% Natriumthiosulfat	

Waschen:	H ₂ O _{deion.}	3x20 min
Färben:	0,012 M Silbernitrat	20 min
Waschen:	H ₂ O _{deion.}	2x5 min
Entwickeln:	3% Natriumcarbonat,	nach Bedarf
	0,02% Formaldehyd	
Stoppen:	1% Essigsäure	10 min

2.7 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Die Coomassie-Färbung erlaubt ebenfalls einen Proteinnachweis nach SDS-PAGE, wobei der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau R-250 unspezifisch an die Proteine bindet. Die Detektionsgrenze liegt bei ca. 0,3 bis 1 μ g pro Bande. Die Anfärbung von Proteingelen wurde wie folgt durchgeführt:

Färben:	45 % Methanol,	30–60 min
	10 % Essigsäure,	
	0,1 % Coomassie Blau R-250	
Entfärben:	10 % Methanol,	nach Bedarf
	10 % Essigsäure	

2.8 Semi-Dry-Western-Blot

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die Proteine nach dem Semi-Dry-Western-Blot-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid- (PVDF-) Membran (Millipore GmbH, Neu Isenburg, Deutschland) mit einer Porengröße von 0,45 µm übertragen werden. Dazu wurde das Gel zuvor 15 min in 1 x Lämmli-Puffer gewaschen (s. Kap. 2.5). Die PVDF-Membran wurde zur Aktivierung in Ethanol getränkt und anschließend zusammen mit sechs Chromatographiepapieren (Whatman 3 MM Chr) ebenfalls in 1 x Lämmli-Puffer geschwenkt. Der Aufbau in der Semi-Dry Electrophoresis Transfer Cell (Biorad, München, Deutschland) wurde wie folgt vorgenommen:

Anode \rightarrow 3 x Whatman \rightarrow PVDF-Membran \rightarrow Gel \rightarrow 3 x Whatman \rightarrow Kathode

Der Transfer erfolgte für 1 h bei 1,5 mA/cm² und maximal 25 V. Die Detektion erfolgte durch einen immunologischen Proteinnachweis (s. Kap. 2.10).
2.9 Dot-Blot

Beim Dot-Blot-Verfahren wird das zu untersuchende Protein direkt unter Vakuum auf die PVDF-Membran aufgebracht. Es wurde eine Apparatur mit 96 Probenkammern (S & S Minifold I, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) verwendet. Auch hier wurde die Membran zunächst durch Schwenken in Ethanol aktiviert und anschließend zusammen mit einem Chromatographiepapier in TBST gewaschen. Der Aufbau bestand aus der unteren Kammer, dem Chromatographiepapier, der Membran und der oberen 96-Lochplatte. In die Probenlöcher wurden zunächst 100 μ I H₂O_{deion.} vorgelegt, in die dann die Proben pipettiert wurden. Unter einem geringen Vakuum wurden die Proben durch die Membran gesogen, wobei es zur Übertragung der Proteine auf die PVDF-Membran kam. Die Detektion erfolgte durch einen immunologischen Proteinnachweis (s. Kap. 2.10). Da der anti-PrP Erstantikörper 3F4 nur denaturiertes Protein erkennt, wurde die Membran vor Durchführung des immunologischen Nachweises für 5 min in 1% Kaliumhydroxid geschwenkt.

2.10 Immunologischer Proteinnachweis

Der immunologische Nachweis von PrP erfolgte mit Hilfe des anti-PrP Erstantikörpers 3F4 (Kascsak et al., 1987). Die nach dem Blot-Verfahren verbleibenden freien Bindeplätze für Proteine auf der PVDF-Membran wurden durch Schwenken der Membran in 5% Milchpulver (w/v) (Oxiod, Hampshire, UK) in TBST-Puffer für 1 h (optional über Nacht) abgesättigt. Die Membran wurde danach kurz in TBST gewaschen und mit dem anti-PrP Erstantikörper 3F4 für 1 h inkubiert. Dann wurde zweimal für 10 min mit TBST gewaschen, um ungebundenen Erstantikörper zu entfernen. Als Detektionsantikörper wurde Peroxidase-gekoppelter Schaf-anti-Maus Anitkörper aus dem ECL-Western-Blot Detection System (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) verwendet. Er wurde in einer Verdünnung von 1:5.000 in TBST eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 30-60 min. Durch anschließendes dreimaliges Waschen für jeweils 5 min wurde ungebundener Antikörper entfernt. Der Nachweis erfolgte durch Chemilumineszenz. Das Detektionsreagenz enthält Luminol, das von der an den Zweitantikörper gebundenen Peroxidase oxidiert wird. Bei dieser Reaktion wird Licht abgegeben (s. Abb. 2.1)



Abb. 2.1 Peroxidase-katalysierte Chemilumineszenzreaktion. Reaktionsmechanismus für den immunologischen Proteinnachweis

Die Lichtemission hält etwa eine Stunde an. Die Membran wurde für 1 min mit dem Detektionsreagenz benetzt, und die Lumineszenz wurde nach 0,5 bis fünfminütiger Expositionszeit mit Röntgenfilmen (Hyperfilm[™] ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) detektiert.

2.11 Löslichkeitsbestimmung durch differentielle Ultrazentrifugation

Die Löslichkeit von Proteinen kann mit Hilfe der Methode nach Hjelmeland & Chrambach (1984) ermittelt werden. Hiernach werden Partikel, die nach Zentrifugation bei 100.000 x g für 1 h im Überstand verbleiben als löslich definiert. Die Zentrifugation erfolgte in der Beckman Optima TM TL Ultrazentrifuge (42.000 rpm im TLA-45 Rotor, Beckman, Palo Alto, USA) bei Probenvolumina von 20 bis maximal 100 µl und 25°C. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet im gleichen Volumen NaPi/0,2% SDS resuspendiert. Der relative Proteingehalt in Überstand und Pellet kann mittels Dot-Blot (s. Kap. 2.9) nachgewiesen werden.

2.12 Circulardichroismus- (CD-) Spektroskopie

Das Messprinzip der CD-Spektroskopie beruht darauf, dass asymmetrische Moleküle unterschiedliche Extinktionskoeffizienten für links- und rechtszirkular polarisiertes Licht aufweisen. Messgröße ist dabei die Differenz der Extinktionskoeffizienten $\Delta \varepsilon = \varepsilon_{L} - \varepsilon_{R}$. Der Unterschied wird meistens in Form der Elliptizität angegeben. Dabei besteht der aus Formel 2.2 ersichtliche Zusammenhang zwischen der Elliptizität θ und der Differenz der Extinktionskoeffizienten $\Delta \varepsilon$.

Formel 2.2

$\theta_{(\lambda)} = \ln 10 \cdot \frac{180}{2} \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot \boldsymbol{c} \cdot \boldsymbol{d}$	mit: θ	= Elliptizität
$\Sigma \pi$	С	= Konzentration
	d	= Schichtdicke

Zu einem CD-Effekt kommt es nur bei chiralen Molekülen, d.h. bei Molekülen deren elektrisches und magnetisches Übergangsdipolmoment nicht genau senkrecht aufeinander stehen. Bei Proteinen wird der CD-Effekt durch die Asymmetrie der Sekundärstrukturelemente, u.a. α -Helix und β -Faltblatt, verursacht. Diese zeigen jeweils unterschiedliche CD-Spektren im fernen UV-Bereich (170-260 nm, s. Abb. 2.2). Durch Messung des CD-Spektrums lässt sich daher durch den Vergleich mit Proteinen oder Modellpeptiden bekannter Struktur auf die relativen Anteile der Sekundärstrukturelemente zurückschließen.



Abb. 2.2 CD-Spektren typischer Sekundärstrukturelemente (nach Greenfield *et al.*, 1969).

Die Messung der Spektren wurde mit dem Spektralpolarimeter J715 (Jasco, Labor- und Datentechnik GmbH, Großumstadt, Deutschland) durchgeführt, welches zu Beginn jeder Messreihe mit Ammonium-d-Campher-10-Sulfat geeicht wurde. Es wurden Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 mm oder Mikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm (Helma, Müllheim, Deutschland) verwendet. Für Messungen mit der 1-mm-Küvette wird ein Probenvolumen von 180 µl mit einer Proteinkonzentration von 50-200 ng/µl benötigt, d.h. 3-12 µM rek PrP. Die Mikroküvette erlaubt auch Messungen bei niedrigeren Proteinkonzentrationen und kleineren Probenvolumina, so dass wesentlich weniger Protein eingesetzt werden konnte (80 µl bei einer minimalen Konzentration von 15 ng/µl, d.h. 0,92 µM). Die Spektren wurden in der 1 mm-Küvette bei 25°C von 195-260 nm bei einer Auflösung von 1 nm, einer Responsezeit von 1-4 s und einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min aufgezeichnet. In den Mikroküvetten ist es unmöglich Messungen unterhalb von 200 nm vorzunehmen. Es wurden jeweils 10-20 Akkumulationen einer Probe gemessen und gemittelt. Jede Messung wurde gegen das entsprechende Pufferspektrum korrigiert. Während der Messung wurde die Probenkammer für Messungen unter 200 nm mit maximal 12 l Stickstoff pro Minute, sonst mit 4-6 l Stickstoff pro Minute gespült.

2.13 Chemischer Crosslink von Proteinen

Mit Hilfe verschiedener chemischer Reagenzien lassen sich kovalente Quervernetzungen von Proteinen oder Proteinkomplexen induzieren. Bei der Wahl geeigneter Bedingungen erfolgt diese Verknüpfung nur innerhalb bereits existierender Komplexe. Es werden dabei nicht-kovalente Wechselwirkungen durch kovalente Bindungen ersetzt, die damit leichter nachgewiesen werden können. (zur Übersicht s. Sinz, 2006)

Der Crosslinker EDC (Pierce, Rockford, USA) (s. Abb. 2.3) bewirkt die Einführung einer Isopeptidbindung zwischen zwei Aminosäureseitenketten innerhalb von Proteinkomplexen. Hierzu reagiert EDC zunächst mit einer Carboxylgruppe eines Aspartat- bzw. Glutamatrestes oder dem C-Terminus, was zur Bildung eines aminoreaktiven Zwischenproduktes, dem O-Acylisoharnstoffester, führt. Wenn eine Aminogruppe sich in räumlicher Nähe befindet, also als Reaktionspartner zur Verfügung steht, entsteht eine Isopeptidbindung zwischen der Säuregruppe und der Aminogruppe. Der Crosslinker geht dabei in veränderter Form aus der Reaktion hervor. Da die eingefügte Bindung direkt zwei Aminosäuren verbindet, spricht man von einem 0 Å-Spacer. Abb. 2.4 veranschaulicht den Reaktionsablauf von EDC.



EDC

Abb. 2.3 Strukturformel von EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimid Hydrochlorid).



Abb. 2.4 Reaktionsmechanismus der Crosslink-Reaktion von EDC.

Zur Aufbewahrung wurde EDC als Feststoff in kleinen Aliquots abgewogen und eingefroren, um eine Anreicherung von Kondenswasser im Gefäß zu verhindern, da dies eine Inaktivierung des Crosslinkers zur Folge haben kann. Direkt vor Beginn der Reaktion wurde durch Zugabe von Wasser eine 20–100 fach konzentrierte Stammlösung angesetzt und davon die gewünschte Menge zum Reaktionsansatz pipettiert. Die Bedingungen für die Crosslink-Reaktion wurden bereits zuvor etabliert (Kaimann, 2002). Es zeigte sich, dass die Reaktion mit einer nur leicht erhöhten EDC-Konzentration auch bei neutralem pH abläuft. Laut Produktbeschreibung ist ein pH-Wert von 4,5–5 ideal. Alle Reaktionen wurden in NaPi mit SDS-Konzentrationen zwischen 0,2 und 0,01% durchgeführt. Es wurden je 0,1 mg/ml PrP (ca. 6 μ M) und 1 mM EDC eingesetzt und der Ansatz für 2 h bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Kochen in Auftragspuffer (5 min, 95°C) gestoppt.

2.14 Tryptische In-Gel-Verdauung

Vor der massenspektrometrischen Analyse müssen die verschiedenen im Reaktionsansatz vorliegenden Protein-Spezies bzw. -Komplexe in einer SDS-PAGE von einander getrennt und in kleine Peptide gespalten werden. Hierzu kann die Methode der tryptischen In-Gel-Verdauung verwendet werden (Shevchenko *et al.*, 1996).

Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Gel dazu zunächst Coomassie-gefärbt (s. Kap. 2.7), um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Die einzelnen Banden wurden danach mit Hilfe eines Skalpells ausgeschnitten, so dass man nur den inneren deutlich angefärbten Teil der Bande erhielt. Diese Gelfragmente wurden nochmals in kleine ca. 1 mm² große Stücke zerteilt und in 0,5-ml-Protein-LoBind-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) überführt. Diese

binden Peptide und Proteine in einem nur sehr geringen Maße, was die Ausbeuten an Peptiden deutlich erhöhte. Um den gebundenen Coomassie-Farbstoff zu entfernen, wurden die Gelstücke mit 25 mM Ambic/50% Acetonitril (v/v) dreimal gewaschen bis die blaue Färbung verschwunden war. Im nächsten Schritt wurden die Gelstücke noch einmal mit 100% Acetonitril überschichtet bis die Gelstücke komplett dehydratisiert waren. Zu erkennen war dies daran, dass die Gelstücke schrumpften und eine opak-weiße Farbe annahmen. Die noch verbliebenen Lösungsmittelreste wurden durch Zentrifugation in einer Vakuum-Zentrifuge für 30 min entfernt.

Um zu verhindern, dass die beiden Cystein-Reste des Prion-Proteins während oder nach der Verdauung zu einer Disulfidbrücke oxidierten, musste eine Alkylierung der Cysteine durch Jodacetamid vorgenommen werden. Hierzu wurden die Gelstücke zunächst in 10 mM DTT (Dithiothreitol)/25 mM Ambic für 45 min bei 56°C inkubiert, um die noch intakten Disulfidbrücken zu reduzieren. Die anschließende Behandlung mit 55 mM Iodacetamid in 25 mM Ambic für 1 h bewirkte die eigentliche Alkylierung zu Carboxyamidomethylcystein. Um die überschüssigen Reagenzien zu entfernen, wurden die Gelstücke nun zweimal abwechselnd mit 25 mM Ambic und 25 mM Ambic/50% Acetonitril (v/v) gewaschen. Vor erneuter Zentrifugation in der Vakuum-Zentrifuge wurden die Gelstücke nochmals mit 100% Acetonitril dehydratisiert.

Die Rehydratisierung erfolgte direkt mit Trypsinlösung (Trypsin Proteomics Grade, Sigma, Saint Louis, USA) einer Konzentration von 0,1 mg/ml in 25 mM Ambic. Die Verdauung wurde durch Inkubation der Proben bei 37°C für 12–16 h erreicht. Die resultierenden Peptide wurden in mehreren Schritten mittels 50% Acetonitril (v/v)/5% Ameisensäure (v/v) aus dem Gel eluiert und in ein neues 0,5-ml-Protein-LoBind-Reaktionsgefäß überführt. Die gesammelten Fraktionen wurden schließlich bis zur Trockne eingeengt und so bis zur Messung bei -20°C gelagert.

2.15 Reversed-phase-Chromatographie für die LC-MS-Kopplung

Peptide können mit der Reversed-phase-Chromatographie nach ihrer Hydrophobizität getrennt werden, wobei hydrophile Moleküle zuerst eluiert werden. Als stationäre Phase werden Kieselgele verwendet, welche für die Peptidauftrennung mit Alkylresten der Länge C₁₈ modifiziert wurden. Die mobile Phase bestand aus einem Wasser/Methanol-Lösungsmittelsystem mit je 0,1% Ameisensäure (v/v). Es wurde eine Nano-HPLC-Anlage (LC Packings, Amsterdam, Niederlande) versehen mit einer µ-guard C₁₈ PepMap-Vorsäule (LC Packings, Amsterdam, Niederlande) zur Probenapplikation und einer Chromolith CapRod C18-Trennsäule (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Peptidelution erfolgte durch einen linearen Methanol/Wasser-Gradienten. Die Methanolkonzentration wurde dabei von 4% auf 96% in 60 min bei einer Flussrate von 25 µl/min ange-Die Nano-reversed-phase-HPLC-Anlage wurde mit dem Mashoben. senspektrometer (s. Kap. 2.16) gekoppelt. Die Peptide werden damit direkt nach Auftrennung der massenspektrometrischen Untersuchung zugeführt. Um ein gleichmäßiges Sprühverhalten für die massenspektrometrische Messung zu garantieren, muss die eingestellte Flussrate so niedrig gewählt sein, dass die Flussrate an der Ionenquelle 200-300 nl/min nicht übersteigt. Dies wurde mit Hilfe eines vorgeschalteten Splitters realisiert, der die hohe Flussrate von 25 µl/min reduzierte, so dass die Flüssigkeitsmenge an der lonenguelle im Nano-Liter-Bereich blieb.

2.16 Massenspektrometrische Analyse von Proteinen und Peptiden

2.16.1 Grundprinzip massenspektrometrischer Messungen

Das Prinzip der Massenspektrometrie ist die Messung des Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) von Gasphase-Ionen. Die Entwicklung sogenannter weicher Ionisationsmethoden, wie die Elektrospray-Ionisation (ESI) durch Fenn *et al.*, 1989, und die matrixunterstützte Laserdesorption-Ionisation (MALDI) durch Karas & Hillenkamp, 1988, ermöglichte erst die Ionisation und Überführung von großen thermolabilen Biomolekülen in die Gasphase, ohne sie zu fragmentieren. Die Massenspektrometrie hat dadurch eine breite Anwendung u.a. in Biochemie, Biotechnologie, Pharmakologie und Medizin erfahren.

2.16.2 Aufbau eines Massenspektrometers

Im Wesentlichen besteht ein Massenspektrometer aus einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Als Ionenquelle kann die Matrixunterstützte Laserdesorption-Ionisation (MALDI) oder die Elektrospray-Ionisation (ESI) verwendet werden. Als Massenanalysator stehen Quadrupole, elektrische Ionenfallen und Flugzeitanalysatoren (TOF, engl.: Time of Flight) zur Verfügung. Als Detektor wird vielfach eine Multi-Channel-Plate eingesetzt. Im Prinzip können diese Elemente frei kombiniert werden.

Durch den Einsatz mehrerer Massenanalysatoren, z.B. Quadrupole und TOF, kann ein sogenanntes MS/MS- oder Tandem-Massenspektrum aufgenommen

werden. Über die Massenanalyse hinaus können somit auch Informationen über die Struktur der zu messenden Ionen erhalten werden (s. Kap. 2.16.4). Abb. 2.5 zeigt den schematischen Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Q-Star XL Elektrospray Quadrupol TOF Massenspektrometers (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).



Abb. 2.5 Schematischer Aufbau des ESI-Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometers.

Mess-Modi

Das Gerät besteht grundsätzlich aus drei Quadrupolen (Q0 – Q2). Für die Messung eines Übersichtsspektrums, auch ESI-MS-Spektrum genannt, dienen die Quadrupole im Wesentlichen der Fokussierung und Stabilisierung des Ionenstroms. Die eigentliche Massenanalyse wird mit dem TOF-Analysator erreicht. Dieser wiederum setzt sich aus dem Beschleuniger (engl.: Pusher) und dem Ionenreflektor zusammen. In diesem Modus werden alle Peptid-Ionen einer Probe in ihrer Gesamtheit (in einem bestimmten m/z-Bereich) analysiert.

In einem zweiten Modus können Fragmentspektren, auch Tandem-Spektren oder ESI-MS/MS-Spektren genannt, einzelner Peptide aufgenommen werden. Für diese Messungen werden Peptid-Ionen mit Hilfe des Quadrupol 1(Q1) aus dem Gesamt-Ionenstrom selektiert. In der Kollisionszelle Q2 werden diese durch einströmendes N₂-Gas fragmentiert und im TOF-Analysator separiert (s. Abb. 2.5). Q0 ist hierbei ein "Hilfs"-Quadrupol und wird nur mit Wechselstrom ohne Gleichstrom-Komponente betrieben. Das bewirkt ein besseres Eintreten der Ionen in den zentralen Ionenweg.

2.16.3 Ionisierungsprinzip der Elektrospray-Ionisation

In der Elektrospray-Ionisation von Peptiden werden diese aus wässriger Lösung in die Gasphase überführt. Die Probe befindet sich dabei in einer platin-überzogenen Glaskapillare mit einem sehr kleinen Innendurchmesser (üblicherweise 3–5 µm). Es handelt sich dabei um eine Nanospray-Kapillare bei der einige Mikroliter für Analysezwecke ausreichen. Zwischen der Kapillare und dem Einlass des Massenspektrometers wird eine Spannung angelegt. Die Peptide liegen in einer sauren Umgebung vor und sind daher positiv geladen. Im Positiv-Modus werden sie damit am Meniskus akkumuliert. Die negativ geladenen Ionen entladen sich dagegen an der Anode. Die Ladungsdichte an der Nadelspitze führt zur Ausbildung des sogenannten Taylor-Konus. Die Abstoßung zwischen den positiven Ionen destabilisiert die Flüssigkeitsoberfläche am Taylor-Konus und es entsteht ein Nebel aus feinen Tröpfchen. Im Falle der LC-MS-Kopplung wird das Eluat der Reversed-phase-Chromatographie direkt durch eine Kapillare der MS-Messung zugeführt (s. Kap. 2.15).

Zumeist enthalten die Probenlösungen auch Anteile an organischen Lösungsmitteln, um das Sprühverhalten zu verbessern. In dieser Arbeit wurden Methanolkonzentrationen von 10-80% eingesetzt. Während die Tröpfchen in Richtung Kathode fliegen, verdunstet das umgebende Lösungsmittel bis schließlich einzelne Gasphase-Ionen entstehen (s. Abb. 2.6).



Abb. 2.6 Schematische Darstellung des Elektrospray-Prozesses (nach Kerbale & Tang 1993).

Der Elektrospray-Prozess führt dazu, dass zumeist mehrfach geladene Peptidlonen entstehen, was bedeutet, dass sich das Peptidsignal auf mehrere Signale mit unterschiedlichen Ladungen aufteilen kann. Etwa pro 1000 Masseneinheiten kann eine Ladung in Peptiden oder Proteinen stabilisiert werden. Bei Proteinen mit Molekulargewichten von 10-100 kDa resultiert das in einer ganzen Reihe von Signalen mit verschiedenen Ladungszuständen. Diese sind meist durch die Vielzahl der Ladungen am Protein bei m/z-Werten unter 2500 zu detektieren. Bei Peptid-Ionen werden je nach Aminosäurezusammensetzung und Größe meist 2-5-fach geladene Ionen erzeugt. Die Ladungszustände der einzelnen Peptid-Ionen können bei ausreichender Auflösung des Massenspektrometers ermittelt werden. Die Auflösung kann als Fähigkeit beschrieben werden, die Masse von Ionen mit ähnlicher, aber nicht identischer, molekularer Masse von einander getrennt zu detektieren. Die Auflösung wird anhand des Verhältnisses der m/z-Werte und der Signal-Breite auf halber Höhe des Signals bestimmt: m/z/ Δ m/z. In Abb. 2.7 ist beispielhaft ein Signal von 1296,69 m/z gezeigt. Δ m/z ist in diesem Fall 0,22 amu³. Das bedeutet, dass die Auflösung in diesem Beispiel 5890 beträgt. Das in dieser Arbeit verwendete Massenspektrometer besitzt eine Auflösung von 10.000.



Abb. 2.7 Definition der Massenauflösung anhand der Signalbreite auf halber Höhe (verändert nach Kinter & Sherman, 2000).

Viele natürlich vorkommende Elemente besitzen schwere Isotope, die sich in der Anzahl der Neutronen im Atomkern unterscheiden. Schwere Isotope von Wasserstoff, Stickstoff und Sauerstoff kommen in der Natur in nur sehr geringen Anteilen vor, weshalb sie in der massenspektrometrischen Proteinanalytik eine eher untergeordnete Rolle spielen. Das Kohlenstoffisotop ¹³C ist mit einem Anteil von etwa 1,11% jedoch relativ häufig. Es kommt natürlicherweise auch in den Peptidmolekülen vor und führt dazu, dass Peptidsignale eine Reihe von distinkten Massen zeigen; das Isotopenmuster (s. Abb. 2.8).

Bei einer hohen Auflösung, wie beispielweise 10.000, kann anhand dieses Isotopenmusters der Ladungszustand des Peptids ermittelt werden. Als monoisotopische Masse eines Elements bezeichnet man die Masse des leichtesten sta-

³ amu (engl.: atomic mass unit) ist die Einheit für m/z

bilsten Isotops. Messgröße ist, wie oben erwähnt, das Masse-Ladungs-Verhältnis. Die Massendifferenz zwischen den Isotopen beträgt 1.0 Da (Einbau eines ¹³C-Atoms). Daraus lässt sich ableiten, dass es sich bei einer m/z-Differenz der Isotopensignale von 1 um ein einfach geladenes bzw. bei einer Differenz von 0,5 um ein zweifach geladenes Ion handeln muss usw. (s. Abb. 2.8):

 $[M+1H]^{+}-Ion 1/1 = 1$ $[M+2H]^{2+}-Ion 1/2 = 0,5.$



Abb. 2.8 Isotopenverteilung von doppelt und dreifach geladenen Ionen. Gezeigt sind hier zwei bei Verdauung mit Trypsin entstandene Peptide des rekombinanten Prion-Proteins.

Die Höhe der jeweiligen Isotopenverteilung ist ebenfalls von Bedeutung. Bei Peptiden von Massen bis 1500-1700 Da ist das monoisotopische Signal im Allgemeinen das intensivste. Oberhalb dieses Massenbereichs ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein einzelnes Peptidmolekül mindestens ein ¹³C-Isotop enthält, größer, was dazu führt, dass die Intensität des zweiten Signals zunimmt (Jonsson, 2001).

2.16.4 Bestimmung der Primärstruktur von Peptiden mittels Tandem-Massenspektrometrie

In Kap. 2.16.2 wurde bereits erwähnt, dass sich mit Hilfe der sogenannten Tandem-Massenspektrometrie oder ESI-MS/MS-Messung neben der Masse auch Strukturinformationen der zu untersuchenden Ionen (hier Peptide) gewinnen lassen. Dies bezieht sich insbesondere auf die Primärstruktur der Peptid-Ionen. Zudem lassen sich jedoch auch in vielen Fällen die Natur und Lage von posttranslationalen Modifikationen bestimmen. Wie in Kap. 2.16.2 erläutert, werden aus dem Gesamt-Ionenstrom einzelne Peptid-Ionen zunächst selektiert und anschließend mit Hilfe einströmenden N2-Gases fragmentiert. Aus den Kollisionen zwischen Gas- und Peptidmolekülen resultiert eine Aktivierung der Peptidmoleküle, welche zur Fragmentierung der Peptide führt. Es werden im Allgemeinen Kollisionsenergien von 10-100 eV verwendet. Diese sind relativ niedrig und verhindern, dass die Moleküle zu stark fragmentieren. Unter diesen Bedingungen zerfallen die Peptide bevorzugt an der Peptidbindung. MS/MS-Spektren zeigen eine Verteilung der entstandenen Fragment-Ionen des selektierten Peptid-Ions. Tragen diese Fragmente die Ladung an der Nterminalen Seite der Bruchstelle, werden sie als B-Ionen bezeichnet; tragen sie sie an der C-terminalen Seite, heißen sie Y-Ionen (Roepstorff et al., 1984). Tryptische Peptide tragen am C-Terminus, bedingt durch die Spezifität der tryptischen Verdauung, basische Aminosäuren (Arginin oder Lysin). Das bedeutet, dass durch die Fragmentierung bevorzugt Y-Ionen entstehen; Blonen werden jedoch ebenfalls detektiert (s. Abb. 2.9). Bei hochenergetischen Stößen kann die Fragmentierung auch an anderen Stellen im Peptidmolekül erfolgen, was zu X- Z- bzw. A- und C-lonen führt.



Abb. 2.9 Nomenklatur von Peptid-Fragmenten. Die Benennung wurde durch Roepstorff *et al.* (1984) und Johnson *et al.* (1988) etabliert.

Es wird angenommen, dass unter den oben genannten Niedrig-Energie-Bedingungen die Fragmentierung durch die Ladung der Peptide vermittelt wird. Dies gründet auf dem Vorhandensein eines mobilen Protons, dass den Spaltungsprozess initiiert. Befinden sich mehr Protonen an einem Peptid als basische Aminosäuren vorhanden sind, erfolgt die Spaltung an den Peptidbindungen, an denen sich das mobile Proton befindet, also entweder am Carbonylsauerstoff oder am Amidstickstoff. Bei der Elektrospray-Ionisation werden zumeist mehrfach geladene Ionen erzeugt. Das bedeutet, dass auch die Fragment-Ionen mehrere Ladungen tragen können bzw. sich die Ladungen auf die Fragmente aufteilen. Bei der Spaltung an einer Stelle kann demnach entweder nur eines oder beide entstandenen Fragmente sichtbar sein, abhängig davon, ob beide eine Ladung tragen oder nur eines. Der Prozess der Fragmentierung ist in Abb. 2.10 schematisch dargestellt.



Abb. 2.10 Schematische Darstellung der Spaltung von Peptiden an der Amidbindung (nach Jonsson, 2001).

Im Idealfall sind alle denkbaren Y-Ionen im MS/MS-Spektrum eines Peptides enthalten. In dem Falle kann aus den Massendifferenzen zwischen den Signalen dieser Y-Serie die Aminosäuresequenz bestimmt werden (vgl. Kap. 3.3.1). Auch das Auffinden einer Teilsequenz kann hilfreich sein. Bei unbekannten Proteinen kann die Identifizierung durch Suchen eines solchen "Sequence-tags" in einer Protein- oder Nukleinsäuredatenbank erfolgen. Ist die Proteinsequenz bekannt, reichen auch hier meist einige Aminosäuren aus, um eine Zuordnung zu einem bestimmten Fragment zu machen. Durch den Vergleich der theoretischen mit der gemessenen Masse in Kombination mit einem "Sequence-tag" ist das Peptid dann eindeutig identifiziert. Bei bekannter Aminosäuresequenz kann nach ähnlichem Prinzip auch nach posttranslationalen oder chemischen Modifikationen gesucht werden.

Die Sequenzierung von Proteinen mittels ESI-MS/MS wird in der Regel nach folgendem Ablauf durchgeführt:



2.17 Selektive Acetylierung N-terminaler Aminogruppen durch Jodessigsäureanhydrid

Zur gezielten Modifizierung N-terminaler Aminogruppen wurde die Acetylierungs-Methode nach Wetzel *et al.* (1990) in leicht veränderter Form verwendet. Mit Hilfe von Jodessigsäureanhydrid lassen sich danach ungeschützte α -Aminogruppen bei neutralem pH-Wert zu 90-98% selektiv acetylieren. Hierfür wird der Unterschied der pK_a-Werte der α -Aminogruppen und der ϵ -Aminogruppen in Lysin bzw. der Aminogruppen in Arginin ausgenutzt. Für die α -Aminogruppen beträgt der pK_a-Wert ca. 8,0, wohingegen die Aminogruppen der Seitenketten von Lysin und Arginin Werte von ca. 10,5 bzw. 12 aufweisen. Nur die nicht protonierte Form besitzt eine Reaktivität gegenüber Jodessigsäureanhydrid. Bei neutralem pH-Wert (6–7,2) läuft demnach die Reaktion der α -Aminogruppe wesentlich schneller ab, als die der Seitenketten-Aminogruppen, da letztere bei diesem pH-Wert einen sehr viel geringeren Anteil an nicht protonierten Aminogruppen besitzen. Um die vorzeitige Hydrolyse von Jodessigsäureanhydrid zu verhindern, wurde eine Stammlösung mit einer Endkonzentration von 350 mM mit wasserfreiem Tetrahydrofuran in einer Argon-Atmosphäre angesetzt und in kleinen Aliquots auf Silicagel bei -20°C gelagert. Die Schutzgas-Atmosphäre wurde durch Durchfluss von trockenem Argon-Gas durch eine sogenannte "Glove-Box" erzeugt. Zur Reaktion wurde eine Protein-Konzentration von 1 mg/ml in 0,2% SDS/50 mM NaPi eingestellt. Auf Eis und unter einem Argon-Strom wurde der Proteinlösung zweimalig 1/100 des Volumens an Jodessigsäureanhydrid zugesetzt und jeweils für 3 min unter direktem Schütteln inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden entweder durch eine SDS-PAGE isoliert und tryptisch verdaut (s. Kap. 2.14) oder direkt als Volllängen-Protein mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert (s. Kap. 2.16).

2.18 Modell-Erstellung des PrP-Dimers

Die in dieser Arbeit gezeigten Modelle wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje und Frau Birte Brandt im Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf angefertigt.

Zur Erzeugung eines PrP-Dimermodells wurde zunächst ein Modell für das Monomer von PrP(90-231) erstellt. Hierzu wurde als Startstruktur die NMR-Struktur nach Liu et al. (1999) aus der RSCB-Protein-Data-Bank-Datei 1B10.pdb verwendet. Mit Hilfe des "Loopsearch"-Modules des Programms Sybyl7.1 (Tripos Inc., 1969 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA) wurde anschließend für den Bereich G90-G124 eine mögliche Struktur gesucht mit der Vorgabe, dass sich zwischen G90 und E152 eine Isopeptidbindung befindet. In darauf folgenden Molekül-Dynamik-Simulationen (MDS) mit Hilfe des Programms Gromacs3.3 (Lindahl et al., 2001) wurde unter physiologischen Bedingungen, sprich 6641 Wassermolekülen und 15 Na⁺- und 22 Cl⁻-Molekülen die Stabilität des neuen Modells überprüft. Dazu wurden die ersten 500 ps mit Rückhaltekräften (positions restraints: posre) von 1000 kJ mol⁻¹ nm⁻² auf das Peptidrückgrad, die folgenden 500 ps mit posre von 500 kJ mol⁻¹ nm⁻² und für 2000 ps ohne Rückhaltekräfte simuliert. Anschließend wurde die Isopeptidbindung gelöst und die freie Dynamik für weitere 4000 ps fortgeführt. Über den Bereich 3000-4000 ps wurde eine Durchschnittsstruktur ermittelt, die dann zur Erstellung eines PrP-Dimers verwendet wurde.

Zwei dieser Monomere wurden manuell mit dem Programm Sybyl7.1 so platziert, dass G90 und E152 (jeweils des Monomers A und des Monomers B) auf der Oberfläche einer gemeinsamen Seite liegen, um eine intermolekulare Verknüpfung zu ermöglichen. Anschließend wurden wiederum MDS durchgeführt unter physiologischen Bedingungen mit 10399 Wassermolekülen, 23 Na⁺- und 35 Cl⁻-Molekülen. Die ersten 500 ps wurden mit posre von 1000 auf das Peptidrückgrad, die nächsten 500 ps mit 500 und weitere 4000 ps ohne Rückhaltekräfte simuliert. Aus den letzten Simulationen wurde eine Struktur ausgewählt, bei der der Abstand von G90 und E152 etwa 10 Å betrug. Mittels "distance constraints" wurde nun eine Annäherung der NH₃-Gruppe von G90 und der COO⁻-Gruppe von E152 über einen Zeitraum von 1350 ps bis auf einen Abstand von 3,5 Å schrittweise erzielt. Während der nachfolgenden MD-Simulation wurden die Rückhaltekräfte auf das Peptidrückgrad über einen Zeitraum von 5200 ps schrittweise reduziert, so dass in den letzten 6500-14000 ps keine Rückhaltekräfte mehr auf das Molekül wirkten. Aus den Simulationen wurde die Gesamtwechselwirkungsenergie, die sich aus der Summe der Coulomb-Energie und der Lennard-Jones-Energie ergibt, bestimmt. Zudem wurde eine Auswertung der Abstände der beiden zuvor angenäherten Aminogruppen während der freien MDS durchgeführt.

3 Ergebnisse

Das zentrale Ereignis der Prion-Krankheiten ist die strukturelle Umwandlung des zellulären Prion-Proteins (PrP^C) in die infektiöse Isoform (PrP^{Sc}). Mit einem *in-vitro*-Konversionssystem kann dieser Strukturübergang von α -helikalem, löslichem, PrP^C-ähnlichem PrP hin zu β-faltblattreichem, aggregiertem, PrP^{SC}-ähnlichem PrP induziert werden (Post et al., 1998). Die Umwandlung wird dabei durch Konzentrationsänderungen von Natriumdodecylsulfat (SDS) im submizellaren Bereich herbeigeführt (s. Kap. 1.7). Die löslichen Intermediate dieses strukturellen Übergangs, darunter α -helikale Dimere, wurden bereits identifiziert (Jansen et al., 2001; Jansen, 2002). Dimere stellen das erste stabile Intermediat des Konversionsprozesses dar. Eine strukturelle Analyse in Bezug auf die Tertiär- und Quartärstruktur dieser Dimere kann daher entscheidend zur mechanistischen Aufklärung des gesamten Konversionsprozesses beitragen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Charakterisierung der PrP-Dimere zu diesem Zweck auf die Identifizierung der beteiligten Wechselwirkungen ausgeweitet, um Informationen zur Tertiär- und Quartärstruktur und damit auf den Mechanismus der Dimer-Bildung zu erlangen.

Die experimentellen Grundlagen in Verbindung mit dem Konversionssystems und speziell im Zusammenhang mit der Dimer-Bildung wurden im Rahmen dieser Arbeit unabhängig reproduziert und werden im folgenden Kapitel (Kap. 3.1) zusammenfassend dargestellt.

3.1 In vitro Konversion von rek PrP(90-231) in Anwesenheit von SDS als experimentelle Grundlage für Crosslink-Studien

Die Konformationsänderung von α -helikalem zu β -faltblatt-reichem rek PrP(90-231) wurde durch Circulardichroismus- (CD-)Spektroskopie verfolgt. Da mit der CD-Spektroskopie nicht zwischen den verschiedenen Formen von β -Faltblatt-Strukturen, wie z.B. paralleles oder anti-paralleles β -Faltblatt und β -Helix, unterschieden werden kann, wird hierfür nachfolgend der Begriff β -strukturiert verwendet.

Um PrP löslich und in monomerer Form zu halten, wurde es auf 0,2% (w/v) SDS in 10 mM NaPi bei pH 7,2 eingestellt. Durch Reduktion der SDS-Konzentration können schrittweise α -helikale Dimere, β -strukturierte Oligomere und schließlich β -strukturierte amorphe Aggregate erzeugt werden (Post *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 2001). Diese Di- und Oligomere als Zwischenstufen der Konversion wurden über verschiedene Methoden, wie Größenausschlusschromatographie, analytische Ultrazentrifugation und

chemische Crosslinks nachgewiesen (Jansen, 2002). In Abb. 3.1 sind exemplarisch CD-Spektren dargestellt, anhand derer der oben genannte Umfaltungsprozess von α -helikalem zu β -strukturiertem rek PrP ermittelt wurde.



Abb. 3.1 Circulardichroismus-Messungen von rek PrP(90-231) zum Nachweis des Strukturübergangs von α -helikalem zu β -strukturiertem PrP. Die Proben wurden auf die entsprechenden SDS-Konzentrationen in 10 mM NaPi pH 7,2 eingestellt und für 24 h bei 25°C vor Beginn der Messung inkubiert.

Bei 0,2% SDS weist das CD-Spektrum von rek PrP(90-231) ein Maximum bei 189 nm, sowie ein sehr ausgeprägtes Minimum bei 205 nm und ein schwächeres bei 222 nm auf. Hierbei ist das Minimum bei 205 nm im Vergleich zu reinen α -Helix-Spektren, bei denen das Minimum bei etwa 207 nm zu erwarten ist. leicht zu kürzeren Wellenlängen hin verschoben. Zusammen mit der Intensitätszunahme des Minimums bei 205 nm und der Intensitätsabnahme des Minimums bei 222 nm im Vergleich zu reinen α -Helix-Spektren, lässt dies auf eine vorwiegend α -helikale Struktur mit einem leicht erhöhten Anteil an Random-coil-Struktur schließen. Bei Abnahme der SDS-Konzentration nimmt der Anteil an α -Helix zu, was an den Spektren der SDS-Konzentrationen von 0,055% und 0,07% und hier besonders an der Intensitätsangleichung der beiden Minima abzulesen ist. In diesem SDS-Konzentrationsbereich liegt PrP als Dimer vor (Jansen, 2002). Bei SDS-Konzentrationen unterhalb von etwa 0,055% tritt der oben erwähnte Strukturübergang ein. Der erhöhte β-Struktur-Anteil ist hier in Abb. 3.1 im Spektrum bei 0,04% SDS an dem Minimum bei 218 nm abzulesen. Der Strukturübergang von α -helikal zu β -strukturiert wird zudem auch an der Verschiebung des Nulldurchgangs zu längeren Wellenlängen hin deutlich. Bei 0,01% SDS ist eine leichte Verschiebung des Minimums, sowie des Nulldurchgangs, zu längeren Wellenlängen hin zu beobachten, wie es für aggregierte Proteine typisch ist. Bei vollständiger Unlöslichkeit sollte die Signalintensität jedoch deutlicher abnehmen.

Der Übersicht halber kann zur Darstellung des Konformationsübergangs der Quotient der Θ -Werte bei 218 nm und 207 nm herangezogen werden. β -Struktur-Spektren besitzen bei 218 nm ein lokales Minimum; α -Helix-Spektren weisen ein Minimum bei 207 nm auf, so dass der Quotient der CD-Signale bei diesen Wellenlängen die relativen Anteile der Sekundärstrukturen widerspiegelt. Hohe Werte deuten auf einen erhöhten β -Strukturanteil hin; bei kleineren Werten überwiegt der α -Helix-Anteil. In Abb. 3.2 ist der Quotient $\Theta_{218 \text{ nm}}/\Theta_{207 \text{ nm}}$ der einzelnen Proben gegen die SDS-Konzentration aufgetragen. In dieser Art der Darstellung ist deutlich zu erkennen, dass der Strukturübergang zwischen 0,055% und 0,04% SDS stattfindet.



Abb. 3.2 Darstellung des Strukturübergangs des Prion-Proteins anhand der Quotienten der CD-Signale bei 218 und 207 nm in Abhängigkeit von der SDS-Konzentration.

Zur Untersuchung der Löslichkeit von PrP bei den verschiedenen SDS-Konzentrationen wurde die Methode der differentiellen Ultrazentrifugation (s. Kap. 2.11) verwendet. Die anschließende Analyse der Pellet- und Überstand-Fraktionen einiger Proben mittels Dot-Blot ist in Abb. 3.3 dargestellt.



Abb. 3.3 Dot-Blot nach differentieller Ultrazentrifugation 1 h, 100.000 x g zur Analyse des Löslichkeitszustandes von rek PrP bei verschiedenen SDS-Konzentrationen. Die Proben wurden 24 h vorinkubiert. Ü: Überstand P: Pellet

Es ist zu sehen, dass erst bei 0,02% SDS der überwiegende Teil des PrP unlöslich geworden ist und damit im Pellet zu detektieren ist. Der Strukturübergang hin zu erhöhtem β -Struktur-Anteil ist jedoch schon bei 0,045-0,04% SDS vollzogen (Abb. 3.2). Unter diesen Bedingungen bildet PrP ein lösliches β strukturiertes Oligomer aus etwa 12-16 PrP-Molekülen, wie mittels analytischer Ultrazentrifugation bestimmt werden konnte (Jansen, 2002). Erst bei 0,01% SDS ist PrP derart aggregiert, dass es vollständig in der Pellet-Fraktion nachzuweisen ist.

3.2 Strukturanalyse durch chemisches Crosslinking mit EDC

Chemische Quervernetzung, allgemein auch Crosslinking genannt, kommt häufig in der Analyse von Protein-Liganden-Wechslwirkungen zum Einsatz (vgl. Kap. 4.1) und kann in Verbindung mit einer massenspektrometrischen Analyse der vernetzten Proteine auch zu einer strukturellen Untersuchung von Proteinen eingesetzt werden. Die Identifizierung der Quervernetzungsstellen durch die massenspektrometrische Analyse liefert dabei Informationen zur Anordnung der jeweiligen Aminosäuren in der dreidimensionalen Struktur eines Proteins oder Proteinkomplexes. Die verschiedenen zur Auswahl stehenden Crosslinker unterscheiden sich vor allem in ihren Reaktivitäten und den mit ihnen überbrückbaren Distanzen. Viele Crosslinker sind dabei homobifunktional und verbinden jeweils Aminogruppen miteinander. Die meisten Crosslinker fügen bei der Quervernetzung zudem einen Spacer von definierter Länge ein, so dass auf die Abstände der vernetzten Aminosäuren zurückgeschlossen werden kann. Der Crosslinker EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimid Hydrochlorid) ist das einzig bekannte Reagenz dieser Art, das die Bildung einer Isopeptidbindung zwischen Carboxyl- und Aminogruppen in Proteinen vermittelt. Es wird demnach kein Spacer eingefügt. Die reagierenden Aminosäuren müssen in sehr kurzer Distanz zueinander liegen, d.h. nur wenige Å, um eine Reaktion zu erlauben. Mit der Aufklärung der Crosslink-Positionen lassen sich somit Distanz-Informationen über den Nahbereich in Proteinen gewinnen (Kunkel et al., 1981).

Die intermediären Zwischenstufen der Konversion von PrP, die durch die verschiedenen SDS-Konzentrationen stabil eingestellt werden können, lassen sich, wie in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte (Kaimann, 2002; Jansen, 2002), mit Hilfe von EDC kovalent verknüpfen. Zur Quervernetzung von Glutamat- bzw. Aspartatgruppen mit in der Nähe befindlichen Aminogruppen, aktiviert EDC in einem ersten Schritt die Säuregruppe, so dass es im nächsten Schritt zur Reaktion mit einem Nukleophil, in Proteinen zumeist die Aminogruppen, kommen kann. Ist keine freie Aminogruppe in der Nähe, reagiert EDC in den meisten Fällen mit Wasser ab. Die Säuregruppe wird dann wieder freigesetzt (s. Kap. 2.13).

Durch das Crosslinking werden die im Ansatz befindlichen Di- und Oligomere größtenteils kovalent verknüpft. Auch wird immer ein gewisser Teil der Komplexe nicht intermolekular sondern intramolekular vernetzt, so dass sich in der Probe sowohl intramolekular vernetzte Monomere als auch die intermolekular vernetzten Komplexe befinden. Um eine gezielte Analyse durchführen zu können, müssen die jeweiligen Spezies voneinander isoliert werden. Die PrP-Mono-, Di- und Oligomere wurden gelelektrophoretisch mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abb. 3.4).

PrP liegt, wie bereits erwähnt, bei SDS-Konzentrationen von ca. 0,07-0,055% in dimerer Form vor (Jansen, 2002) und läuft unter diesen Bedingungen nach Quervernetzung demnach bei 32 kDa in der SDS-PAGE. PrP-Monomere laufen dagegen bei 16 kDa. In Abb. 3.4 ist zu sehen, dass 50% des PrP als kovalent vernetztes Dimer nach einer Silberfärbung detektiert werden konnte. Eine Steigerung der Ausbeute an vernetzten Dimeren über diesen Anteil hinaus konnte nicht erreicht werden, auch wenn unter den gegebenen Bedingungen PrP nahezu vollständig als Dimer vorliegt (Jansen, 2002). Selbst durch eine Erhöhung der Crosslinker-Konzentrationen konnte die verbleibende Monomerbande nicht weiter reduziert werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Phänomen wird in Kap. 4.2.3 näher diskutiert.

Ab ca. 0,045% SDS werden auch Trimer- und Tetramerbanden im Gel sichtbar, die durch eine teilweise Vernetzung der unter diesen Bedingungen vorliegenden Oligomere zu erklären sind. Ab etwa 0,03% SDS ist zu erkennen, dass größere Aggregate kovalent verknüpft wurden, die selbst das Sammelgel im oberen Bereich des Gels z.T. nicht passieren konnten. Bei noch geringeren SDS-Konzentrationen nimmt dieser Effekt wieder ab, was vermutlich darin begründet liegt, dass die Aggregate bei 0,01% SDS so groß sind, dass EDC nicht alle Monomereinheiten, besonders im Inneren der Aggregate, vernetzen konnte. Die Monomerbande ist bei 0,01% SDS im Vergleich zu den höheren SDS-Konzentrationen auch wieder intensiver, was diese Vermutung zudem stützt.



Abb. 3.4Analyse der quervernetzten PrP-Mono-, Di- und Oligomere bei verschiede-
nen SDS-Konzentrationen mit SDS-PAGE und anschließender Silberfär-
bung. Die Sekundärstruktur wurde mittels CD-Spektroskopie bestimmt. α:
α-Helix-dominiert, β: β-Struktur-dominiert. Reaktionsbedingungen sind in
Kap. 2.13 detailliert beschrieben.

Bei 0,2% SDS liegt PrP als Monomer vor (Jansen, 2002), so dass hier nach Crosslinking, wie erwartet, auch nur eine Monomerbande bei 16 kDa detektiert wurde. Es konnte demnach davon ausgegangen werden, dass bei den gewählten Crosslink-Bedingungen tatsächlich der vorliegende Zustand der PrP-Moleküle festgehalten und PrP nicht unspezifisch zu höheren Komplexen vernetzt wird. Insgesamt ist jedoch auffällig, dass besonders bei den höheren SDS-Konzentrationen sowohl die Monomer- als auch die Dimerbanden deutlich verbreitert sind. Dies ist vermutlich auf die internen Crosslinks zurückzuführen (vgl. Kap. 4.2.3).

3.3 Ermittlung der Crosslink-Positionen in PrP-Dimeren und –Monomeren

Zur Ermittlung der Crosslink-Positionen in PrP-Di- und -Monomeren mit Hilfe der Massenspektrometrie muss ein Vergleich der drei folgenden Proben gezogen werden. Zum einen muss parallel je eine Probe an quervernetztem Monomer (EDC-Monomer) und quervernetztem Dimer (EDC-Dimer) untersucht werden, um zwischen intra- und intermolekularen Vernetzungen differenzieren zu können. Zum anderen muss eine unbehandelte Kontroll-Probe (Monomer-Kontrolle) analysiert werden, um den Zustand vor der Crosslink-Reaktion zu bestimmen.

Da die maximale Ausbeute an kovalent verknüpften Dimeren ca. 50% betrug, lagen in den Reaktionsansätzen sowohl EDC-Monomere als auch EDC-Dimere vor. Durch eine vorherige Isolierung der vernetzten Di- und Monomere ergab sich so die Möglichkeit, diese separat voneinander zu analysieren. Diese Analyse liefert Informationen über intra- und intermolekulare Wechselwirkung bei gleichen Lösungs-Bedingungen. Um die Vernetzungspositionen aufzuklären, müssen die Proteine nach der Isolierung zunächst in kleine Peptide gespalten werden, die dann massenspektrometrisch nachgewiesen und identifiziert werden müssen. Der Vergleich der MS-Messungen der Kontroll-Proben mit denen der Crosslink-Proben liefert dabei erste Hinweise auf mögliche Crosslink-Peptide. Sind dabei Peptide nur in der EDC-Monomer-Probe zu finden, nicht aber in der Kontrolle, deutet dies auf intramolekular vernetzte Peptide hin. Bei Peptiden, die nur in den EDC-Dimer-Proben zu detektieren sind, muss es sich folglich um intermolekular verknüpfte Peptide handeln. An den durch die Crosslink-Reaktion gebildeten Isopeptidbindungen können, wie bereits erläutert, nur vorherige nicht-kovalente Wechselwirkungen beteiligt sein. Um deren exakte Aminosäurepositionen bestimmen zu können, muss jedoch eine Sequenzierung der Peptide erfolgen, die z.B. massenspektrometrisch durchgeführt werden kann. Jansen (2002) hatte bereits erste Versuche in dieser Richtung unternommen. Es wurde hier die Methode der tryptischen Verdauung mit anschließender massenspektrometrischer Analyse der entstandenen Peptide angewendet. In dieser Arbeit konnte jedoch kein direkter Nachweis der Crosslink-Positionen erbracht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methodik daher optimiert und Alternativen überprüft. Durch die zusätzliche Verwendung neuer Analysemethoden sollten die Quervernetzungen in dieser Arbeit eindeutig und direkt nachgewiesen werden.

3.3.1 Direkte (statische) massenspektrometrische Analyse tryptischer Peptide von rek PrP nach In-Gel-Verdauung

Die Isolierung von EDC-Dimeren, EDC-Monomeren und Monomer-Kontrollen wurde in dieser Arbeit durch eine SDS-PAGE, wie sie in Abb. 3.4 dargestellt ist, erreicht. In der vorangegangenen Arbeit wurden die einzelnen PrP-Proben, um sie einer weiteren Untersuchung zuführen zu können, durch eine sehr verlust-reiche und aufwendige Gelelution aus dem Polyacrylamid-Gel wiedergewonnen. Die tryptische Verdauung wurde nach einer Aufkonzentrierung der nach Gelelution musste ein Verlust von meist mehr als 50% der Ausgangsmenge an PrP hingenommen werden. Zudem musste ein Pufferwechsel vorgenommen werden, um geeignete Bedingungen für die Verdauung und die anschließende massenspektrometrische Messung zu gewährleisten. Nach Gelelution lagen die

einzelnen Proben in 10 mM NaPi pH 7,2 mit einer SDS-Konzentration von mindestens 0,025% vor, da es bei der Gelelution zu einer leichten Aufkonzentrierung von SDS kommt. MS-Messungen werden durch SDS, das an die Peptide bindet, stark negativ beeinflusst, so dass SDS von den Peptiden zuvor entfernt werden musste. Um PrP erstens in Lösung zu halten, es zweitens für eine In-Lösungs-Verdauung zu denaturieren und drittens, um das SDS zu entfernen, wurde ein Pufferwechsel zu 6 M Harnstoff durchgeführt. Harnstoff liegt jedoch im Gleichgewicht mit Ammoniumcyanat vor und die daraus entstehende Isocyansäure kann zur Carbamylierung der Aminogruppen in Proteinen führen. Diese Modifikation führt zu einer Aufteilung des betreffenden Peptid-Signals in den MS-Übersichtsspektren auf mehrere Signale, so dass eine Identifikation erschwert wird. Um diese Problematik zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit statt der In-Lösungs-Verdauung die Methode der tryptischen In-Gel-Verdauung angewendet (Shevchenko et al., 1996; s. Kap. 2.14). Diese Methodik bietet einige Vorteile im Vergleich zu einer In-Lösungs-Verdauung. Die Verdauung wird hier direkt in den isolierten, zuvor Coomassie-gefärbten, Gelbanden vorgenommen, so dass eine vorherige Wiedergewinnung überflüssig ist. Die resultierenden Peptide werden aus dem Gel mit Hilfe von Acetonitril und Ameisensäure eluiert. Da sowohl Acetonitril als auch Ameisensäure flüchtig sind, enthalten die Proben nach Lyophilisation kaum weitere störende Agenzien. Zudem kann auf die Zugabe von Harnstoff verzichtet werden, so dass die Carbamylierung unterbunden wird.

Für einen Vergleich der drei oben genannten Proben mussten zunächst die Kontroll-Proben mittels Massenspektrometrie detailliert analysiert werden. Um Unterschiede in den verschiedenen Proben nachweisen zu können, ist eine vollständige Sequenzabdeckung notwendig, d.h. es müssen möglichst alle tryptischen Peptide in den Kontrollen auch eindeutig nachzuweisen sein.

Salze können durch Anlagerung an Peptide die MS-Messung ebenso wie SDS negativ beeinflussen. Da die nach In-Gel-Verdauung erhaltenen Peptid-Proben noch Salze aus der Präparation enthielten, wurden diese durch eine Mikroreversed-phase-Chromatographie mit Hilfe von ZipTips[®]-Pipettenspitzen entfernt. Zusätzlich erlaubt diese Methode eine fraktionierte Elution der Peptide bei verschiedenen Methanolkonzentrationen. Üblicherweise werden alle Peptide zusammen bei 60-80% Methanol eluiert. Dies führt, aufgrund der Menge an Peptiden, zu sehr komplexen MS-Spektren. Zudem beeinflussen sich die verschiedenen Peptide untereinander, so dass es zu Signalunterdrückungen und Überlagerungen kommen kann. Um diese Schwierigkeiten sowie die Komplexität zu reduzieren, kann es daher sinnvoll sein, fraktioniert zu eluieren. Für die hier durchgeführten Messungen stellte sich eine fraktionierte Elution bei 10% Methanol mit anschließender Elution bei 60% Methanol als geeignet heraus. In Abb. 3.5 sind MS-Übersichtsspektren einer typischen Monomer-Kontrolle dargestellt. Die Peptid-Signale 11 (m/z=274,7²⁺) und 6 (m/z=332,21²⁺) konnten dabei nur in den Fraktionen bei 10% Methanol detektiert werden. Alle anderen Peptid-Signale wurden in der 60%-Methanol-Fraktion detektiert.

Anhand der Masse eines detektierten Signals kann eine erste Zuordnung zu bestimmten Peptiden vorgenommen werden. Die Isotopenmuster erlauben dabei die Bestimmung des Ladungszustandes, so dass auf die tatsächliche Masse des Peptides zurückgerechnet werden kann (vgl. Kap. 2.16.3). Die Signale in Abb. 3.5 wurden so PrP-Peptiden zugeordnet und sind mit ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis, dem Ladungszustand und der Peptidnummer gekennzeichnet. Die Intensität der Signale ist dabei stark abhängig von der Ionisierbarkeit der einzelnen Peptide, so dass sich trotz gleicher oder ähnlicher Konzentration die Intensitäten der hier markierten Signale erheblich unterschieden.



Abb. 3.5 ESI-MS-Übersichtsspektren der Monomer-Kontrolle. Gezeigt sind Spektren bei verschiedenen m/z-Bereichen. Die intensivsten Signale der PrP-Peptide sind mit ihrem Masse-Ladungs-Verhältnis und dem Ladungszustand gekennzeichnet. Die Signalnummerierung ist identisch mit der Zuordnung in Tab. 3.1.

Alleine aufgrund dieser detektierten Masse können die PrP-Peptide jedoch nicht eindeutig identifiziert werden. Hierzu muss eine Sequenzierung der Peptide anhand von ESI-MS/MS-Spektren (Tandem-Spektren) vorgenommen werden. Dabei werden die entsprechenden Peptid-Signale, die sogenannten Vorläuferlonen, im Massenspektrometer selektiert und in der Kollisionszelle fragmentiert. Anhand der Fragment-Ionen können dann die Aminosäuresequenz und mögliche Modifikationen exakt bestimmt werden. In Abb. 3.6 sind beispielhaft ESI- MS/MS-Spektren der zwei PrP-Peptid-Ionen, PrP137-148 und PrP194-205, gezeigt. Die Abstände der Fragment-Signale entsprechen den Massen der im Peptid enthaltenen Aminosäuren, so dass anhand dieser Signale die Peptide sequenziert und identifiziert werden konnten. Hier sind nur die Y-Ionen, also die C-terminalen Fragment-Ionen, dargestellt. Alle weiteren PrP-Peptide wurden in gleicher Weise eindeutig identifiziert. Es konnte eine Sequenzabdeckung von rund 96% erreicht werden.



Abb. 3.6 ESI-MS/MS-Spektren zweier Peptid-Signale: 512,29³⁺ (oben) und 577,35²⁺ (unten). Die Zuordnung zu PrP137-148 bzw. PrP195-204 wurde anhand der Fragment-Ionen vorgenommen. C-t: C-terminale Aminosäure.

Lediglich Peptid 2, sprich PrP107-110, konnte in keiner Probe nachgewiesen werden. Die Aminosäuren am C-Terminus von PrP, Arg 230 und Ser 231, wurden ebenfalls nicht detektiert, da diese durch die tryptische Verdauung einzeln

abgespalten werden und so vermutlich bereits in den Waschschritten während der Mikro-reversed-phase-Chromatographie eluiert wurden. Bei Peptiden, die Cystein-Reste enthalten, kann es zu Schwierigkeiten in der Nachweisbarkeit kommen, wenn es während der Proben-Präparation zu einer Oxidation der Cysteine kommt. Nach einer Alkylierung zu Carboxyamidomethylcystein konnten jedoch beide PrP-Peptide, die die Cystein-Reste enthalten (PrP165-185 und PrP209-220), detektiert werden. Bei Peptiden, die Methionine enthalten, kommt es häufig ebenfalls zu einer Oxidation, was an einer Massendifferenz von $\Delta 16$ (Methionin) zu erkennen ist. Tab. 3.1 gibt einen Überblick über alle identifizierten PrP-Peptid-Signale in Monomer-Kontrollen mit zugehöriger Sequenz-Zuweisung. Es sei hier der Vollständigkeit halber darauf hingewiesen, dass bei Peptid PrP90-106 in geringem Maße eine Carbamylierung, zu erkennen an der Massendifferenz von \(\Delta 43\), detektiert wurde, obwohl, wie zu Beginn des Kapitels beschrieben, auf eine Harnstoff-Zugabe verzichtet wurde. Diese geringfügige Carbamylierung ist vermutlich auf eine kurzzeitige Harnstoffbehandlung während der Aufreinigung des Proteins zurückzuführen.

dentifizierten
-Messungen i
s ESI-MS/MS
ber die mittel
Übersicht ül
Tab. 3.1

PrP-Peptide

54

4	Signal		Beobachtete Masse	Erwartete Masse	Sequenzbereichs-				
ŧ	(m/z)	Ladung	_[H + Η]	[H + H]⁺	zuweisung	sequenz-zuoranung	MODITIKATION	MODINZIERTE KESTE	
	456,07	4+	1821,28	1820,91			1	1	
	365,07	5+	1821,35	1820,91	00 106	NGNARIANONHTOOOO	/	_	
-	607,74	3+	1821,22	1820,91	anna		/	1	
	466,83	4+	1864,32	1863,96			Carbamylierung	Lysin	
2	1	1	1	493,24	107-110	TNMK	1	1	
	788,53	3+	2363,59	2363,13			/	_	
	591,44	4+	2362,76	2363,13			/	_	
	793,86	3+	2379,58	2379,13			Oxidation	Methionin	
c	595,65	4+	2379,60	2379,13	111 136	HMAGAAAAGAVVGGLGGYML	Oxidation	Methionin	
C	799,19	3+	2395,57	2395,12		GSAMSR	Oxidation	Methionin	
	804,45	3+	2411,35	2411,12			Oxidation	Methionin	
	603,60	4+	2411,40	2411,12			Oxidation	Methionin	
	483,08	5+	2411,40	2411,12			Oxidation	Methionin	
	512,27	3+	1534,81	1534,61			1	1	
	767,93	2+	1534,86	1534,61			/	_	
	517,63	3+	1550,89	1550,61	127 110		Oxidation	Methionin	
t	775,93	2+	1550,86	1550,61	041-701		Oxidation	Methionin	
	522,92	3+	1566,76	1566,60			Oxidation	Methionin	
	783,86	2+	1566,72	1566,61			Oxidation	Methionin	
പ	501,33	,+	501,33	501,24	149-151	YYR	/	_	
4 + 5	513,02	4+	2049,08	2048,83	137-151	PMMHFGNDWEDRYYR	Oxidation	Methionin	
9	332,21	2+	663,42	663,28	152-156	ENMNR	1	_	
7	551,81	2+	1102,62	1102,52	157-164	YPNQVYYR	1	_	
α	844,88	3+	2532,68	2532,19	16E 18E		Alkylierung	Cystein	
þ	633,92	4+	2532,68	2532,20	001-001		Alkylierung	Cystein	
6	508,82	2+	1016,64	1016,53	186-194	QHTVTTTK	1	1	
10	577,29	2+	1153,58	1153,52	195-204	GENFTETDIK	1	/	
11	274,70	2+	548,40	548,25	205-208	IMER	1	/	
10 + 11	566,98	3+	1698,94	1698,79	195-208	GENFTETDIKIMER	Oxidation	Methionin	
10	757,97	2+	1514,94	1514,69	000-000	V/FOMOTTOVOK	Alkylierung	Cystein	
<u>1</u>	505,65	3+	1514,95	1514,70	077-007		Alkylierung	Cystein	
13	544.82	2+	1088.64	1088.46	221-229	ESOAYYDGR		_	

3.3.2 Direkte (statische) massenspektrometrische Analyse tryptischer Peptide von quervernetzten PrP-Mono- und –Dimeren

Die hohe Sequenzabdeckung, die in den Monomer-Kontrollen erreicht wurde, erlaubte nachfolgend eine vergleichende Untersuchung der Crosslink-Proben mit den Kontrollen. Die Analyse erstreckte sich, wie auch die der Kontrollen (s. Kap. 3.3.1), zunächst auf eine direkte MS-Messung der jeweiligen Proben.

Der auffälligste Unterschied zwischen den Übersichtsspektren der Crosslinkund der Kontroll-Proben war zunächst eine deutliche Intensitätsabnahme von zwei Peptid-Signalen in den Crosslink-Proben. Es handelte sich dabei um die mittels Tandem-MS-Messungen zuvor identifizierten Signale von PrP195-204 (m/z=577,3²⁺) und PrP90-106 (m/z=456,1⁴⁺). In Abb. 3.7 ist ein Vergleich der Intensitäten in den ESI-MS-Übersichtsspektren dieser beiden Peptid-Signale in Kontrolle, EDC-Dimer und EDC-Monomer dargestellt. Es ist zu sehen, dass die Intensitätsabnahme der beiden Signale sowohl in EDC-Dimer-, als auch in EDC-Monomer-Proben auftrat. Gezeigt ist jeweils nur der Massenbereich, in dem die Peptid-Signale zu detektieren waren. Die übrigen PrP-Signale waren in Crosslink-Proben und Kontrollen in vergleichbarer Intensität nachweisbar.

Hierzu ist zu bemerken, dass Intensitäten in der Regel nur innerhalb eines Spektrums relativ zueinander verglichen werden können. Die Intensität von Peptid-Signalen wird grundsätzlich durch verschiedene Parameter beeinflusst, die nicht für jede Messung und jede Probe identisch gehalten werden können. Zum einen hängt die Signalintensität selbstverständlich von der Konzentration der Peptid-Moleküle in der Probe ab. Die Konzentration der Peptide im Ansatz wird dabei vorwiegend durch die Proteinkonzentration in der jeweiligen Gel-Bande, aber nicht zuletzt auch durch die Verdauung beeinflusst. Zum anderen kann die Ionisierbarkeit von Peptiden stark variieren. Verschiedene Peptide können daher bei gleicher Konzentration unterschiedliche Intensitäten im MS-Spektrum aufweisen (vgl. Abb. 3.5). Die Ionisierbarkeit hängt dabei u.a. von der Sequenz, d.h. von der Aminosäurezusammensetzung, und Größe des Peptides ab. Weiterhin wird die Intensität der Peptid-Signale auch vom Gesamt-Ionenstrom, d.h. u.a. vom Sprühverhalten der Probe beeinflusst.

Trotz dieser Einschränkungen waren die hier beobachteten Intensitätsabnahmen hoch reproduzierbar. Zudem wurden für die Vergleiche immer Proben herangezogen, die ähnliche Gesamt-Intensitäten der Peptid-Signale aufwiesen, so dass die hier beobachteten Intensitätsabnahmen eindeutig belegt sind.



Abb. 3.7 Vergleich der Monomer-Kontrolle, des EDC-Dimers und des EDC-Monomers in ESI-MS-Übersichtsspektren. Gezeigt sind nur die Massenbereiche der Peptid-Ionen von PrP195-204 (m/z: 577,3²⁺) (links) und PrP90-106 (m/z: 456,1⁴⁺) (rechts).

Eine Intensitätsabnahme von Peptid-Signalen bedeutet, dass die betroffenen Peptide quervernetzt wurden, so dass sie in ihrer unvernetzten Form nicht, oder nur noch in sehr reduzierter Intensität zu detektieren sind. Dass PrP90-106 insgesamt drei Lysine zuzüglich des hierin enthaltenen freien N-Terminus von PrP relativ viele Aminogruppen aufweist und PrP195-204 drei saure Aminosäuren enthält, spricht dafür, dass ein Crosslink zwischen diesen beiden PrP-Peptiden erzielt wurde. Gleichzeitig müssten im Spektrum jedoch neue Signale auftreten, die zu den quervernetzten Peptiden gehören und bei entsprechend größerer Masse zu detektieren sein müssten. Dies konnte hier jedoch nicht beobachtet werden. Um zu untersuchen, ob die Quervernetzungen in den hier analysierten Proben und die damit verbundene Intensitätsabnahme der Signale von PrP90-106 und PrP195-204 strukturspezifisch sind, wurde eine rek PrP-Probe bei 4% SDS in 10 mM NaPi pH 7,2 vollständig denaturiert und mit EDC behandelt. Bei vollständiger Denaturierung ist anzunehmen, dass EDC keine Vernetzung innerhalb eines Proteins vermitteln kann, da sowohl Sekundär- als auch Tertiärstrukturen entfaltet sind. Zusammen mit einer EDC-behandelten PrP-Probe bei 0,2% SDS und einer nicht vernetzten Monomer-Kontrolle wurde diese denaturierte PrP-Probe einer SDS-PAGE unterzogen. Sowohl bei 0,2% SDS als auch bei 4% SDS liegt PrP in monomerer Form vor. In der SDS-PAGE wurde auch nach Crosslinking nur eine Monomer-Bande bei 16 kDa detektiert, was belegt, dass das Crosslinking nicht zu unspezifisch vernetzten Komplexen führt (Abb. 3.8).



Abb. 3.8 Kontrolle der Strukturspezifität des Crosslinkings durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung und Präparation von quervernetzten PrP-Monomeren bei 4% und 0,2% SDS.

Diese Banden wurden, wie oben beschrieben, einer In-Gel-Verdauung zugeführt und die resultierenden Peptide massenspektrometrisch analysiert. Es wurde wiederum ein Vergleich der ESI-MS-Übersichtsspektren der Kontrollen mit den Crosslink-Proben vorgenommen. In Abb. 3.9 sind die gemessenen Übersichtsspektren dargestellt.

Bei 4% SDS ist in beiden Übersichtsspektren das Signal von PrP195-204 (m/z=577,3²⁺), in ähnlich hoher Intensität im relativen Vergleich zu den Peptidlonen PrP137-148 (m/z=512,3³⁺) und PrP157-164 (m/z=551,9²⁺) vorhanden. Die Gesamt-Intensität der EDC-Monomer-Probe weicht hier zwar mit ca. 100 counts stark von der der Kontrolle mit ca. 1000 counts ab, was aber vermutlich lediglich auf ein unterschiedliches Sprühverhalten der beiden Proben zurückzuführen ist, so dass hier der relative Vergleich zu den anderen Peptidlonen herangezogen wurde.



Abb. 3.9 ESI-MS-Übersichtsspektren von Monomer-Kontrolle und EDC-Monomer eingestellt bei 4% bzw. 0,2% SDS.

Insgesamt konnten keine Hinweise auf eine intramolekulare Vernetzung bei 4% SDS gefunden werden. Das N-terminale Peptid PrP90-106 konnte bei 4% SDS nach Crosslinking zwar nicht nachgewiesen werden, was in diesem Fall jedoch höchstwahrscheinlich nur in der relativ geringen Gesamtintensität der Probe begründet liegt.

Die Übersichtsspektren der Proben bei 0,2% SDS in Abb. 3.9 zeigen, dass die Intensität der meisten PrP-Signale nach Quervernetzung deutlich vermindert war. Selbst das Signal von PrP157-164 (m/z=551,9²⁺), welches aufgrund seiner Sequenz nicht mit EDC reagieren kann, ist drastisch reduziert. In der zugehörigen Kontroll-Probe, die parallel präpariert wurde, sind alle PrP-Signale in den erwarteten Intensitäten vorhanden. Gekennzeichnet sind wiederum die Peptide PrP137-148 (m/z=512,3³⁺), PrP157-164 (m/z=551,9²⁺) und PrP195-204 (m/z=577,4²⁺). Diese drastische Reduktion aller PrP-Signale zeigt, dass rek PrP bei 0,2% SDS, im Gegensatz zu 4% SDS, offenbar durch EDC sehr stark in-

tramolekular vernetzt wurde, so dass Trypsin sehr viel weniger Angriffspunkte vorfindet. Im Vergleich zu den vernetzten Proben bei Dimer-Bedingungen (0,055-0,07% SDS) (Abb. 3.7) wurde PrP bei 0,2% SDS jedoch vermutlich deutlich unspezifischer vernetzt, so dass nicht nur einzelne sondern alle PrP-Signale stark reduziert wurden. Die Eigenverdauung von Trypsin, die in allen Proben deutlich nachweisbar war, zeigt, dass die Bedingungen für die Verdauung in allen Proben optimal waren. Trypsin-Peptide wurden u.a. bei $m/z=421,9^{2+}$ und $601,0^{2+}$ detektiert und sind in den Spektren markiert. Eine Aktivitätsminderung von Trypsin konnte somit ausgeschlossen werden.

Diese Messungen zeigen deutlich, dass die EDC-vermittelte Quervernetzung von PrP-Di- und -Monomeren, und die damit verbundene Intensitätsabnahme der zwei PrP-Peptid-Signale, auf strukturellen Eigenschaften von PrP unter den gegebenen Bedingungen beruht. Anderenfalls wäre auch bei der denaturierten Probe eine Reduktion von PrP-Signalen zu erwarten gewesen.

3.3.3 Nachweis von Crosslink-Peptiden in PrP-Di- und -Monomeren mittels ESI-LC-MS-Kopplung

Wie in den vorherigen Kapiteln erläutert, konnten durch eine direkte statische MS-Analyse die Crosslink-Peptide nicht direkt nachgewiesen werden. Dies wurde auf Überlagerungen, Signalunterdrückungen oder auf eine relativ geringe Gesamtintensität der Crosslink-Peptide zurückgeführt. Durch eine fraktionierte Elution der Peptide von den ZipTips[®]-Pipettenspitzen konnte die Komplexität zwar geringfügig reduziert werden, dennoch führte dies nicht zu dem Erfolg Crosslink-Peptide direkt nachzuweisen.

Bei der LC-MS-Kopplung werden die im Ansatz befindlichen Peptide zunächst durch eine vorgeschaltete Reversed-phase-Chromatographie ihrer Hydrophobizität nach aufgetrennt. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Komplexität und die damit verbundenen Schwierigkeiten dadurch erheblich reduziert werden. Zum anderen kommt es zusätzlich zu einer Aufkonzentrierung der Peptide in den einzelnen Peaks. Die eluierenden Peptide werden hierbei direkt, also online, massenspektrometrisch analysiert. Im Verlauf dieser Arbeit konnte eine solche ESI-LC-MS-Kopplung mit einer Nano-reversed-phase-HPLC-Anlage etabliert und für die hier zu untersuchenden Proben optimiert werden. Die LC-MS-Kopplung wurde daraufhin für eine weitergehende Untersuchung von EDC-Dimer/Monomer-Proben sowie Monomer-Kontrollen eingesetzt. Der Vergleich der ESI-LC-MS-Messungen von Kontrollen, EDC-Di- und -Monomer-Proben zeigte, dass in beiden Crosslink-Proben neue, bisher nicht beobachtete, Signale zu detektieren waren. Diese mussten auf die Crosslink-Reaktion zurückzuführen sein. Wiederum wiesen die EDC-Dimer- und EDC-Monomer-Messun-



gen jedoch keinen Unterschied auf. In Abb. 3.10 sind die zwei prominentesten Signale am Beispiel einer EDC-Dimer-Messung dargestellt.

Abb. 3.10 Signale vernetzter Peptide in ESI-LC-MS-Übersichtsspektren einer EDC-Dimer-Probe. Gezeigt sind die Massenbereiche, in denen die neuen Signale 493,9⁵⁺ und 591,98⁵⁺ detektiert wurden.

Die beiden Signale wurden während des LC-Laufs bei verschiedenen Elutionszeiten detektiert. Gezeigt sind hier einzelne MS-Übersichtsspektren, die während der Elution der Peptide von der Reversed-phase-Chromatographie aufgenommen wurden. Aufgrund ihrer Masse konnten diesen Signalen quervernetzte PrP-Peptide zugeordnet werden. Die Masse von 2465,5 [M + H]⁺ entspräche dabei PrP90-106+152-156 und die Masse 2955,7 [M + H]⁺ PrP90-106+PrP195-204. Beide Crosslink-Peptide wurden in relativ hohen Intensitäten detektiert und traten in allen unabhängigen Crosslink-Proben auf. Das Signal bei 2465,5 [M + H]⁺ trat zudem in verschiedenen Ladungszuständen von 4⁺ bis 6⁺ und verschiedenen Oxidationsstufen des Methionins auf, so dass sich die Gesamtintensität aus der Summe der Signale ergibt. Das Signal der Masse 2955,7 [M + H]⁺ konnte nur in 5-fach positiv geladener Form gefunden werden.

Um die Sequenz-Zuweisung bestätigen zu können, wurden Sequenzierungen mittels ESI-LC-MS/MS-Messungen durchgeführt. Bei der LC-MS-Kopplung wurden die Peptid-Signale dafür automatisch selektiert und fragmentiert. Die Einstellungen hierfür wurden im Messprogramm vor den jeweiligen Messungen festgelegt. Es wurden hier nur Signale selektiert, die über 5 counts an Intensität aufwiesen und einen Ladungszustand von 2-5⁺ besaßen. Die MS/MS-Spektren wurden jeweils für 5 s summiert. Dank der hohen Intensität der Vorläufer-Ionen reichte diese Zeit aus, um hoch qualitative Spektren zu erzielen. Abb. 3.11 zeigt das LC-MS/MS-Spektrum des Ions der Masse 2465,5 [M + H]⁺.

3 Ergebnisse



Abb. 3.11 Sequenzierung des vernetzten Peptids (2465,5 [M + H]⁺) anhand eines ESI-LC-MS/MS-Spektrums. Die Fragment-Ionen sind nach ihrer Zugehörigkeit zu PrP90-106+PrP152-156 farblich markiert (grün: PrP152-156, rot: PrP90-106, orange: Crosslink-Fragment.



Abb. 3.12 Struktur des Crosslink-Peptids PrP90-106+152-156 inklusive der Fragmentierungs-Positionen. Die Crosslink-Position liegt hier bei G90-E152.

Aus den Fragment-Spektren lässt sich die Aminosäuresequenz des Peptids ablesen. Es konnten sowohl von Peptid PrP90-106 als auch von PrP195-204 die Y-Ionen-Serien identifiziert werden (vgl. Abb. 3.11). Für PrP90-106 wurden zudem einige interne Fragmente und zwei B-Ionen detektiert. Die Existenz eines Fragments der Masse 702,32 [M + H]⁺, welches auch in seiner zweifach geladenen Form im Spektrum detektiert wurde, beweist zweifelsfrei, dass die beiden Peptide quervernetzt sind. Die Vernetzungsposition muss sich dabei zwischen den Aminosäuren G90 und E152 befunden haben. In Abb. 3.12 ist die ermittelte Struktur des Crosslink-Peptids mit den beobachteten Fragmentierungen dargestellt. Die Fragment-Ionen des MS/MS-Spektrums lassen nur diese Struktur bzw. Quervernetzung zu.

Für das zweite, oben genannte Signal, der Masse 2955,7 [M + H]⁺ konnten ebenfalls LC-MS/MS-Spektren aufgenommen werden, so dass anhand derer auch für dieses Peptid-Signal eine Sequenzanalyse durchgeführt werden konnte. Das zugehörige LC-MS/MS-Spektrum ist in Abb. 3.13 dargestellt. Im oberen Teil von Abb. 3.13 sind alle identifizierten Fragment-Ionen inklusive ihrer Zuordnung zu Sequenzbereichen zusammenfassend dargestellt. Der Übersicht halber sind im Spektrum nur die entscheidenden Fragment-Ionen gekennzeichnet.

Die Zuordnung der Fragment-Ionen zu bestimmten Sequenz-Bereichen von PrP bestätigte die Identität des Signals als PrP90-106+195-204. Für beide beteiligten Peptide sind die Y-Ionen-Serien vorhanden. Für PrP90-106 wurde außerdem ein B-Ion sowie einige interne Fragmente detektiert. Zusätzlich wurden einige sehr große Fragment-Ionen detektiert, die auf Peptid-Fragmente des vernetzten Teils hindeuteten (s. Abb. 3.13). Es konnte u.a. ein Ion bei $m/z=657,79^{3+}$ ([M + H]⁺ 1971,4) nachgewiesen werden, dass nur durch ein quervernetztes Peptid erklärbar ist, da es von der Masse her größer ist als die Masse der einzelnen Peptide mit 1821,3 [M + H]⁺ für PrP90-106 und 1153,6 [M + H]⁺ für PrP195-204 (s. Abb. 3.13). Anhand weiterer, deutlich größerer, Crosslink-Fragmente konnte die Crosslink-Position bei G90-D202 ermittelt werden (s. Abb. 3.14, Struktur 1).

Die Fragment-Ionen zeigten weiterhin, dass sich unter dem Signal der Masse 2955,7 [M + H]⁺ mindestens zwei verschieden vernetzte Crosslink-Peptide von PrP90-106+195-204 verbargen. Die Existenz der durchgängigen Sequenz von K204-T199 belegt eindeutig, dass eine zweite Spezies mit Crosslink bei G90 und E196 im selben Signal vorhanden gewesen sein muss (s. Abb. 3.14, Struktur 2). Für einen möglichen Crosslink an Position G90 und E200 konnten keine Hinweise gefunden werden.


Abb. 3.13 Sequenzierung des vernetzten Peptids (2955,7 [M + H]⁺) anhand des ESI-LC-MS/MS-Spektrums. Die Fragment-Ionen sind nach ihrer Zugehörigkeit zu PrP90-106+PrP195-204 farblich markiert (grün: PrP195-204, rot: PrP90-106, orange: Crosslink-Fragmente).

Die beiden identifizierten Crosslink-Peptide konnten, wie bereits erwähnt, in allen unabhängigen Crosslink-Proben in EDC-Dimer- und EDC-Monomer-Proben nachgewiesen werden. Anhand dieser Daten alleine konnte somit nicht entschieden werden, ob es sich bei den Crosslinks um eine intra- oder intermolekulare Bindung handelt (vgl. Kap. 3.3.4). Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass sie in beiden Fällen, also im Dimer und Monomer, lediglich intra-molekularer Natur sind. Da jedoch durch die SDS-PAGE-Analysen von kovalent vernetzten Dimeren ausgegangen werden muss, wäre im Falle einer rein intra-molekularen Vernetzung die tatsächliche intermolekulare Verknüpfung der Dimere nicht nachgewiesen worden.







Abb. 3.14 Ermittelte Strukturen der Crosslink-Peptide PrP90-106+195-204 inklusive der Fragmentierungs-Positionen. Es konnten zwei verschiedene Crosslink-Positionen bestimmt werden: G90-D202 (Struktur 1) und G90-E196 (Struktur 2).

In einzelnen Proben der EDC-Dimere und -Monomere wurden weitere Signale detektiert, die mit der Crosslink-Reaktion in Verbindung stehen mussten. Eines davon, detektiert bei m/z=578,96⁵⁺, konnte zudem durch MS/MS-Messungen sequenziert werden. Es stellte sich heraus, dass es sich um PrP90-106+221-229 handelt. Der Crosslink wurde hierbei für die Position G90 und E221 bestimmt. Darüber hinaus wurden vereinzelt Signale nachgewiesen, die der Masse nach den Crosslink-Peptiden PrP90-106+137-148, PrP90-106+205-208 entsprechen. Diese Signale konnten allerdings aufgrund ihrer geringen Intensitäten nicht sequenziert werden, so dass ihre tatsächliche Identität nicht geklärt

werden konnte. Da diese Crosslink-Peptide nur in einzelnen Proben beobachtet wurden, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass es sich hierbei um Produkte von Nebenreaktionen handelt. Die Intensitäten dieser Signale waren in den meisten Fällen zudem sehr gering. Obwohl die Intensitäten durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden können, sind sie dennoch ein Indiz dafür, dass diese Crosslink-Peptide nicht dem Hauptprodukt der EDC-Reaktion entsprechen. Die einzelnen unvernetzten Peptide dieser Crosslink-Peptide, also PrP90-106, PrP221-229 und PrP137-148, sind in Kontroll-Proben immer in relativ hoher Intensität nachweisbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Signale der vernetzten Peptide ebenfalls intensiv vorhanden sein müssten, wenn es sich um die vorwiegenden Crosslink-Produkte gehandelt hätte. Die Signale der nicht vernetzten Peptide PrP221-229 und PrP137-148 waren zudem in den Crosslink-Proben in ihrer Intensität nicht maßgeblich reduziert, wie es für die Signale der Peptide PrP90-106 und PrP195-204 beobachtet wurde. PrP205-208 war auch in unvernetzter Form in nur sehr geringer Intensität detektierbar, so dass hier der Intensitätsvergleich zwischen Kontrolle und Crosslink-Proben zwar schwieriger war, aber da das zugehörige Crosslink-Peptid tatsächlich nur in einigen wenigen Proben zu finden war, wurde auch für dieses Peptid angenommen, dass dies eine eher unspezifisch entstandene Bindung sein musste.

Zusammenfassend wurden drei verschiedene Haupt-Crosslink-Positionen in EDC-Dimeren und EDC-Monomeren nachgewiesen: PrP90-106+152-156 mit G90-E152 und PrP90-106+195-204 mit G90-E196 und G90-D202, wobei der Intensität nach der Crosslink zwischen G90 und E152 die wichtigste Crosslink-Position darstellt. Diese Positionen müssen demnach im PrP-Mono- und -Dimer strukturbedingt in räumlicher Nähe gewesen sein. In Tab. 3.2 sind noch einmal alle gefundenen Crosslink-Peptid-Signale mit zugehöriger Sequenz-Zuordnung aufgelistet.

PSKPK + / / / / / / / / / / / / / / / / / /	PSKPK + / PSKPK + / PSKPK + / SDR sopeptidbindung 90G + PSKPK + Nxidation Methi POK + Δ16 Methi POK + Δ32 Methi POX + Δ16 Methi POK + Sopeptidbindung 90G + ISOpeptidbindung 90G + Sopeptidbindung 90G + ISOpeptidbindung 90G + Sopeptidbindung 90G + ISOpeptidbindung 90G + Sopeptidbindung 90G + POX + Δ16 Methi	PSKPK +///EDRPSKPK +//PSKPK +///Isopeptidbindung90G + 152EIsopeptidbindung90G + 152E+ OxidationMethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. Δ 32MethionineIKPSK +Isopeptidbindung90G + 152E+ 0X. Δ 16IKPSK +Isopeptidbindung90G + 152E+ 0X. Δ 16IKPSK +Isopeptidbindung90G + 152E+ 0X. Δ 16IKPSK +Isopeptidbindung90G + 152E+ 0X. Δ 16Methionine90G + 152E+ 0X. Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ 0X. Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ 0X. Δ 32Methionine	PSKPK + / / / EDR PSKPK + / / PSKPK + / SOG + 152E PSKPK + + Oxidation 90G + 152E Isopeptidbindung 90G + 152E Methionine PSKPK + + Oxidation 90G + 152E PSKPK + + Oxidation 90G + 152E Isopeptidbindung 90G + 152E Methionine PSKFK + Isopeptidbindung 90G + 152E ISOPeptidbindung 90G + 152E Methionine + OX. + Δ 32 Methionine 90G + 152E + ENMNR Isopeptidbindung 90G + 152E	PSKPK + / / / EDR PSKPK + / / PSKPK + / SKPK + / Isopeptidbindung 90G + 152E Isopeptidbindung 90G + 152E + Ox. + Δ 16 Methionine Isopeptidbindung 90G + 152E + Ox. + Δ 16 Methionine Isopeptidbindung 90G + 152E + Ox. + Δ 16 Methionine Isopeptidbindung 90G + 152E + Ox. + Δ 16 Methionine Isopeptidbindung 90G + 152E + Ox. + Δ 32 Methionine Isopeptidbindung 90G + 152E + OX. + Δ 32 Methionine Isopeptidbindung 90G + 152E + OX. + Δ 32 Methionine Isopeptidbindung 90G + 152E + OX. + Δ 32 Methionine Isopeptidbindung 90G + 152E + OX. + Δ 32 Methionine ISKPK+ Isopeptidbindung 90G + 152E Hotionine 15KFK+ Isopeptidbindung 90G + 152E Hotionine	PSKPK +///EDRPSKPK +//PSKPK +/SKPK +/Isopeptidbindung90G + 152EIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineISSKPK +IsopeptidbindungIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIKPSK +Isopeptidbindung90G + 152E90G + 162EIKPSK +Isopeptidbindung90G + 162E196EIKIsopeptidbindung90G + 196E16IKPSK +Isopeptidbindung90G + 196E196EIKPSK +Isopeptidbindung90G + 202DIKPSK +	PSKPK +///EDRPSKPK +//PSKPK +/SKPK +/PSKPK +Isopeptidbindung90G + 152EIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineISKPK +Isopeptidbindung90G + 152E90G + 152EKPSK +Isopeptidbindung90G + 162E90G + 196EIKIsopeptidbindung90G + 196EIKIKIsopeptidbindung90G + 196EIKIKIsopeptidbindung90G + 196EIKIKIsopeptidbindung90G + 196EIKIKIsopeptidbindung90G + 196EIKIsopeptidbindung90G + 196EIKIsopeptidbindung90G + 196EIKIsopeptidbindung90G + 196EIKIsopeptidbindung90G + 196EISISIS <trr< th=""><th>PSKPK +///FDRIsopeptidbindung90G + 152EPSKPK +//PSKPK +/Isopeptidbindung90G + 152E+ OxidationMethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineISSKPK +IsopeptidbindungIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineISSKPK +Isopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32Methionine90G + 152EIKPSK +Isopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32Methionine90G + 16EIKIsopeptidbindung90G + 106EIKISSKPK +Isopeptidbindung90G + 106EIKISSKPK +Isopeptidbindung90G + 202DVNK +Isopeptidbindung90G + 202DISSKPK +/ISSKPK +/<trr< th=""><th>PSKPK +///FEDRFDR//PSKPK +///FEDRIsopeptidbindung90G + 152EPSKPK ++ Oxidation90G + 152EIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ DX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineISSKPK +IsopeptidbindungIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIKPSK +Isopeptidbindung90G + 152E16EIKPSK +Isopeptidbindung90G + 16EIKISSKPK +Isopeptidbindung90G + 106EIKISSKPK +Isopeptidbindung90G + 202DISSKPK +Isopeptidbindung90G + 202DISSISOPISSISOP<</th></trr<></th></trr<>	PSKPK +///FDRIsopeptidbindung90G + 152EPSKPK +//PSKPK +/Isopeptidbindung90G + 152E+ OxidationMethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineISSKPK +IsopeptidbindungIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineISSKPK +Isopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32Methionine90G + 152EIKPSK +Isopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32Methionine90G + 16EIKIsopeptidbindung90G + 106EIKISSKPK +Isopeptidbindung90G + 106EIKISSKPK +Isopeptidbindung90G + 202DVNK +Isopeptidbindung90G + 202DISSKPK +/ISSKPK +/ <trr< th=""><th>PSKPK +///FEDRFDR//PSKPK +///FEDRIsopeptidbindung90G + 152EPSKPK ++ Oxidation90G + 152EIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ DX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineISSKPK +IsopeptidbindungIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIKPSK +Isopeptidbindung90G + 152E16EIKPSK +Isopeptidbindung90G + 16EIKISSKPK +Isopeptidbindung90G + 106EIKISSKPK +Isopeptidbindung90G + 202DISSKPK +Isopeptidbindung90G + 202DISSISOPISSISOP<</th></trr<>	PSKPK +///FEDRFDR//PSKPK +///FEDRIsopeptidbindung90G + 152EPSKPK ++ Oxidation90G + 152EIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 16MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ Ox. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ DX. + Δ 32MethionineIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineISSKPK +IsopeptidbindungIsopeptidbindung90G + 152E+ OX. + Δ 32MethionineIKPSK +Isopeptidbindung90G + 152E16EIKPSK +Isopeptidbindung90G + 16EIKISSKPK +Isopeptidbindung90G + 106EIKISSKPK +Isopeptidbindung90G + 202DISSKPK +Isopeptidbindung90G + 202DISSISOPISSISOP<
MEDR NKPSKPK + / NKPSKPK + Isopeptidbindung NKPSKPK + Axidation IR Isopeptidbindung + Ox. + ∆ 16 Isopeptidbindung + Ox. + ∆ 37	MEDR NKPSKPK + / MEDR Isopeptidbindung NKPSKPK + Axidation R sopeptidbindung + Ox. + Δ 16 Isopeptidbindung KNKPSK + Sopeptidbindung Sopeptidbindung R + Ox. + Δ 16 Isopeptidbindung KNKPSK + Sopeptidbindung Sopeptidbindung	MKPSKPK + / MKPSKPK + / NKPSKPK + Bsopeptidbindung NKPSKPK + A 16 NKPSK + A 16 Sopeptidbindung + OX. + ∆ 16 Sopeptidbindung NKPSK + Sopeptidbindung NKPSK + Sopeptidbindung ANKPSK + Sopeptidbindung NKPSK + Sopeptidbindung ANKPSK + Sopeptidbindung NKPSK + A 32 Sopeptidbindung	MKPSKPK + / NKPSKPK + / Isopeptidbindung NKPSKPK + Bopeptidbindung + Ox. + ∆ 16 Sopeptidbindung + Ox. + ∆ 32 NKFSK + Sopeptidbindung NKFSK + Sopeptidbindung NKFSK + Sopeptidbindung NK + ENMNR Isopeptidbindung NK + ENMNR Isopeptidbindung NK + ENMNR Isopeptidbindung NK + ENMNR Isopeptidbindung	WEDK / NKPSKPK + / NKPSKPK + Isopeptidbindung Isopeptidbindung + Oxidation Isopeptidbindung + Oxidation Isopeptidbindung + Ox. + ∆ 16 NNKPSK + + Ox. + ∆ 16 Isopeptidbindung + Ox. + ∆ 32 NNKPSK + Isopeptidbindung Isopeptidbindung + Ox. + ∆ 32 ISOF + Ox. + ∆ 32 ISOF + Ox. + ∆ 32	WEDK / NKPSKPK + / NKPSKPK + Isopeptidbindung Isopeptidbindung + Oxidation Isopeptidbindung + Oxidation Isopeptidbindung + Ox. + ∆ 16 NKPSK + + Ox. + ∆ 16 Isopeptidbindung + Ox. + ∆ 32 NKPSK + Isopeptidbindung Isopeptidbindung + Ox. + ∆ 32 NKPSK + Isopeptidbindung Isopeptidbindung + Ox. + ∆ 32 NKFSKPK + Isopeptidbindung TDIK Isopeptidbindung TDIK Isopeptidbindung	WEDR / NKPSKPK + / NKPSKPK + Isopeptidbindung Isopeptidbindung + Oxidation MNKPSK + Isopeptidbindung Isopeptidbindung + Oxidation NKFSKPK + Isopeptidbindung ISOPEPtidbindung + Oxidation NKFSKPK + Isopeptidbindung NKFSKPK + Isopeptidbindung OXIKFSK Isopeptidbindung TDIK Isopeptidbindung TDIK Isopeptidbindung TDIK Isopeptidbindung	MKPSKPK + / / / / / / / / / / / / / / / / / /	WEDR / NKPSKPK + / NKPSKPK + Isopeptidbindung Isopeptidbindung + Oxidation NKPSKPK + + Oxidation Isopeptidbindung + Ox. + ∆ 16 NKPSK + Isopeptidbindung + Ox. + ∆ 16 Isopeptidbindung NNKPSK + Isopeptidbindung R + Ox. + ∆ 32 NNKPSK + Isopeptidbindung R + Ox. + ∆ 32 Isopeptidbindung + Ox. + ∆ 32 NNKPSK + Isopeptidbindung NKFSKPK + Isopeptidbindung NNKPSK + Isopeptidbindung TDIK Isopeptidbindung NNKPSKPK + Isopeptidbindung TDIK Isopeptidbindung NNKPSKPK + Isopeptidbindung
VNKPSKPK + / DWEDR Isopeptidbind VNKPSKPK + Avidation VNKPSKPK + Avidation Isopeptidbind + Ox. + A 1(Isopeptidbind + Ox. + A 1(+ O	VNKPSKPK + / DWEDR + / Isopeptidbind VNKPSKPK + A11 Isopeptidbind + Ox. 4 11 Isopeptidbind + Ox. 4 3: Isopeptidbind + Ox. 4 3: Isopeptidbind + Ox. 4 3: Isopeptidbind + Ox. 4 3: Isopeptidbind	VNKPSKPK + / DWEDR + / Isopeptidbind VNKPSKPK + + Oxidation VNKPSKPK + + Oxidation + OX. + Δ 11 Isopeptidbind + OX. + Δ 11 Isopeptidbind VNKPSK + Isopeptidbind + OX. + Δ 11 Isopeptidbind + OX. + Δ 11 Isopeptidbind + OX. + Δ 11 + OX. + Δ 11 - OX. + Δ 12 - OX. + Δ 12 - OX. + Δ 11 - OX. + Δ 12 - OX. + Δ 12	VNKPSKPK + / DWEDR Isopeptidbind VNKPSKPK + Isopeptidbind VNKPSKPK + + Oxidation VR + Oxidation VR + Ox. + Δ 10 Isopeptidbind + Ox. + Δ 31 VNKPSK + Isopeptidbind VR + Ox. + Δ 31 Isopeptidbind + Ox. + Δ 31 VR Isopeptidbind VR + Ox. + Δ 31 Isopeptidbind + Ox. + Δ 31 VNKPSK + Isopeptidbind VR Isopeptidbind VR + Ox. + Δ 31 Isopeptidbind + Ox. + Δ 33 NK + ENMNR Isopeptidbind ANK + ENMNR Isopeptidbind	VNKPSKPK + / DWEDR Isopeptidbind VNKPSKPK + + Oxidation VNKPSKPK + + Oxidation VNKPSKPK + Isopeptidbind Isopeptidbind + Ox. + Δ 33 VNKPSKPK + Isopeptidbind Isopeptidbind + Ox. + Δ 33 VNKPSKPK + Isopeptidbind Isopeptidbind + Ox. + Δ 33 VNKPSKPK + Isopeptidbind ISOPEPTIDIK Isopeptidbind	VNKPSKPK + / DWEDR Isopeptidbind VNKPSKPK + + Oxidation VNKPSKPK + + Oxidationd VNKPSKPK + Isopeptidbind + Ox. + Δ 31 + Ox. + Δ 31 Isopeptidbind + Ox. + Δ 31 VNKPSKPK + Isopeptidbind VNKPSKPK + Isopeptidbind VNKPSKPK + Isopeptidbind Isopeptidbind + Ox. + Δ 31 VNKPSKPK + Isopeptidbind ISOPEPtidbind + OX. + Δ 31 VNKPSKPK + Isopeptidbind ISOPEPtidbind + OX. + Δ 31 VNKPSKPK + Isopeptidbind ETDIK Isopeptidbind	VNKPSKPK + / DWEDR Isopeptidbind VNKPSKPK + + Oxidation VR Isopeptidbind VR + Ox. + Δ 10 Isopeptidbind + Ox. + Δ 30 Isopeptidbind + Ox. + Δ 10 VNKPSKH + Isopeptidbind VNKPSKH + Isopeptidbind VNKPSKH + Isopeptidbind VNKPSKPK + Isopeptidbind ANK + ENMNR Isopeptidbind ANKFSKPK + Isopeptidbind ANKFSKFK + Isopeptidbind AOWNKPSK + Isopeptidbind AOWNKPSK + Isopeptidbind AOWNKPSK + Isopeptidbind AOWNKPSK + Isopeptidbind AOWNK + Isopeptidbind AOWNK + Isopeptidbind AOWNK + Isopeptidbind	VNKPSKPK + / DWEDR Isopeptidbind VNKPSKPK + + Oxidation VR + Oxidation VNKPSKPK Isopeptidbind AUNKPSK Isopeptidbind AUNKPSKPK Isopeptidbind AUNKPSKPK Isopeptidbind AUXVKPSKPK Isopeptidbind AUXVKPSKPK Isopeptidbind AUXVKPSKPK Isopeptidbind AUXVKPSKPK Isopeptidbind AUXVKPSKPK Isopeptidbind AUXVKPSKPK Isopeptidbind	VNKPSKPK + / DWEDR Isopeptidbind VNKPSKPK + Isopeptidbind VNKPSKPK + + Oxidation VR + Ox. + Δ 33 VNKPSKF + Isopeptidbind Isopeptidbind + Ox. + Δ 33 VNKPSKF + Isopeptidbind VNKPSKPK + Isopeptidbind MVKPSKPK + Isopeptidbind VNKPSKPK + Isopeptidbind MVKPSKPK + Isopeptidbind YNDGR Isopeptidbind
NDWEDR	NDWEDR / / / / / / / / / / / / / / / / / / /	NDWEDR / Isopeptidbi WNKPSKPK + Cxida Isopeptidbi P.OX. + / P.OX. + / NNR + OX. + / Isopeptidbi Isopeptidbi MNR + OX. + / Isopeptidbi ANR + OX. + / ANR + / ANR + OX. + // ANR + // ANR + // A	NDWEDR ' NNKPSKPK Isopeptidbine MNR Isopeptidbine	NDWEDR ' NNKPSKPK + Isopeptidb NNR Isopeptidb MNR Isopeptidb	NDWEDR ` NDWEDR Isopeptidb WNKPSKPK + Loxida MR Isopeptidb MR Sopeptidb MR P.X. + L Isopeptidb + OX. + L Isopeptidb + OX. + L MNR Isopeptidb MNR Isopeptidb MNR Isopeptidb MNR Isopeptidb MNR Isopeptidb MNR Isopeptidb WNKPSKPK Isopeptidb WNKPSKPK Isopeptidb MNR Isopeptidb MNR Isopeptidb ETDIK Isopeptidb FETDIK Isopeptidb	NDWEDR ' NNKPSKPK+ Isopeptidb MNR Isopeptidb MNR Isopeptidb MNR Isopeptidb MNR Isopeptidb MNR Isopeptidb MNR Isopeptidb ANNKPSK+ Isopeptidb ANN Isopeptidb ANN Isopeptidb MNR Isopeptidb MNR Isopeptidb MNR Isopeptidb MNK Isopeptidb MNKPSKPK+ Isopeptidb AUNKPSK+ Isopeptidb AUNKPSK+ Isopeptidb AUNKPSK+ Isopeptidb AUNKNK+ Isopeptidb FETDIK Isopeptidb	NDWEDR ' MNKPSKPK+ Isopeptidbi MNR Isopeptidbi MNKPSKPK+ Isopeptidbi MNKPSKPK+ Isopeptidbi MNNKPSKPK+ Isopeptidbi MNNKPSKPK+ Isopeptidbi MNNKPSKPK+ Isopeptidbi MNNKPSKPK+ Isopeptidbi MNKPSKPK+ Isopeptidbi MNKPSKPK+ Isopeptidbi	NDWEDR ` MNKPSKPK+ Isopeptidbi MNR Isopeptidbi MNKPSKPK Isopeptidbi MNNKPSKPK Isopeptidbi
GTHNQWNKPSKPK + ENMNR	GTHNQWNKPSKPK + ENMNR GGTHNQWNKPSK + GGTHNQWNKPSK +	GTHNQWNKPSKPK + ENMNR GGTHNQWNKPSK + ENMNR	GTHNQWNKPSKPK + ENMNR GGTHNQWNKPSK + ENMNR GTHNQWNK + ENMNR	GTHNQWNKPSKPK + ENMNR GGTHNQWNKPSK + ENMNR GTHNQWNK + ENMNR GTHNQWNKPSKPK + GENFTETDIK	GTHNQWNKPSKPK + ENMNR GGTHNQWNKPSK + ENMNR GTHNQWNK + ENMNR GTHNQWNKPSKPK + GENFTETDIK GENFTETDIK	GTHNQWNKPSKPK + ENMNR GGTHNQWNKPSK + ENMNR GTHNQWNK + ENMNR GTHNQWNKPSKPK + GENFTETDIK GGTHNQWNKPSK + GGGTHNQWNKPSK + GGGTHNQWNK + GGGTHNQWNK +	GTHNQWNKPSKPK+ ENMNR GGTHNQWNKPSK+ ENMNR ENMNR GTHNQWNKFSKPK+ GGTHNQWNKPSKPK+ GGTHNQWNKPSK+ GGTHNQWNKPSK+ GGNFTETDIK GGGTHNQWNK+ GGNFTETDIK GGNFTETDIK GGNFTETDIK	GTHNQWNKPSKPK+ ENMNR GGTHNQWNKPSK+ ENMNR GTHNQWNKPSKPK+ GENFTETDIK GGTHNQWNKPSKPK+ GENFTETDIK GGTHNQWNKPSKPK+ GENFTETDIK GGGTHNQWNKPSKPK+ GGGGTHNQWNKPSKPK+ GGGGTHNQWNKPSKPK+ GGGTHNQWNKPSKPK+ GGGTHNQWNKPSKPK+ SGTHNQWNKPSKPK+
GQGGGTHNQWr ENMNF	GQGGGGTHNQWh ENMNF GQGGGTHNQV	GQGGGTHNQWN ENMNF GQGGGTHNQW	GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQW GQGGGGTHNQW GQGGGGTHNQWN	GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQW GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN	GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGTHNQWN GQGGGTHNQWN GQGGGTHNQWN GQGGGTHNQWN	GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGTHNQWN GQGGGTHNQWN GQGGGTHNQW GGGGGTHNQW	GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGTHNQWN GQGGGTHNQWN GQGGGTHNQWN GGOGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN	GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN GQGGGGTHNQWN CGQGGGTHNQWN CGQGGGTHNQWN CGQGGGTHNQWN CGQGGGTHNQWN CGQGGGTHNQWN CGQGGGTHNQWN CGQGGGTHNQWN CGQGGGTHNQWN CGQGGGTHNQWN CGQGGGTHNQWN CGCGGGTHNQWN CGCGGGGTHNQWN CGCGGGGTHNQWN CGCGGGTHNQWN CGCGGGTHNQWN CGCGGGTHNQWN CGCGGGTHNQWN CGCGGGTHNQWN CGCGGGTHNQWN CGCGGGTHNQWN CGCGGGTHNQWN CGCGGGTHNQWN CGCGGGTHNQWN CGCGGGTHNQWN CCCCCCC CCCCCCCCCCC CCCCCCCCCCCCCCC
90-106 + G(90-106 + G(152-156 152-156 90-104 + (90-106 + G(152-156 90-104 + (90-106 + G(152-156 90-104 + (152-156 90-101 + G(90-106 + G(152-156 G(90-104 + (152-156 G(152-156 G(195-204 G	90-106 + G(152-156 G(90-104 + (152-156 156 152-156 152-156 152-156 152-156 152-156 152-156 152-104 152-104 152-104 155-204	90-106 + G(152-156 G(90-104 + (152-156 152-156 152-156 152-156 152-156 152-156 152-156 152-104 152-104 152-104 152-204 152-	90-106 + G(152-156 G(90-104 + (152-156 152 156 152 156 152 156 152 156 152 156 152 156 152 156 152 156 152 156 152 156 152 155 152 155 155 155 155 155 155 155	90-106 + G(152-156 G(152-156 155 155 155 155 155 155 155 155 155
90-106	90-106 152-15(90-104	90-106 152-15(90-104	90-106 152-15(90-104 152-15(152-15(90-106 152-15(152-15(152-15(152-15(152-15(152-20)	90-106 152-15 90-104 152-15 152-15 152-15 152-15 195-20	90-106 152-15 90-104 152-15 152-15 152-15 195-20 90-101 195-20 90-101	90-106 152-15 152-15 152-15 152-15 152-15 195-20 90-101 195-20 90-106 90-106	90-106 152-15 152-15 152-15 152-15 152-16 195-20 90-101 195-20 90-106 90-106 205-206
2465,19 2481,19 2497,19 2497,19 2513,19 2513,19	2465,19 2481,19 2497,19 2497,19 2513,19 2513,19 2272,04 2272,04	2465,19 2481,19 2497,19 2497,19 2513,19 2240,04 2240,04 2228,04 2288,04	2465,19 2481,19 2497,19 2497,19 2513,19 2513,19 2240,04 22240,04 22283,04 1927,86 1975,86	2465,19 2481,19 2497,19 2497,19 2513,19 2513,19 2240,04 22240,04 22283,04 1927,86 1975,86 2955,44	2465,19 2481,19 2497,19 2497,19 2513,19 2513,19 2240,04 22240,04 2228,04 1927,86 1975,86 1975,86 2955,44 2330,29 2730,29	2465,19 2481,19 2497,19 2497,19 2513,19 2513,19 2240,04 2240,04 22240,04 2228,04 1927,86 1975,86 1975,86 2955,44 2955,44 22730,29 2730,29 2730,29	2465,19 2481,19 2497,19 2497,19 2513,19 2513,19 2240,04 22240,04 22240,04 1927,86 1927,86 1975,86 1975,86 22730,29 2350,44 2350,18 2350,18 2350,18	2465,19 2481,19 2481,19 2497,19 2513,19 2513,19 2240,04 2240,04 22240,04 22240,04 1927,86 1975,86 1975,86 1975,86 22730,29 2350,18 2350,18 2350,18 2350,18 2350,18 2350,18
2481,1 2481,1 2497,1 2513,1 2513,1	2481,1 2487,1 2497,1 2497,1 2513,1 2513,1 2240,0 2240,0 22240,0	2481,1 2481,1 2497,1 2513,1 2513,1 2240,0 2240,0 2240,0 2240,0 22240,0 22288,0	2481,1 2487,1 2497,1 2513,1 2513,1 2513,1 2240,0 2240,0 2240,0 22240,0 2228,0 1927,5 1975,5	2481,1 2487,1 2497,1 2513,1 2513,1 2513,1 2240,0 2240,0 2240,0 2240,0 22240,0 1927,8 1975,8 1975,4	2481,1 2481,1 2497,1 2513,1 2513,1 2513,1 2240,0 2240,0 2240,0 2240,0 22513,1 1927,8 1975,8 1975,4 2955,4 2955,4 2330,2	2481,1 2481,1 2497,1 2513,1 2513,1 2513,1 2240,0 2249,0 2249,0 2240,0 1927,8 1975,8 1975,8 2955,4 2955,4 2955,4 2955,4 2955,4 2955,4 2955,4 2955,4 2955,4 2955,4 2730,2 27	2481,1 2481,1 2497,1 2513,1 2513,1 2513,1 2240,0 2249,0 2249,0 2240,0 2240,0 1927,8 1975,8 1975,8 2350,1 23	2481,1 2497,1 2497,1 2513,1 2513,1 2240,0 2249,0 2249,0 2249,0 2240,0 2240,0 2226,4 1975,8 1975,8 2350,1 23
497,48 497,45 513,50 513 45	401,48 497,48 513,50 513,45 240,30 240,24 272,30	401,45 497,48 513,50 513,45 240,30 240,24 272,30 288,30 288,30	976,04 2240,30 213,50 513,45 240,24 272,30 928,30 928,04 976,04	497,48 497,48 513,50 513,45 513,45 220,30 2240,24 272,30 228,30 928,04 976,04 976,04	401,45 497,48 513,50 513,45 513,45 2240,24 2240,24 2272,30 2288,30 928,04 976,04 976,04 976,04 730,60 730,48	497,48 497,48 513,50 513,45 513,45 220,30 2240,24 272,30 288,30 928,04 976,04 976,04 976,04 118,32 730,48 730,48	401,45 497,48 513,50 513,45 513,45 513,45 2240,30 2240,24 2272,30 2283,30 928,04 976,04 976,04 976,04 130,48 730,48 730,48 730,48 730,55 350,55 366,50	401,45 497,48 497,48 513,50 513,45 513,45 2240,30 2240,24 2272,30 928,30 928,04 976,04 976,04 976,04 118,32 730,48 730,48 730,48 730,48 730,55 890,65
2497,4 2513,5 2513,5	2497,4 2513,5 2513,4 2240,3 2240,3 2240,5 2272,5	2497,4 2613,5 2513,4 2240,2 2240,2 2240,2 2272,5 2272,5 2288,5	2497,4 2513,5 2513,4 2240,2 2240,2 2240,2 2288,3 1928,6 1976,0	2497,4 2513,5 2513,4 2240,2 2240,2 2240,2 2240,2 2240,5 1928,5 1976,0 2955,	2497,4 2513,5 2513,4 2240,2 2240,2 2240,2 2240,2 1928,2 1976,0 1976,0 2955,7 2330,4	2497,4 2513,5 2513,4 2240,2 2240,2 2240,2 2240,2 2240,2 1928,0 1976,0 2955, 2955, 2955, 2418,3	2497,4 2513,5 2513,4 2240,3 2240,3 2240,2 2288,3 1976,0 1976,0 2955, 2350,6 2350,6 2356,6 2366,6	2497,4 2513,5 2513,4 2240,2 2240,2 2240,2 2288,3 1976,0 1976,0 2955, 2350,6 2350,6 2350,6 2366,6 2360,6 2360,6
	2+ + + + + + + + + + + + + + + + + + +	à à 4 à à	5 5 5 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	+ + + + + + + + + + + +			
+			× × ×	× × × ×	× × × ×	× × × ×	× × × ×	
	×	×						

x: Peptid-Identität wurde durch MS/MS-Messungen verifiziert. /: Es waren keine MS/MS-Daten verfügbar. Daher keine Angabe zur Modifikation.

3.3.4 N-terminale Acetylierung von PrP: Intra- versus intermolekulare Quervernetzung

Da die identifizierten Crosslink-Peptide sowohl in EDC-Dimer- als auch in EDC-Monomer-Proben detektiert wurden, konnte zunächst nicht entschieden werden, ob die gefundenen Vernetzungen intra- oder intermolekular ausgebildet wurden. Bei jedem der nachgewiesenen Crosslinks war jedoch die N-terminale Aminosäure von rek PrP(90-231) G90 beteiligt. Wenn die intermolekulare Vernetzung der Dimere tatsächlich über die gefundenen Positionen, G90 und E152, E196 oder D202, stattfindet, dann sollten sich nach erfolgreicher Blockierung des N-Terminus keine Dimere mehr vernetzen lassen und in der Gelelektrophorese dürften demnach keine Dimer-Banden zu detektieren sein.

Um eine eindeutige Aussage über die Beteiligung des N-Terminus an den Crosslinks treffen zu können, muss ausschließlich dieser Terminus modifiziert werden. Problematisch war es, eine geeignete Methode hierfür zu finden. Als beste Möglichkeit erschien die Acetylierungs-Methode mit Jodessigsäureanhydrid nach Wetzel et al. (1990). Hierbei werden die unterschiedlichen pKa-Werte der N-terminalen und der Seitenketten-Aminogruppen ausgenutzt. Die terminale Aminogruppe besitzt dabei mit ca. 8.0 einen niedrigeren pKa-Wert als die Seitenketten-Aminogruppen mit ca. 10,5, so dass bei neutralem pH-Wert die terminale Aminogruppe bevorzugt reagiert (Greenstein et al., 1961; Means et al., 1971). Diese Methodik erlaubt demnach eine gezielte Modifizierung N-terminaler Aminogruppen, wenn auch eine geringfügige Nebenreaktion mit den Seitenketten-Aminogruppen zu erwarten ist. Wetzel et al. (1990) führte die Acetylierung bei pH 6 in MES-Puffer durch. Für die hier durchgeführten Versuche sollte rek PrP allerdings in NaPi pH 7,2 mit 0,2% SDS vorliegen, so dass es nötig war, die Methodik auf die veränderten Bedingungen hin zu testen. Da für die Acetylierung relativ hohe Proteinkonzentrationen benötigt werden, wurde die Methode zunächst an bovinem alpha-Lactalbumin und Myoglobin getestet, was in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Die genaue Vorgehensweise ist in Kap. 2.17 erläutert. Alpha-Lactalbumin und Myoglobin wurden bei pH 7,2 in NaPi bei 0,2% SDS vorinkubiert. Die Acetylierung wurde wie in Kap. 2.17 bei einer Proteinkonzentration von 0,25 mM durchgeführt. Nach abgeschlossener Acetylierung wurde eine massenspektrometrische Messung des unverdauten Gesamt-Proteins vorgenommen.

Wie in Kap. 2.16.3 dargelegt, treten bei großen Proteinen viele hoch geladene Protein-Ionen auf. Erst nach einer computergestützten Auswertung kann die Masse des gemessenen Proteins berechnet werden. Aus diesem Grund werden hier nur diese dekonvolutionierten Spektren der Messungen gezeigt. Da die Protein-Lösung 0,2% SDS enthielt, das die MS-Messungen erheblich negativ beeinflusst, wurden die Proben über ZipTips[®]-Spitzen gereinigt. Trotz dieses Chromatographie-Schrittes konnten erst nach einem zweiten Elutionsschritt bei 80% Methanol Protein-Signale in relativ geringer Intensität detektiert werden. Beispielhaft ist hier ein dekonvolutioniertes Spektrum einer acetylierten alpha-Lactalbumin-Probe (Abb. 3.15) gezeigt.



Abb. 3.15 Nachweis der Acetylierung von bovinem alpha-Lactalbumin anhand des dekonvolutionierten ESI-MS-Übersichtsspektrums (Molekulargewicht von alpha-Lactalbumin: 14178 kDa).

Nicht modifiziertes alpha-Lactalbumin wurde bei m/z=14179 detektiert. Nach erfolgreicher Acetylierung ergibt sich eine Massenzunahme von 168 pro Jodacetylgruppe. Das Spektrum zeigt neben dem Signal des nicht modifizierten Protein-Signal vier zusätzliche Signale, die 1-4-fach acetyliertem alpha-Lactalbumin entsprechen. Der Intensität nach zu urteilen ist die doppelt acetylierte Form (m/z=14515) die häufigste Form. In ähnlichen Intensitäten treten jedoch auch die einfach und dreifach acetylierten Formen auf (m/z=14347 und 14683). Die unmodifizierte Form sowie höher acetylierte Formen sind deutlich weniger häufig. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Reaktion unter den gewählten Bedingungen durchführbar ist. In verdauten Proben konnte das tryptische Peptid von alpha-Lactalbumin, dass die N-temrinale Aminogruppe enthält, nicht detektiert werden, da es vermutlich aufgrund seine geringen Größe und seiner hydrophilen Natur in den Waschschritten der ZipTips®-Elution verloren ging (Daten nicht gezeigt). Die Messung an Myoglobin bestätigten jedoch, dass hauptsächlich der N-Terminus modifiziert wurde (Daten nicht gezeigt). Die Modifizierungsreaktion ist somit mit ca. ein bis drei Modifizierungen gering genug, um vornehmlich die terminale Aminogruppe zu blockieren.

Die Acetylierung von rek PrP wurde in gleicher Weise durchgeführt. Zur Materialersparnis wurde allerdings auf eine Messung des unverdauten Gesamtproteins verzichtet. Rek PrP wurde direkt mittels einer SDS-PAGE isoliert und durch eine tryptische In-Gel-Verdauung in Peptide gespalten. Die Peptide sollten so anhand von ESI-MS-Messungen auf die vorhandenen Modifikationen und deren genaue Position hin untersucht werden.

Anhand der gemessenen ESI-MS-Übersichtsspektren zeigte sich bereits, dass die modifizierten Peptid-Ionen nicht die erwartete zusätzliche Masse von 168 trugen, sondern eine Massendifferenz von nur 118 aufwiesen. Die Messungen an unverdautem alpha-Lactalbumin und Myoglobin zeigten zuvor jedoch, dass mit der angewendeten Methode die gewünschte Acetylierung mit der erwarteten Massendifferenz von 168 erreicht werden konnte. Da die Massendifferenz von 118 auch bei tryptisch verdauten alpha-Lactalbumin-Proben detektiert wurde (Daten nicht gezeigt), musste daher hier davon ausgegangen werden, dass die Massendifferenz von 118 erst durch den tryptischen Verdau erzeugt wurde. Da die genaue Identität der Modifizierung nicht geklärt werden konnte, wird nachfolgend allgemeiner von Modifizierung gesprochen.

In den acetylierten PrP-Proben konnte hauptsächlich das N-terminale Peptid PrP90-106 in einfach oder doppelt modifizierter Form detektiert werden (s. Abb. 3.16). Mit Hilfe von ESI-MS/MS-Messungen wurden die Modifizierungen an G90 und K101 lokalisiert (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich wurden in sehr geringen Konzentrationen auch andere modifizierte PrP-Peptid-Ionen nachgewiesen. Innerhalb eines Übersichtsspektrums können die Intensitäten der einzelnen Peptid-Ionen relativ zu einander verglichen werden. Dazu wurden die Integrale der einzelnen Peptid-Signale entsprechend summiert, so dass eine Abschätzung über deren prozentuale Anteile gemacht werden konnten.



Abb. 3.16 Nachweis der Acetylierung von PrP anhand des ESI-MS-Übersichtsspektrums nach In-Gel-Verdauung.

Diese Auswertung ergab einen Modifizierungsgrad der terminalen Aminogruppe von ca. 91%. Durch Nebenreaktionen wurden zusätzlich einzelne Lysin-Seitenketten durch Jodessigsäureanhydrid modifiziert. Dabei war K101 mit ca. 61% die am häufigsten betroffene Aminosäure. Weiterhin wurden K104 mit ca. 9%, K110 mit 44%, K185 mit 24% und K194 mit 17% derivatisiert. K106, K204 und K220 wurden nur unmodifiziert vorgefunden. Trotz dieser unerwünschten Nebenreaktionen sollte bei einem Modifizierungsgrad des N-Terminus von 91% klar werden, ob dieser für die Dimer-Vernetzung verantwortlich ist. Anderenfalls müsste die Dimer-Vernetzung nur um etwa die Hälfte reduziert werden können.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde ein Crosslink-Experiment des N-terminal blockierten PrP unter Dimer-Bedingungen, sprich 0,055% SDS, durchgeführt. Zur Kontrolle wurde jeweils unmodifiziertes PrP parallel untersucht (Abb. 3.17)

Es ist zu erkennen, dass bei einer SDS-Konzentration von 0,055% in der unmodifizierten Kontrolle die erwartete Menge Dimer (~50%) vernetzt werden konnte, während in der modifizierten Probe nur eine sehr schwache Dimer-Bande zu erkennen ist. Zum Vergleich sind zusätzlich nicht EDC-behandelte Kontrollen aufgetragen. Dass die Dimer-Vernetzung nicht komplett unterbunden werden konnte, ist dadurch zu erklären, dass noch etwa 10% des PrP bzw. der N-Termini unmodifiziert vorlagen, so dass keine vollständige Unterdrückung der Dimer-Vernetzung zu erwarten war. Wären Lysine an der intermolekularen Reaktion beteiligt, hätte die Dimer-Vernetzung nur auf etwa die Hälfte reduziert werden können, da der Modifizierungsgrad der Lysine bei maximal 61% lag. Dieses Ergebnis beweist, dass die zuvor ermittelten Crosslinks nicht nur intramolekular innerhalb eines Monomers ausgebildet werden können, sondern, dass auch die Dimere über die gleichen Kontakte zusammengehalten werden.



Abb. 3.17 Crosslink-Effizienz von acetyliertem und nicht-acetyliertem rek PrP unter Dimer-Bedingungen. Analyse durch eine SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung.

3.4 Dimere als Vorstufe zur amyloiden Fibrille

In der Diplomarbeit von J. Stöhr konnte die Bildung amyloider Fibrillen von rek PrP(90-231) basierend auf dem *in-vitro*-Konversionssystem (vgl. Kap. 1.7) durch Zugabe von 250 mM NaCl bei 0,03% SDS und sechswöchiger Inkubation erreicht werden (Stöhr, 2003; Leffers *et al.*, 2005). Allein die Zugabe von NaCl bewirkt demnach die Ausbildung amyloider Strukturen. Im Verlauf dieser Arbeit wurden in einer noch andauernden Promotionsarbeit (J. Stöhr) PrP-Dimere unter den gleichen Bedingungen, jedoch nach nur einwöchiger Inkubation, mittels analytischer Ultrazentrifugation identifiziert, die als Vorstufe in der Fibrillen-Bildung angesehen werden können. Um zu analysieren inwiefern sich diese Dimere (nachfolgend Fibrillen-Dimere genannt) von den Dimeren bei 0,055-0,07% SDS, die Vorstufen zu amorphen Aggregaten darstellen, unterscheiden, wurden die Crosslink-Analysen auf die Fibrillen-Dimere ausgeweitet.

Bei einer SDS-Konzentration von 0,03% ohne NaCl liegt rek PrP(90-231) als β strukturiertes Oligomer vor (vgl. Kap. 3.1). Mittels CD-Spektroskopie wurde in Anwesenheit von 250 mM NaCl ein deutlicher Unterschied der Sekundärstrukturanteile gemessen (s. Abb. 3.18). Ohne Zugabe von NaCl wurde, wie erwartet, bei 0,03% SDS ein Spektrum für β -strukturierte Proteine mit einem Minimum bei 218 nm gemessen. Das Spektrum bei 0,03% SDS mit 250 mM NaCl dagegen weist ein Minimum bei ca. 207 nm und ein Plateau bei etwa 220 nm auf. Diese Charakteristika weisen auf eine α -helikale Struktur mit Random-coil-Anteilen hin.



Abb. 3.18 Strukturbestimmung von rek PrP(90-231) bei 0,03% SDS mit und ohne 250 mM NaCI mittels Circulardichroismus-Messungen. Die Proben wurden auf die entsprechenden Konzentrationen eingestellt und für 7 Tage bei 25°C vor Beginn der Messung inkubiert.

Die in Abb. 3.18 dargestellten Spektren von rek PrP(90-231) bei 0,03% SDS/ 250 mM NaCl wurden erstmalig von J. Stöhr ermittelt und wurden im Rahmen dieser Arbeit reproduziert. In der Regel sollten sich nach einer einwöchigen Inkubationszeit, wie hier vorgenommen, noch keine unlöslichen Proteinaggregate in den Proben gebildet haben (mündliche Mitteilung J. Stöhr); dennoch wurden die Proben vor der CD-Messung bei 100.000 x g für eine Stunde zentrifugiert. So konnte ausgeschlossen werden, dass sich unlösliches PrP im Versuchsansatz befand.

Um die Struktur der Fibrillen-Dimere näher zu untersuchen, wurde in einem ersten Versuch überprüft, ob sie sich mit dem chemischen Crosslinker EDC verknüpfen lassen. Die Crosslink-Produkte wurden zunächst in einer SDS-PAGE aufgetrennt. Zum Vergleich wurde parallel dazu PrP bei 0,03% SDS ohne NaCl ebenfalls quervernetzt und per SDS-PAGE analysiert (Abb. 3.19).

Bei 0,03% SDS ohne NaCl ist zu erkennen (Abb. 3.19 links), dass durch die Crosslink-Reaktion viele hochmolekulare Komplexe gebildet wurden, die z.T. nicht mehr in das Trenngel einlaufen konnten. Weiterhin ist zu sehen, dass sich Dimere, Trimere, Tetramere sowie höhere Komplexe auftrennen ließen. In Anwesenheit von 250 mM NaCl zeigte sich nach Crosslink ein anderes Bild in der SDS-PAGE (Abb. 3.19 rechts). Es konnten hier keine hochmolekularen Komplexe an der Grenze von Sammel- zu Trenngel detektiert werden. Es ist ledig-

lich eine Bande auf der Höhe von ca. 32 kDa und eine Bande bei ca. 16 kDa zu erkennen, die dem PrP-Di- und Monomer entsprechen. Auffallend ist zudem, dass die Dimerbande weniger intensiv ist, als bei Dimeren, die bei 0,055-0,07% SDS gebildet wurden (vgl. Abb. 3.4).



Abb. 3.19 Analyse der EDC-Crosslink-Produkte von rek PrP bei 0,03% SDS mit und ohne Zugabe von 250 mM NaCl mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung.

Zur Bestimmung der Crosslink-Positionen der Fibrillen-Dimere bzw. -Monomere wurden diese Proben tryptisch verdaut und die resultierenden Peptide mittels ESI-LC-MS-Kopplung analysiert. Es wurde wiederum ein Vergleich von Kontroll-Proben mit den Crosslink-Proben vorgenommen. In den Übersichtsspektren dieser ESI-LC-MS-Messungen der Crosslink-Proben wurden exakt die gleichen Crosslink-Peptide detektiert, wie in EDC-Dimer- und -Monomer-Proben, die bei 0,055-0,07% SDS eingestellt wurden. Die Hauptverknüpfungspunkte wurden auch hier bei G90-E152 und G90-E196 bzw. G90-D202 gefunden. Es konnten keine neuen Crosslink-Positionen in den Fibrillen-Proben nachgewiesen werden. Das bedeutet zunächst, dass auch innerhalb der Fibrillen-Dimere die gleichen Kontaktstellen vorgelegen haben müssen wie bei Dimeren bei 0,055-0,07% SDS. Die detektierten Crosslink-Peptid-Ionen können aus Tab. 3.2 entnommen werden. Die Probe bei 0,03% SDS ohne NaCI wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht weitergehend analysiert.

Der Vergleich der Übersichtsspektren der vernetzten Fibrillen-Monomer und -Dimer-Proben zeigte jedoch deutliche Unterschiede. In den Monomer-Proben wurden die Crosslink-Peptide insgesamt in äußerst geringer Intensität, wenn überhaupt, detektiert. Besonders gut lässt sich dies an den Intensitäten der PrP90-106 und PrP90-106+152-156-Ionen zeigen (Abb. 3.20 unten). In der Tendenz galt dies jedoch für die anderen Crosslink-Peptide ebenfalls. In den Fibrillen-Dimer-Proben dagegen sind die Crosslink-Peptide in hoher Intensität nachweisbar. Der Vergleich der Signale für PrP90-106 und PrP90-106+152-156

zeigt dies wiederum sehr deutlich (Abb. 3.20 oben). Es hat demnach keine bzw. nur eine marginale intramolekulare Crosslink-Reaktion in den Monomeren stattgefunden. In Abb. 3.20 ist zu sehen, dass die Gesamtintensitäten der Monomer-Probe (ca. 2500 counts) und der Dimer-Probe (ca. 250 counts) deutlich verschieden sind. Dies lässt sich allerdings durch die verschiedenen Proteinkonzentrationen in den Gel-Banden erklären. Die Monomer-Bande enthielt hier deutlich mehr Protein (s. Abb. 3.19 rechts), was entsprechend zu einer erhöhten Intensität der Peptid-Signale im Massenspektrum führt.

Bei einem Vergleich der MS-Messungen der Crosslink-Proben bei 0,055-0,07% SDS (ohne NaCl) mit den hier dargestellten Fibrillen-Proben, wurde festgestellt, dass in den Fibrillen-Proben relativ gesehen, mehr des freien N-terminalen Peptids detektiert wurde. Mögliche Erklärungen für diese Beobachtungen werden in Kap.4.2.5 eingehender diskutiert.



Abb. 3.20 ESI-LC-MS-Übersichtsspektren der Monomere und Dimere bei 0,03% SDS/250 mM NaCl). Gezeigt ist nur der m/z-Bereich, in dem PrP90-106 und PrP90-106+152-156 detektiert werden.

3.5 Modell für ein PrP-Dimer

In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje und Frau Birte Brandt vom Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurde ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit ein Modell sowohl für Monomere mit strukturiertem Segment für PrP90-120 als auch für ein PrP-Dimer entwickelt. Die Vorgaben hierfür waren die in diesem Teil der Arbeit ermittelten Daten zur Struktur von Dimeren, sprich die gefundenen Crosslink-Positionen innerhalb der PrP-Di- und Monomere. Das erstellte Modell ist im Rahmen der Diskussion in Kap. 4.2.4 dargestellt und wird dort detailliert beschrieben.

4 Diskussion

Die Prion-Hypothese ist heute allgemein anerkannt. Die Umwandlung des zellulären PrP^C in das pathologische PrP^{Sc} ist das zentrale Ereignis im Infektionsmechanismus. Dabei nimmt der strukturelle Übergang von mehrheitlich α -helikaler Sekundärstruktur des PrP^C zu erhöhtem β -Strukturanteil des PrP^{Sc} einhergehend mit der Aggregation von PrP eine entscheidende Stellung ein. Der genaue Mechanismus der Konversion konnte bislang jedoch nicht entschlüsselt werden. Aus diesem Grund ist die strukturelle Analyse von Zwischenstufen dieses Prozesses von großer Bedeutung. Ferner ist weiterhin unklar, welche Bedeutung solchen oligomeren Intermediaten in der Pathogenese und der Neurotoxizität dabei zukommt (s. Kap. 1.2).

Das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte *in-vitro*-Konversionssystem (s. Kap. 1.7) dient als Modell für die oben beschriebenen Übergänge (Post *et al.*, 1998; Jansen *et al.*, 2001). Die Umwandlung wird in diesem System durch die Reduktion der SDS-Konzentration im submizellaren Bereich herbeigeführt. Von besonderem Interesse sind hierbei PrP-Dimere mit vorwiegend α -helikalem Sekundärstrukturanteil, die sich in diesem System stabil einstellen lassen. Sie stellen das erste Intermediat bei der Konversion dar. Die genaue Tertiär- und Quartärstruktur dieser Dimere ist bis *dato* nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die nicht-kovalenten Wechselwirkungen in solchen Komplexen zu analysieren, um mechanistische Hinweise auf deren Bildung und Struktur zu erlangen.

4.1 Chemisches Crosslinking zur Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen

Das chemische Crosslinking wird vielfach für die Analyse von Proteinkomplexen eingesetzt. Zumeist sollen so die einzelnen Wechselwirkungspartner in solchen Komplexen bestimmt werden, so dass nähere Informationen über die Funktion der Proteine und die möglichen Interaktionen mit anderen Proteinen gewonnen werden können. Das chemische Crosslinking bietet zudem auch die Möglichkeit von *in-situ*-Analysen. Für PrP wurden auf diese Weise bereits mögliche Wechselwirkungspartner identifiziert, u.a. die sogenannten N-CAMs (neural cell adhesion molecules), das APP (amyloid beta precursor protein), sowie das Chaperon Bip (Schmitt-Ulms *et al.*, 2001; Schmitt-Ulms *et al.*, 2004).

Die Strukturaufklärung von Proteinen und Proteinkomplexen ist allgemein von großer Bedeutung, da sie entscheidende Hinweise auf die Funktion eines Proteins liefern kann. Die hochauflösenden Strukturbestimmungsmethoden wie die NMR-Spektroskopie und die Röntgenstrukturanlayse gehören zu den bedeutendsten Methoden in diesem Bereich. Wenn solche Analysen nicht möglich sind, wie es z.B. bei dynamischen Strukturen der Fall ist, kann chemisches Crosslinking mit anschließender Identifizierung der vernetzten Peptide neue Erkenntnisse liefern. Es lassen sich hiermit Einblicke in flexible Bereiche gewinnen, die mit anderen Methoden nicht erfasst werden können. Durch das chemische Crosslinking werden bestimmte Aminosäuren innerhalb oder zwischen Proteinen kovalent verbunden. Die Bestimmung der exakten Positionen der so eingebrachten Bindungen liefert Distanz-Informationen der betreffenden Seitenketten, so dass Rückschlüsse auf die dreidimensionale Struktur des Proteins oder Protein-Komplexes gezogen werden können. Trotz der geringen Auflösung findet diese Methodik daher mittlerweile eine breite Anwendung zur strukturellen Charakterisierung von Proteinen und Protein-Komplexen (zum Überblick s. Sinz, 2003; Sinz, 2006).

Das chemische Crosslinking wurde in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit bereits zur Strukturanalyse von PrP 27-30, den sogenannten Prion Rods, eingesetzt (Onisko et al., 2005). Hier wurden aus Hirngewebe Scrapie-infizierter Syrischer Goldhamster aufgereinigte Prion Rods (PrP 27-30) mit Hilfe des Crosslinkers Bis(sulfosuccinimidyl)-suberat (BS³) quervernetzt und massenspektrometrisch analysiert. Bei diesem Crosslinker handelt es sich um ein homobifunktionales aminoreaktives Reagenz, das bei Quervernetzung einen Spacer der Länge 11,4 Å einfügt. Onisko et al. (2005) konnten mit diesen Versuchen die räumliche Nähe, also in der Größenordnung von 11,4 Å, der N-Termini zweier PrP-Monomere innerhalb von Prion Rods zeigen. Für die Struktur von PrP 27-30 gibt es bislang lediglich ein Modell (Govaerts et al., 2004), welches anhand elektronenmikroskopischer Daten von 2D-Kristallen erstellt wurde. Zur Bildung einer Fibrille müssen die im Modell vorgeschlagenen Trimere übereinander gestapelt werden (s. Kap. 0). Die Vernetzung zweier N-Termini ließe sich laut Onisko et al. (2005) durch eine ebensolche vertikale Assemblierung der Trimere erklären, da nur so zwei N-Termini in ausreichende Nähe kämen. Hierfür müsste allerdings das Modell angepasst werden, indem zwei Windungen der dort beschriebenen
ß-Helix entwunden werden, um die Crosslink-Daten besser erklären zu können. Trotz dieser Änderung wird das Modell der amyloiden PrP 27-30 Fibrillen durch die Arbeit von Onisko et al. (2005) also weiter untermauert. In einer weiteren Arbeit wurde Crosslinking als Methode zur Stabilisierung bestehender PrP-Aggregate (rek PrP und PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat) genutzt. Es wurde hier die Methode des photo-induzierten Crosslinking mit Hilfe von APS (Ammoniumperoxodisultat) und Ru(bpy)3²⁺ (Ruthenium(II)-trisbipyridyl-dication) eingesetzt (Piening *et al.*, 2006). Über eine radikalische Reaktion werden dabei benachbarte Aminosäuren kovalent verknüpft. Die so stabilisierten PrP-Komplexe verloren dabei nicht ihre Fähigkeit weitere PrP-Moleküle anzulagern und selbst die Infektiosität von PrP^{Sc} wurde nicht nennenswert beeinflusst. Dies war durch eine Stabilisierung der Aggregate durch Crosslinking allerdings auch nicht zu erwarten. Da das photo-induzierte Crosslinking durch die radikalische Reaktion jedoch relativ unspezifisch quervernetzt, wurde der Einsatz eines solchen Crosslink-Reagenz in dieser Arbeit jedoch als vollkommen ungeeignet betrachtet. Da in dieser Arbeit direkte Wechselwirkungen in PrP-Dimeren identifiziert werden sollten, war auch die relativ lange Distanz, die der Crosslinker BS³ überbrückt, für die strukturelle Analyse von PrP-Di- und -Monomeren, wie sie im *in-vitro*-Konversionssystem erzeugt werden, ebenfalls nicht geeignet.

Durch das sogenannte "contact-site cross-linking" werden nicht-kovalente Wechselwirkungen in Proteinen und Protein-Komplexen zu kovalenten Bindungen umgewandelt (Kunkel *et al.*, 1981). Bei dem Crosslinker EDC, (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimid Hydrochlorid), handelt es sich um einen solchen "contact-site cross-linker". EDC fixiert bestehende intra- oder intermolekulare Kontakte zwischen Amino- und Säuregruppen, die sich im Abstandsbereich einer Salzbrücke zueinander befinden. Salzbrücken weisen dabei üblicherweise einen Abstand von etwa 4 Å auf (Barlow & Thornton, 1983). EDC schien demnach für diese Arbeit das bestgeeignete Crosslink-Reagenz zu sein. Die Bestimmung der durch EDC eingeführten Crosslinks liefert somit Informationen über die direkten ionischen Wechselwirkungen, welche die PrP-Di- und -Monomere stabilisieren.

4.2 Wechselwirkungsstellen in PrP-Di- und –Monomeren

Werden Aminosäuren innerhalb von PrP vernetzt, ist zu erwarten, dass die von diesen Crosslinks betroffenen tryptischen Peptide nicht mehr einzeln im MS-Spektrum detektiert werden können, sondern mit einer entsprechend größeren Masse nachzuweisen sind. Der Versuch der Bestimmung der Crosslink-Stellen und damit der Identifikation der Wechselwirkungsstellen in den hier untersuchten PrP-Di- und -Monomeren durch statische MS-Messungen lieferte zunächst lediglich zwei Peptide, PrP195-204 und PrP90-106, die in reduzierter Intensität detektiert wurden. Anhand der Intensitätsabnahme der zugehörigen Signale wurde demzufolge vermutet, dass sie miteinander vernetzt wurden. Der direkte Nachweis der Crosslink-Peptide inklusive der beteiligten Aminosäuren gelang dann jedoch erst mit Hilfe einer ESI-LC-MS-Kopplung, die erst im Verlauf der Arbeit etabliert werden konnte. Als prominenteste Vernetzungspositionen, interessanterweise sowohl in Monomeren als auch in Dimeren, wurden G90 (N-

Terminus) und E152, sowie G90-E196 bzw. G90-D202 ermittelt (s. Kap. 3.3.3). Dies zeigt, dass auch die Struktur der monomeren Einheit und dabei insbesondere der N-terminale Bereich, der den NMR-Messungen nach flexibel zu sein scheint (vgl. Kap. 0), unter den hier verwendeten Bedingungen in stabilisierterer Form vorliegt.

Dass in statischen Messungen keine Crosslink-Peptide detektiert werden konnten, könnte u.a. daran gelegen haben, dass die Signale der Crosslink-Peptide nicht intensiv genug waren, um sie im Übersichtsspektrum nachweisen zu können. Bereits in Kontroll-Proben wichen die relativen Intensitäten einzelner PrP-Peptide einer Probe stark voneinander ab (s. Abb. 3.5). Das Signal 4 (m/z=512,29³⁺) beispielsweise, das der Sequenz PrP137-148 entspricht, war in allen Proben eines der prominentesten Signale. Das Signal 1 (m/z=456,064+), also PrP90-106, hingegen war reproduzierbar in geringerer Intensität detektierbar. Dies ist vermutlich auf die unterschiedliche Ionisierbarkeit der Peptide und damit auf deren Seguenz zurückzuführen. Zudem teilte sich das Signal von PrP90-106, wie auch die Signale der Crosslink-Peptide, auf verschiedene Ladungszustände auf, so dass die einzelnen Intensitäten der Signale entsprechend geringer waren. Die generell eher geringe Intensität von PrP90-106 dürfte sich, aufgrund der Seguenz von PrP90-106, auch in ähnlicher Form in den Crosslink-Peptiden widerspiegeln, die ja alle dieses Fragment enthielten. Zudem ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Crosslink-Peptide in Übersichtsspektren der statischen Messungen durch andere Peptid-Signale überlagert wurden. Das vierfach geladene Peptid PrP111-136 beispielsweise wird bei einem m/z-Wert von 591,44⁴⁺ detektiert, so dass dieses wahrscheinlich das Crosslink-Peptid PrP90-106+195-204 bei einem m/z-Wert von 591,92⁵⁺ überdeckt hat. Ähnliches kann auch für die anderen Crosslink-Peptid-Signale angenommen werden. Denkbar ist prinzipiell auch, dass die tryptische Verdauung durch die Quervernetzung der PrP-Struktur, die so nicht mehr vollständig denaturierbar sein dürfte, behindert wird, so dass dadurch die Konzentration der Crosslink-Peptide vermindert war. Es waren zwar keine Lysine, nach denen Cterminal der Trypsin-Schnitt erfolgt, an den Crosslinks beteiligt, aber durch die Isopeptidbindungen könnte die Struktur derart verändert worden sein, dass Trypsin nicht mehr alle Schnittstellen gleich gut erreichen kann.

Die LC-Kopplung erlaubte die Auftrennung der Peptide nach der Verdauung, so dass die Peptide einzeln im Massenspektrometer detektiert werden konnten. Mit der LC-Kopplung war es daher möglich die Komplexität der Peptidgemische entscheidend zu reduzieren, so dass wesentlich weniger Überlagerungen auftraten und auch Signalunterdrückungen weitgehend aufgehoben waren. Die Peptide konnten so optimal detektiert werden. Für die hier untersuchten Proben konnte erst so die Gesamtheit der Peptide im Ansatz, und damit auch die Crosslink-Peptide, tatsächlich erfasst werden (vgl. Kap. 3.3.3).

4.2.1 Zur Struktur des PrP-Monomers

Bei den gefundenen Crosslink-Peptiden ist besonders die Beteiligung des N-Terminus interessant, da für die gesamte N-terminale Domäne bis Aminosäure 125 anhand von NMR-Messungen an rek SHaPrP(90-231) und Prion-Proteinen anderer Spezies eine hohe Flexibilität gezeigt werden konnte (Donne *et al.*, 1997; James *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999). Trotz der Flexibilität ist diese Region jedoch nicht komplett unstrukturiert. Neben der NMR-Struktur wurde kürzlich auch die Kristallstruktur von ovinem PrP aufgeklärt (Haire *et al.*, 2004). Die NMR-Struktur wurde durch diese Arbeit weitgehend bestätigt. Über die N-terminale Region konnte jedoch auch in den Röntgenstrukturanalysen keine Aussage getroffen werden.

Die NMR-Messungen wurden bei pH 5,2 durchgeführt und können demnach nur als Anhaltspunkt für die hier untersuchten PrP-Strukturen bei pH 7,2 und <0,1 % SDS dienen. Da jedoch keine alternative Struktur für PrP-Monomere bekannt ist, ist die NMR-Struktur damit auch der einzige Anhaltspunkt für eine Tertiärstruktur der hier untersuchten PrP-Spezies. Zudem wurde aufgrund der NMR-Messungen auch ein Dimer, welches im Gleichgewicht mit dem Monomer vorliegt, postuliert (James et al., 1997). In dieser Arbeit wurde anhand der NMR-Struktur die Region im PrP ermittelt, mit der der N-Terminus bevorzugt wechselwirkt. In Abb. 4.1 sind diese reaktiven bzw. die nicht-reaktiven Gruppen der in dieser Arbeit analysierten Crosslink-Reaktion in der bekannten NMR-Struktur nach Liu et al. (1999) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die reaktiven sauren Aminosäuren, hier in rot dargestellt, laut NMR-Struktur in einem räumlich begrenzten Bereich befinden. Die nicht-reaktiven Säuregruppen, gelb markiert, verteilen sich dagegen über den gesamten globulären Bereich. Dies zeigt, dass der N-Terminus bevorzugt eine bestimmte Region des globulären Teils erreichen kann, so dass angenommen werden kann, dass die N-terminale Domäne unter den hier gewählten Bedingungen zumindest einen Teil der Flexibilität eingebüßt hat und auch innerhalb des Monomers an Struktur gewonnen hat.

Obwohl die oben genannten Vernetzungspositionen (G90-E152, G90-E196, G90-D202) die prominentesten Interaktionsstellen innerhalb der PrP-Monomere (und auch Dimere) darstellten, wurden vereinzelt weitere Crosslink-Positionen des N-Terminus nachgewiesen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass der N-Terminus noch immer ein gewisses Maß an Beweglichkeit aufweist, wenn auch eingeschränkt, und so z.T. strukturunspezifisch vernetzt wurde. Die dominierende Wechselwirkung war aufgrund der Intensitätsverhältnisse jedoch die Interaktion zwischen G90 und E152, neben G90-E196 und G90-D202.

Die Wechselwirkung von G90 mit E152 wurde in einer anderen Arbeit anhand von Antikörper-Bindestudien schon einmal für SHaPrP(90-231)-Monomere bei pH >5,2 postuliert (Matsunaga *et al.*, 2001). Es konnte dort anhand von ELISA-

Studien gezeigt werden, dass der rekombinante Fab-Antikörper D13 bei pH >5,2 nicht an sein Epitop (PrP94-105) bindet; bei pH <4,7 hingegen ist das Epitop wieder zugänglich. Dies lässt vermuten, dass das N-terminale Epitop durch seine strukturelle Anordnung bei einem pH >5,2 für D13 nicht erreichbar ist. Eine ähnliche pH-Abhängigkeit konnte auch für den monoklonalen Antikörper MA1-750 gezeigt werden, dessen Epitop die Aminosäuren 146-154 umfasst. Für den 6H4-Antikörper mit dem Epitop bei 144-150 konnte keine solche pH-Abhängigkeit beobachtet werden. Die Autoren schlossen daher daraus, dass die N-terminale Region bei pH-Werten größer 5,2 eine schwache Affinität zu den Säuregruppen in der Region 146-154 und hier insbesondere zu E152 aufweist.

Crosslinks mit Lysin-Seitenketten wurden in dieser Arbeit nicht gefunden, obwohl laut NMR-Struktur besonders zwischen E146 und K204 der Abstand mit ca. 4,8 Å für eine Crosslink-Reaktion ideal wäre. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die untersuchten Strukturen in diesem Punkt nicht mit der NMR-Struktur übereinstimmten bzw. die hier untersuchten Strukturen eine größere Dynamik aufwiesen. Im Zusammenhang mit den Crosslink-Experimenten muss dazu auch gesagt werden, dass der N-Terminus aufgrund seines geringeren pK_a -Wertes ($pK_a \approx 8$) im Vergleich zu dem der ϵ -Aminogruppen der Lysine ($pK_a \approx 10$) insgesamt reaktiver ist als die Seitenketten-Aminogruppen. Das bedeutet, dass der N-Terminus, sobald er in erreichbarer Nähe ist, auch mit einer durch EDC aktivierten Säuregruppe reagieren wird. Die vereinzelt detektierten Crosslinks des N-Terminus mit anderen als den oben beschriebenen Säuregruppen wären so erklärbar. Ein geringer Anteil solcher Nebenreaktionen konnte somit auch von vorne herein nicht ausgeschlossen werden.



Abb. 4.1 Darstellung der reaktiven (links) und nicht-reaktiven (rechts) Gruppen der EDC-Crosslink-Reaktion anhand der NMR-Struktur (Liu *et al.*, 1999). In rot sind die gefundenen Crosslink-Positionen (E142, E196, D202) mit dem N-Terminus dargestellt. Die nicht-reaktiven Aminosäuren sind gelb markiert. Orange: N-Terminus.

4.2.2 Zur Struktur des PrP-Dimers

In Röntgenstrukturanalysen wurde zwar die Struktur eines humanen PrP-Dimers ermittelt, allerdings ist die Bedeutung dieser Dimere bislang nicht geklärt (Knaus *et al.*, 2001). Die dort ermittelte Struktur zeigte, dass die Dimere über einen Domain-Swapping-Mechanismus gebildet wurden, indem die Positionen von Helix 3 zwischen den beiden Monomeren ausgetauscht wurde. Für diese Umstrukturierung musste die Disulfid-Brücke jedoch reduziert und intermolekular neu gebildet werden. Dies traf für die in dieser Arbeit untersuchten Dimere jedoch nicht zu, denn unter nicht-reduzierenden Bedingungen konnten nach einer SDS-PAGE keine Dimere detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Für PrP^{Sc} konnte zudem gezeigt werden, dass die Disulfid-Brücke intramolekular intakt bleibt (Welker *et al.*, 2002), so dass die Kristall-Dimere höchstwahrscheinlich keine Relevanz als Konversionsintermediat haben. Abgesehen von dem Domain-Swapping besteht in der Kristallstruktur (Knaus *et al.*, 2001) des humanen Dimers jedoch kein wesentlicher Unterschied zur NMR-Struktur von SHaPrP (Liu *et al.*, 1999).

Für die hier untersuchten Dimere wurde mittels CD-Spektroskopie eine weitgehend α -helikale Sekundärstruktur ermittelt, wie es auch die NMR-Messungen an rek PrP (Monomeren) zeigen. Daher wurde angenommen, dass sich die Struktur der Monomere innerhalb der Dimere insgesamt nicht grundlegend von der NMR-Struktur unterscheidet. Wahrscheinlich ist jedoch, dass die Tertiärstruktur durch die Anwesenheit des SDS leicht aufgelockert und damit etwas dynamischer ist. Eine Denaturierung des Proteins ist bei den hier verwendeten submizellaren Konzentrationen jedoch nicht zu erwarten (Pertinhez *et al.*, 2002). Im Gegenteil, SDS scheint in diesen Konzentrationen die α -helikale Struktur sogar zu stabilisieren (Leffers *et al.*, 2004).

Die Crosslinks des N-Terminus konzentrierten sich auch in Dimeren auf die gleichen sauren Aminosäuren im globulären Teil des Proteins wie im Monomer, die laut NMR-Struktur in räumlicher Nähe zueinander liegen (vgl. Abb. 4.1). Das bedeutet weiterhin, dass sich diese Regionen auch im Dimer in räumlicher Nähe befinden müssten, um eine intermolekulare Vernetzung zu ermöglichen. Um die Crosslink-Reaktion zu erlauben, muss sich der N-Terminus über einen bestimmten Zeitraum an der entsprechenden Position befunden haben und dort eine elektrostatische Wechselwirkung mit den Säuregruppen eingegangen sein. Dass die Crosslink-Reaktion nicht völlig unspezifisch erfolgte, weil der N-Terminus sich nur sehr kurzfristig an den entsprechenden Positionen befand, zeigen die hohe Reproduzierbarkeit und die weitgehende Beschränkung der Crosslinks auf die beschriebenen Aminosäuren.

4.2.3 Inter- oder intramolekulare Interaktion?

Die identifizierten Crosslinks wurden sowohl in PrP-Mono- als auch -Dimeren detektiert, so dass zunächst nicht eindeutig entschieden werden konnte, ob die beobachteten Crosslinks nur intra- oder auch intermolekular ausgebildet wurden. Nach gezielter Modifizierung des N-Terminus, der ja an allen Crosslinks beteiligt war, war die Vernetzung der Dimere unterbunden (s. Kap. 3.3.4). Dies macht deutlich, dass die Dimere intermolekular über mindestens einen N-Terminus vernetzt wurden. Anderenfalls hätte sich die Vernetzung der Dimere nicht unterdrücken lassen dürfen. Der N-Terminus des anderen Monomers kann prinzipiell ebenfalls intermolekular oder intramolekular vernetzt sein oder aber frei vorliegen. Wie hoch der intramolekulare Vernetzungsgrad innerhalb der Dimere tatsächlich aussah, konnte anhand der hier durchgeführten Analysen nicht bestimmt werden. Die deutlich verbreiterten Gelbanden der guervernetzten Diund Monomere (vgl. Kap. 3.2) könnten allerdings ein Hinweis darauf sein, dass der Vernetzungsgrad, ob nun intra- oder intermolekular, in den Di- und Monomeren relativ hoch war. Die Proteine wären damit nicht mehr komplett denaturierbar bzw. es könnten sich zirkuläre Strukturen gebildet haben, was zu einem heterogenen Laufverhalten der Proteine in der SDS-PAGE und damit zu verbreiterten Banden führen kann. Ein hoher Vernetzungsgrad wurde zudem auch aufgrund der LC-MS-Messungen vermutet, in denen sich der freie N-Terminus in nur noch sehr geringer Intensität nachweisen ließ.

Wahrscheinlich stehen die intra- und intermolekulare Reaktion in Konkurrenz zueinander, was aufgrund der relativ niedrigen Ausbeute an quervernetztem Dimer (s. Kap. 3.2) gefolgert werden kann. Läuft die intramolekulare Reaktion dabei bevorzugt ab, werden die vernetzten Monomere dem Gleichgewicht entzogen, so dass ein erheblicher Teil der zuvor vorhandenen Dimere nicht intermolekular vernetzt würde. Die Dimere könnten dann während der SDS-PAGE dissoziieren, was bei den hier durchgeführten Crosslink-Experimenten *de facto* beobachtet wurde. Um sowohl die intra- als auch die intermolekulare Reaktion unter gleichen strukturellen Gegebenheiten zu erlauben, müssen die Monomere innerhalb der Dimere so angeordnet sein, dass die betreffenden Seitenketten in unmittelbarer Nachbarschaft zu einander stehen, also sowohl innerhalb eines Monomers, als auch zwischen zwei Monomeren.

4.2.4 Modell für ein PrP-Dimer

Die hier beschriebenen Daten zur strukturellen Analyse der PrP-Dimere machten deutlich, dass die gesamte N-terminale Domäne unter den gegebenen Bedingungen an Struktur gewonnen haben muss, so dass ein neues Modell für die N-terminale Domäne entworfen werden musste. In Kooperation mit Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje und Frau Birte Brandt vom Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) wurde aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten Strukturinformationen ein Modell für ein PrP-Dimer entworfen, dass die experimentellen Daten bestmöglich widerspiegelt. Als Grundlage wurde hier die zur Verfügung stehende NMR-Struktur (Liu *et al.*, 1999; 1B10.pdb) verwendet, auch wenn diese u.U. nicht alle Aspekte der Dimer-Struktur erklärt.

Um ein PrP-Dimer-Modell zu entwickeln, das sich mit den hier gemessenen Daten vereinbaren lässt, wurde zunächst ein Modell für ein PrP-Monomer erzeugt. Hierfür wurde für die gesamte N-terminale Domäne, also G90-G124 eine potentielle Struktur mit Hilfe des Loop-Search-Modules im Programm Sybyl7.1 (vgl. Kap. 2.18) ermittelt (s. Abb. 4.2, links). Daraufhin wurde die prominenteste experimentell beobachtete kovalente Bindung der N-terminalen Aminogruppe G90 mit E152 in silico erzeugt, da diese die dominierende Wechselwirkung in den PrP-Dimeren war. Die N-terminale Domäne bildet so eine Art Schlaufe, die auf den globulären Teil zurückfaltet und eine Reihe von Tertiärkontakten ausbildet. Mit Hilfe von Molekül-Dynamik-Simulationen (MDS) unter physiologischen Bedingungen wurde überprüft, ob die so erzeugte Struktur auch ohne Vorhandensein einer kovalenten Bindung an G90-E152 stabil bleibt. Hierfür wurde die Bindung während der Simulation gelöst und die Dynamik des Proteins über einen Zeitraum von 4000 ps untersucht. Es zeigte sich, dass die gebildete Struktur auch stabil bleibt, wenn keine Zwänge durch die kovalente Bindung auf die Struktur ausgeübt werden. Der mittlere Abstand der beiden zuvor vernetzten Aminosäuren entsprach mit 5 Å dem einer Salzbrücke. Bei der entworfenen Struktur handelte es sich demnach um eine sehr plausible Tertiärstruktur.

Das Modell für das PrP-Dimer in Abb. 4.2 (rechts) wurde anhand des links dargestellten Monomer-Modells entwickelt. Hierfür wurde eine Durchschnittsstruktur des Monomers zwischen 3000-4000 ps verwendet. Die Anordnung der Monomere wurde so gewählt, dass sowohl die intra- als auch die intermolekulare Vernetzung möglich erschien. Der Abstand der Aminosäuren G90 und E152 war anfänglich etwa 10 Å. Dieser Abstand wurde mit Hilfe von "distance constraints" über einen Zeitraum von 1350 ps bis auf 3,5 Å angenähert. In Molekül-Dynamik-Simulationen wurden die Rückhaltekräfte, die diesen Abstand forcierten, dann schrittweise zurückgenommen. Aus diesen Simulationen ging hervor, dass der Abstand von G90 zu E152 nach Lösung der position restraints innerhalb eines Monomers (intramolekular) in 82% der Strukturen über den untersuchten Zeitraum von 7500 ps unter 6,5 Å blieb und damit klein genug war, um die Crosslinks zu erlauben. Zwischen zwei Monomeren (intermolekular) ist der Abstand zwar im Mittel größer, aber im untersuchten Zeitraum traten auch immer wieder Strukturen auf, in denen der Abstand auf unter 6,5 Å reduziert war. Die intramolekulare Reaktion sollte demnach bevorzugt ablaufen. Die Gesamtwechselwirkungsenergie, also Coulomb- und Lennard-Jones-Energie, des Dimers lag am Ende der Simulationen mit –988 kJ/mol sogar sehr viel günstiger als zu Beginn der Simulationen.

Das zeigt deutlich, dass sowohl die intramolekulare Vernetzung der Monomere als auch die intermolekulare Vernetzung der Dimere mit dem Modell vereinbar sind. Die intramolekulare Reaktion wäre dem Modell nach sogar bevorzugt, was auch anhand der experimentellen Daten vermutet wurde. Das erstellte Modell beschreibt damit nahezu alle Aspekte der experimentell untersuchten Dimere und stellt das bestmögliche Modell für ein PrP-Dimer dar.



Abb. 4.2 PrP-Monomer-Modell (links) und das daraus erstellte PrP-Dimer (rechts). Als Grundlage diente die NMR-Struktur nach Liu *et al.* (1999). Im Monomer ist in blau das Modell der N-terminalen Domäne dargestellt. Die Modelle wurden von Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje und Frau Birte Brandt am Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse erstellt.

4.2.5 Dimere als Aggregationsintermediate

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den Dimeren bei 0,055-0,07% SDS auch Dimere bei 0,03% SDS/250 mM NaCl untersucht. Die Dimere bei 0,055-0,07% SDS stellen dabei nach derzeitigem Wissensstand ein Intermediat der Bildung von amorphen Aggregaten dar. Die Dimere bei 0,03% SDS/ 250 mM NaCl treten als Vorstufe von amyloiden Fibrillen auf, da sie bei langer Inkubation in amyloide Fibrillen überführt werden können. Bei dem Vergleich dieser beiden Dimerformen stellte sich überraschenderweise heraus, dass in beiden Dimeren die gleichen Crosslinkstellen gefunden wurden, und damit auch die gleichen Wechselwirkungen in den verschiedenen Dimeren vorgelegen haben müssen. Dies zeigt, dass sich die Struktur der Dimere offenbar nicht grundlegend unterschied, auch wenn den CD-Spektren nach zu urteilen die

Dimere bei 0,03% SDS/250 mM NaCl einen leicht erhöhten Anteil an Randomcoil-Struktur aufwiesen (vgl. Kap. 3.1 und Kap. 3.4).

Aus den Crosslink-Experimenten ging hervor, dass die Dimere bei 0,03% SDS/250 mM NaCl zudem einen deutlich geringeren Vernetzungsgrad der N-Termini zeigen, was der Vergleich der relativen Signal-Intensitäten in MS-Messung des freien und des verknüpften N-Terminus in diesen Proben deutlich macht (s. Kap. 3.4). Auf Basis der CD- und Crosslink-Daten muss daher in Betracht gezogen werden, dass die N-terminale Domäne in Anwesenheit von NaCl eine sehr viel größere Flexibilität besitzt. Dies ließe sich u.a. durch eine Reduzierung von elektrostatischen Wechselwirkungen durch die Gegenwart von NaCl erklären. Erstaunlich ist dennoch, dass die Wechselwirkung zwischen G90 und E152 bzw. E196 und D202 nicht vollständig aufgehoben war. Da durch die relativ hohe Salzkonzentration auch die kritische mizellare Konzentration von SDS verschoben wird, ist es jedoch auch denkbar, dass sich bereits SDS-Mizellen bildeten und so PrP teildenaturiert wurde.

Eine teilentfaltete Struktur bei 0,03% SDS/250 mM NaCl, wie sie anhand der CD- und Crosslink-Daten identifiziert wurde, entspräche dem Konversionssystem nach dem intermediären PrP*-Zustand, über den offenbar die Bildung amyloider Fibrillen erst möglich ist (Kap. 1.7). Aus Dimeren bei 0,055-0,07% SDS, in denen die N-terminale Domäne augenscheinlich strukturierter ist, könnte PrP* nicht oder nur sehr langsam gebildet werden, so dass die Fibrillenbildung unterdrückt ist. Eine rigidere Struktur der Dimere könnte auch eine Erklärung für die bereits beschriebene langsame Gleichgewichtseinstellung zwischen α -helikalen und β -strukturierten Zuständen im *in-vitro*-Konversionssystem darstellen (Leffers et al., 2004). Für die Initiation des Konversion-Prozesses, sowohl zu amorphen Aggregaten als auch zu amyloiden Fibrillen, wäre demzufolge eine deutliche Zunahme der Flexibilität der N-terminalen Region erforderlich. Diese Hypothese wird darüber hinaus durch die Ergebnisse der vorangegangenen Diplomarbeit zusätzlich untermauert (Kaimann, 2002). Dort konnte gezeigt werden, dass durch die Quervernetzung der Di- und Monomere mit EDC die Konversion von α -helikalen zu β -strukturierten Formen von rek PrP unterbunden wird. Da die Quervernetzung unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurde, lässt sich anhand der Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass auch dort die Vernetzungen über den N-Terminus erfolgten. Der N-Terminus ist somit in den Di- und Monomeren weitgehend blockiert. Die Interaktionen des N-Terminus müssten sich demnach für eine Umfaltung zunächst wieder lösen. Dies gibt einen bedeutenden Hinweis auf die Wichtigkeit der N-terminalen Region, sprich die Region ab G90 im N-terminal verkürzten PrP(90-231), für die Konversion.

Dass die N-terminale Region von PrP(90-231) eine entscheidende Rolle im Konversionsprozess spielt, konnte auch aus einer ganzen Reihe von anderen Arbeiten geschlossen werden. Das Modell von PrP 27-30, das anhand elektronenmikroskopischer Daten aus 2D-Kristallen erstellt wurde, zeigt beispielsweise, dass der gesamte N-terminale Teil des PrP, im Vergleich zur bekannten NMR-Struktur, strukturell verschieden ist (Govaerts et al., 2004; vgl. Kap. 0). Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass die Region 90-145 in die Interaktion von PrP^C und PrP^{Sc} involviert ist (Kaneko *et al.*, 1995; Kaneko *et al.*, 1997) und monoklonale Antikörper gegen die N-terminale Domäne (inklusive Helix 1) konnten die PrP^{Sc}-Replikation in infizierten Zellkulturen inhibieren (Peretz et al., 2001). Die besten Ergebnisse zeigten in diesen Studien die Fab-Fragmente D18 und ebenfalls D13, die an die Regionen 132-156 bzw. 94-103 binden. Dies zeigt, dass gerade die Dynamik bzw. Zugänglichkeit dieser Region entscheidend dafür ist, ob es zur Konversion kommen kann oder nicht. Fehlt diese Region ganz, ist offenbar eine Replikation von PrPSc unmöglich, denn transgene Mäuse, die eine PrP-Deletionsmutante exprimieren, der der N-terminale Bereich bis Aminosäure 106 fehlt, können nicht mit Scrapie infiziert werden (Weissmann, 1999; Flechsig et al., 2000). Aus Dynamik-Simulationen konnte weiterhin die Wichtigkeit des N-terminalen Teils von PrP für die PrP^{Sc}-Replikation abgeleitet werden (Bennion et al., 2004). In dieser Arbeit wurden mechanistische Hinweise zur protektiven Wirkung von Trimethylamin N-oxid (TMAO) gesucht. Für TMAO konnte zuvor experimentell gezeigt werden, dass es, als chemisches Chaperon, die Bildung von PrP^{Sc} in Scrapie-infizierten Maus-Neuroblastoma-Zellen inhibiert (Tatzelt et al., 1996). Die Dynamik-Rechnungen ergaben, dass in Anwesenheit von TMAO die N-terminale Domäne (hier Aminosäuren 111-124) in einer sogenannten Ω -Schlaufe auf die globuläre Struktur zurückfaltet und so möglicherweise die Replikation von PrP^{Sc} verhindert wird.

Ein möglicher Schluss aus den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen experimentellen Daten könnte daher sein, dass die Wechselwirkung der N-terminalen Region mit dem globulären Teil des PrP die native α -helikale Struktur, inklusive der hier analysierten α -helikalen Dimere (0,055-0,07% SDS), stabilisiert und so die Bildung von β -strukturierten Aggregaten verhindert bzw. verlangsamt. Erst nach einer Teildenaturierung der N-terminalen Domäne wäre demnach die Bildung von amyloiden Fibrillen begünstigt. Abb. 4.3 verdeutlicht diese Vorstellung schematisch. In der α -helikalen stabilisierten Form (1) faltet der N-Terminus auf den globulären Teil zurück. Im teildenaturierten Zustand (2) liegt ein Gleichgewicht von Monomeren und Dimeren vor, die sich zu einem Trimer (3) assemblieren können. Das Trimer entspräche hier dem PrP^{Sc}-Modell nach Govaerts *et al.* (2004) (vgl. Kap. 0, Abb. 1.5). Erst das Trimer bildet die Struktureinheit, aus der sich die amyloide Fibrille bildet (4).



 Abb. 4.3 Modell zur Ausbildung amyloider Fibrillen durch Teildenaturierung der Nterminalen Region. (1) Dunkelgrün: N-Terminus ist im Dimer stabilisiert. Hellgrün: globulärer α-Helix-dominierterTeil (2) Orange: N-Terminus ist teildenaturiert. Es liegt ein Gleichgewicht von Monomer und Dimer vor. (3) Monomer und Dimer bilden ein β-Struktur-dominiertes Trimer. Rot: Verbleibenden α-Helices. Orange: N-terminale Domäne ist zur β-Helix umgefaltet. Mehrere Trimere können sich zur Fibrille assemblieren (4).

4.3 Bedeutung der Dimere

In allen bislang vorgeschlagenen Replikations-Modellen ist die Wechselwirkung von PrP^C und PrP^{Sc} von entscheidender Bedeutung (vgl. Kap. 0). Ob diese Interaktion tatsächlich die Bildung eines Dimers nach sich zieht, wie es nach dem Heterodimer-Modell zu erwarten ist, ist jedoch nicht geklärt. Fest steht allerdings, dass anhand einer ganzen Reihe von Studien die Existenz eines dimeren Zustands von PrP belegt ist. Für PrP aus Hirnhomogenat konnte ein PrP-Dimer mit Hilfe verschiedener Techniken nachgewiesen werden (Meyer *et al.*, 2000). In Zellkulturen von Maus-Neuroblastoma-Zellen konnten PrP-Moleküle der Größe 60 kDa detektiert werden, bei denen es sich vermutlich um quervernetzte PrP-Dimere handelte (Priola *et al.*, 1995). Diese Proteine waren Proteinase-K-sensitiv und bildeten große Aggregate nach *in vitro* Konversion nach Kocisko *et al.* (1995). Es wurde daher vermutet, dass es sich hierbei um einen Zwischenzustand bei der Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc} handelte.

Weiterhin ist bis heute offen, ob nicht Intermediate für die Pathogenität verantwortlich sind, wie es einige Studien vermuten lassen (Chiesa *et al.*, 2001; Silveira *et al.*, 2005; Novitskaya *et al.*, 2006). Dimere könnten demnach ebenfalls als neurotoxische Spezies in Frage kommen. Die Wichtigkeit von Intermediaten des Aggregationsprozess für die Pathogenese wird zudem dadurch klar, dass trotz der meist zu beobachtenden Korrelation zwischen der PrP^{Sc}-Akkumulation und der Neuropathologie auch der Fall auftreten kann, dass in Anwesenheit großer Mengen PrP^{Sc} die neuronalen Veränderungen der betroffenen Hirnregion sehr gering bis nicht nachweisbar sind (Hayward *et al.*, 1994; Parchi *et al.*, 1995).

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit konnte die Methode des chemischen Crosslinkings in Kombination mit der massenspektrometrischen Bestimmung der vernetzten Aminosäuren erfolgreich zu Strukturuntersuchungen von PrP-Dimeren und PrP-Monomen genutzt werden. Mit dieser Methodik steht nun eine Analysetechnik zur Verfügung, mit Hilfe derer auch die Struktur von aggregierten, großen und damit unlöslichen Protein-Komplexen, an denen die gängigen Strukturanalysemethoden wie NMR-Spektroskopie und Röntgenstrukturanalyse oft scheitern, untersucht werden können. Trotz der geringen Auflösung dieser Methode können somit wertvolle Hinweise auf die strukturelle Anordnung der PrP-Moleküle innerhalb einer Aggregatstruktur gewonnen werden. Dies könnte auch die Strukturen von amyloiden Fibrillen und unlöslichen Oligomeren näher beleuchten. Dies besonders im Hinblick darauf, dass die exakte dreidimensionale Struktur von PrP^{Sc} bzw. PrP 27-30 noch nicht bekannt ist.

Die Aufklärung der Interaktionsstellen in PrP-Aggregaten liefert zudem wertvolle Hinweise auf mögliche therapeutische Ansätze. Bei Kenntnis der Wechselwirkungsstellen zwischen den PrP-Molekülen ließen sich leichter Substanzen entwickeln, die die Struktur von PrP^{Sc} wieder auflösen können bzw. die dessen Bildung von vorne herein inhibieren.

In Anbetracht der Tatsache, dass auch für PrP^C die Existenz eines Dimers beschrieben wurde (Meyer *et al.*, 2000), welches möglicherweise eine Vorstufe der *in-vivo*-Konversion darstellt, ließe sich die Crosslink-Methode zudem auf dieses natürliche PrP ausweiten, um die dort gefundenen Dimere und deren Wechselwirkungen näher zu charakterisieren.

5 Zusammenfassung

Unter dem Begriff Prion-Krankheiten, oder Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE), werden eine Reihe lethaler neurodegenerativer Krankheiten zusammengefasst. Die Erreger dieser Krankheiten, die Prionen, bestehen hauptsächlich, wenn nicht sogar ausschließlich, aus dem sogenannten Prion-Protein (PrP). Die aggregatbildende pathogene Isoform des Prion-Proteins (PrP^{Sc}) unterscheidet sich vom zellulären nicht infektiösen Prion-Protein (PrP^C) u.a. in der Sekundärstruktur, so dass die Konformationsumwandlung des α -Helix-dominierten PrP^C in das β -Faltblatt-dominierte PrP^{Sc} das entscheidende Ereignis in der Bildung von infektiösem PrP^{Sc} darstellt.

Diese Umwandlung kann mittels eines *in-vitro*-Systems untersucht werden, bei dem in Abhängigkeit von submizellaren Konzentrationen von SDS der Strukturübergang von PrP induziert und Zwischenstufen eingestellt werden können. Mit Hilfe dieses Systems wurden als frühe stabile Intermediate des Übergangs und der Bildung amorpher Aggregate u.a. α -helikale Dimere gefunden, deren tatsächliche Tertiär- und Quartärstruktur bislang nicht geklärt ist. Um diesen initialen Schritt der Dimerbildung strukturell und mechanistisch aufzuklären, sollten die Dimere mit Hilfe des chemischen Crosslinkers EDC kovalent verbunden werden. Durch diese Reaktion werden inter- oder intramolekulare Isopeptidbindungen aus vorherigen Salzbrücken, also zwischen Lysin- und Aspartat- oder Glutamat-Seitenketten, erzeugt.

In dieser Arbeit wurden diese neuen Isopeptidbindungen in PrP-Di- und -Monomeren mittels tryptischer Verdauung und anschließender massenspektrometrischer Analysen exakt bestimmt. In Monomeren und Dimeren konnten Crosslink-Positionen, sprich vorherige nicht-kovalente Interaktionen, zwischen dem bislang als flexibel betrachteten N-Terminus und drei sauren Aminosäuren im globulären Teil von PrP benannt werden. Analysen an dimeren Vorstufen der PrP-Fibrillogenese, die im *in-vitro*-System durch NaCI-Zugabe eingestellt wurden, zeigten identische Interaktionen zu den zuvor analysierten Dimeren mit dem Unterschied, dass die N-terminale Domäne sehr viel dynamischer war, zu erkennen an dem relativ geringen Vernetzungsgrad. Diese Flexibilität ist somit entscheidend für die Bildung amyloider Fibrillen.

Anhand dieser Ergebnisse wurde durch molekulare Modellierung in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Höltje ein neues Strukturmodell speziell für die N-terminale Domäne in PrP-Monomeren und -Dimeren erstellt. Die Fibrillogenese von PrP wird anhand eines neuen Modells diskutiert, bei dem die N-terminale Region die als nativ betrachtete α -helikale Struktur stabilisiert und erst bei erhöhter Dynamik des N-Terminus die Umwandlung zu amyloiden β strukturierten Fibrillen möglich wird.

Summary

Prion diseases or transmissible spongiforme encephalopathies are lethal neurodegenerative diseases which can be of genetic, sporadic or infectious origin. The infectious agents of these diseases, namely prions, are composed largely, if not entirely, of the so called Prion Protein (PrP). The aggregated pathological isoform of the Prion Protein (PrP^{Sc}) differs from the cellular Prion Protein (PrP^C) in its secondary structure. Therefore the conformational transition from the α -helikal PrP^C into β -structured PrP^{Sc} is the fundamental event in the formation of infectious PrP^{Sc}.

This transition can be studied in an *in vitro* system which utilizes submicellar concentrations of SDS to induce the structural conversion of PrP. Using this system stable intermediates in the formation of amorphous aggregates in form of α -helical dimers can be generated. The exact tertiary and quartenary structure of these dimers is still unclear. To resolve structurally and mechanistically this initial step of dimerization the dimers were covalently cross-linked using the chemical cross-linker EDC. In this reaction inter- and intramolecular isopeptide bonds of previously existing salt bridges, i.e. between lysine- and aspartate- or glutamate-residues, are generated.

In this work the newly formed isopeptide bonds in PrP-dimers and -monomers were exactly determined using tryptic digestion and subsequent mass spectrometrical analysis. In monomers and dimers cross-linking positions, i.e. previous non-covalent interactions, between the so far considered as flexible N-terminus and three acidic aminoacids in the globular part of PrP were identified. The analysis of dimeric intermediates in amyloid fibril formation of the Prion Protein generated in the *in-vitro*-system by the addition of NaCl showed the same interaction sites as found in the dimers analysed before. However, under these conditions decreased cross-linking rates showed that the N-terminal domain is much more dynamic. This flexibility of the N-terminal domain is thus crucial for amyloid fibril formation.

Based on these results using molecular modelling techniques, in cooperation with the group of Prof. Höltje, a new structural model for PrP-monomers and dimers was established. This model takes specifically the N-terminal domain into account. Amyloid fibril formation is discussed by means of a new model in which the N-terminal region stabilizes the α -helical structure and transition to amyloid fibrils is not possible until the N-terminus displays an increased dynamic.

6 Literatur

- Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A. & Clarke, M. C. (1967) Does the agent of scrapie replicate without nucleic acids? *Nature*, **214**, 764-766
- Anderson, R. M., Donnelly, C. A., Ferguson, N. M., Woolhouse, M. E., Watt, C. J., Udy, H. J., MaWhinney, S., Dunstan, S. P., Southwood, T. R., Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., Hoinville, L. J., Hillerton, J. E., Austin, A. R. & Wells, G. A. (1996) Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle. *Nature*, 382, 779-788
- Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, **181**, 223-230
- Barlow, D. J. & Thornton, J. M. (1983) Ion-pairs in proteins. *J. Mol. Biol.*, **168**, 867-885
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchi, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B. & Weissmann, C. (1986) Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, 46, 417-428
- Belay, E. D. (1999) Transmissible spongiform encephalopathies in humans. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**, 283-314
- Bellinger-Kawahara, C. G., Kempner, E., Groth, D., Gabizon, R. & Prusiner, S.
 B. (1988) Scrapie prion liposomes and rods exhibit target sizes of 55,000
 Da. *Virology*, **164**, 537-541
- Bennion, B. J., DeMarco, M. L. & Dagget, V. (2004) Preventing Misfolding of the Prion Protein by trimethylamine N-oxide. *Biochemistry*, **43**, 12955-12963
- Bocharova, O. V., Breydo, L., Parfenov, A. S., Salnikov, V. V. & Baskakov, I. V. (2005) *In vitro* conversion of full-length mammlian Prion Protein produces amyloid form with physical properties of PrP^{Sc}. *J. Mol. Biol.*, **346**, 645-659
- Bradley, R. & Wilesmith, J. W. (1993) Epidemiology and control of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Br. Med. Bull.*, **49**, 932-959
- Brown, P., Gibbs, J., Rodgers-Johnson, P., Asher, D. M., Sulima, M., Bacote,
 A., Goldfarb, L. G. & Gajdusek, D. C. (1994) Human spongiform encephalopathy: the national institutes of health series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann. Neurol.*, **35**, 513-529
- Brown, D. R. (2005) Neurodegeneration and oxidative stress: prion disease results from loss of antioxidant defence. *Folia Neuropathol.*, **43**, 229-243

- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H. & Bostock, C. J. (1997) Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, **389**, 498-501
- Bucciatini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M. & Stefani, M. (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, **416**, 507-511
- Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H. P., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., Aguet, M. & Weissmann, C. (1992) Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature*, **356**, 577-582
- Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M. & Weissmann, C. (1993) Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73, 1339-1347
- Castilla, J., Saá, P., Hetz, C. & Soto, C. (2005) *In vitro* generation of infectious scrapie prions. *Cell*, **121**, 195-206
- Caughey, B., Lansbury, P. T. Jr. (2003) Protofibrils, Pores, Fibrils, and neurodegeneration: Separating the responsible Protein Aggregates from the innocent bystanders. *Annu. Rev. Neurosci.*, **26**, 267-298
- Chan, H. S. & Dill, K. A. (1998) Protein Folding in the Landscape Perspective: Chevron Plots and Non-Arrhenius Kinetics. *Proteins: Structure, function* and genetics, **30**, 2-33
- Chandler, R. L. (1961) Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet*, **1**, 1378-1379
- Chesebro, B. (2003) Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br. Med. Bull.*, **66**, 1-20
- Chiesa, R. & Harris, D. A. (2001) Prion diseases: what is the neurotoxic molecule? *Neurobiol. Dis.* **8**, 743-763.
- Chiti, F., Webster, P., Taddei, N., Clark, A., Stefani, M. Ramponi, G. & Dobson,
 C. M. (1999) Designino conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 3590-3594
- Cohen, F. E., Pan, K. M., Huang, Z., Baldwin, M., Fletterick, R., J. & Prusiner, S. B. (1994) Structural clues to prion replication. *Science*, **264**, 530-531
- Collinge, J., Whittington, M. A., Sidle, K. C., Smith, C. J., Palmer, M. S., Clarke, A. R. & Jefferys, J. G. (1994) Prion Protein is necessary for normal synaptic function. *Nature*, **370**, 295-297

- Conway, K. A., Rochet, J. C., Bieganski, R. M. & Lansbury, P. T. Jr. (2001) Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alphasynuclein adduct. *Science*, **294**, 1346-1349
- Creutzfeldt, H. G. (1920) Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung der Zentralnervensystems. *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* **57**, 1-18
- Cuillé, J. & Chelle, P.-L. (1936) La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *Comptes Rendus Acad. Sci.*, **203**, 1552-1554
- Dobson, C. M., Sali, A. & Karplus, M. (1998) Protein folding: a perspective from theory and experiment. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, **37**, 868-893
- Dobson, C. M. (2003) Protein folding and misfolding. Nature, 426, 884-890
- Dobson, C. M. (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **15**, 3-16
- Donne, D. G., Viles, J. H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, T. L., Cohen, F. E., Prusiner, S. B., Wright, P. E. & Dyson H. J. (1997) Structure of the recombinant full-length hamster Prion Protein PrP(29-231): The N terminus is highly flexible. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 13452-13457
- Dumpitak, C. & Riesner, D. (2003) Der Beweis der Prion-Hypothese. *Biologie in unserer Zeit*, **35**, 374-383
- Eigen, M. (1996) Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophys. Chem.*, **63**, A1-18
- Endo, T., Groth, D., Prusiner, S. B. & Kobata, A., (1989) Diversity of oligosaccharide structures linked to asparagines of the scrapie Prion Protein. *Biochemistry*, **28**, 8380-8388
- Fandrich, M., Fletcher, M. A., & Dobson, C. M. (2001) Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature*, **410**, 165-166
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**, 64-71
- Flechsig, E., Shmerling, D., Hegyi, I., Raeber, A. J., Fischer, M., Cozzio, A., von Mering, C., Aguzzi, A. & Weissmann, C. (2000) Prion Protein devoid of the octapeptide repeat region restores susceptibility to scrapie in PrP knockout mice. *Neuron.*, **27**, 399-408
- Forloni, G. (1996) Neurotoxicity of β-amyloid and prion peptides. *Curr. Op. Neurol.*, **9**, 492-500
- Gabizon, R., McKinley, M. P., Groth, D. & Prusiner, S. B. (1988) Immunoaffinity purification and neutralization of scrapie prion infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6617-6621

- Gajdusek, D. C. & Zigas, V. (1957) Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N. Engl. J. Med.*, **257**, 974-978
- Gerstmann, J., Sträussler, E. & Scheinker, I. (1936) Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralenervensystems; zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Z. Ges. Neurol. Psychiat.*, **154**, 736-762
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, **182**, 319-326
- Glenner, G. G. & Wong, C. W. (1984) Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **120**, 885-890
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S. B. & Cohen, F. E. (2004) Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 8342-8347
- Grabarek, Z. & Gergeley, J. (1990) Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal. Chem.*, **185**, 131-135
- Greenfield, N. & Fasman, G. D. (1969) Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry*, **8**, 4108-4116
- Greenstein, J. P. & Winitz, M. (1961) *Chemistry of the amino acids* Wiley, New York, 486-488
- Guijarro, J. I., Sunde, M., Jones, J. A., Campbell, I. D. & Dobson, C. M. (1998) Amyloid formation by an SH3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 4224-4228
- Haire, L. F., Whyte, S. M., Vasisht, N., Gill, A. C., Verma, C., Dodson, E. J., Dodson, G. G. & Bayley, P. M. (2004) The crystal structure of the globular domain of sheep Prion Protein. *J. Mol. Biol.*, **336**, 1175-1183
- Hayward, P. A., Bell, J. E. & Ironside, J. W. (1994) Prion Protein immunocytochemistry: reliable protocols for the investigation of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **20**, 375-383
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1985) Simplified method for silverstaining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silverstaining. *Electrophoresis*, **6**, 103-112
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J. & Lantos, P. (1997) The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, **389**, 448-450
- Hill, A. F., Antoniou, M. & Collinge, J. (1999) Protease-resistant Prion Protein produced *in vitro* lacks detectable infectivity. *J. Gen. Virol.*, **80**, 11-14

- Hjelmeland L. M. & Chrambach, A. (1984) Solubilization of functional membrane proteins. *Methods Enzymol.*, **104**, 305-318
- Hornemann, S., Schorn, C. & Wüthrich, K. (2004) NMR structure of the bovine Prion Protein isolated from healthy calf brains. *EMBO Rep.*, **5**, 1159-1164
- Jakob, A. M. (1921) Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (Spastische Pseudosklerose – Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden). Dtsch. Z. Nervenkheilk., **70**, 132-146
- James, T. L., Liu, H., Ulyanov, N. B., Farr-Jones, S. Zhang, H., Donne, D. G., Kaneko, K., Groth, D., Mehlhorn, I., Prusiner, S. B., Cohen, F. E. (1997) Solution structure of a 142-residue recombinant Prion Protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 10086-10091
- Jansen, K. (1998) Biophysikalische Analyse von Aggregationsintermediaten des Prion-Proteins. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Jansen, K., Schaefer, O., Birkmann, E., Post, K., Serban, H., Prusiner, S., B. & Riesner, D. (2001) Structural intermediates in the putative pathway from the cellular Prion Protein to the pathogenic form. *Biol. Chem.*, **382**, 683-691
- Jansen, K. (2002) 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
- Jarret, J. T. & Lansbury, P., T. (1993) Seeding one-dimensional crystallization of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, **73**, 1055-1058
- Johnson, R. S., Martin, S. A., & Biemann, K. (1988) Collision-induced fragmentation of (M + H)+ ions of peptides: side chain specific sequence ions. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proces.*, **86**, 137-154
- Jonsson, A. P. (2001) Mass spectrometry for protein and peptide characterisation. *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 868-884
- Kaimann, T. (2002) Strukturveränderungen von kovalent verknüpften Oligomeren des Prion-Proteins. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Kaneko, K., Peretz, D., Pan, K.-M., Blochberger, T. C., Wille, H., Gabizon, R., Griffith, O. H., Cohen, F. E., Baldwin, M. A. & Prusiner, S. B. (1995) Prion Protein (PrP) synthetic peptides induce cellular PrP to acquire properties of the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11160-11164

- Kaneko, K., Wille, H., Mehlhorn, I., Zhang, H., Ball, H., Cohen, F. E., Baldwin, M. A. & Prusiner, S. B. (1997) Molecular properties of complexes formed between the Prion Protein and synthetic peptides. *J. Mol. Biol.*, 270, 574-586
- Karas, M. & Hillenkamp, F. (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.*, **60**, 2299-3201
- Kascsak, R. J., Rubenstein, R., Merz, P. A., Tonna, D. M., Fersko, R., Carp, R. I., Wisniewski, H. M. & Diringer, H. (1987) Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins. *J. Virol.*, **61**, 3688-3693
- Kellings, K, Meyer, N., Mirenda, C., Prusiner, S. B. & Riesner, D. (1992) Further analysis of nucleic acids in purified scrapie prion preparations by improved return refocusing gel electrophoresis. *J. Gen. Virol.*, **73**, 1025-1029
- Kerbale, P. & Tang, L. (1993) From ions in solution to ions in the gas phase. *Anal. Chem.*, **65**, 972A-986A
- Kinter, M. & Sherman, N. E. (2000) Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry. John Wiley & Sons, Inc. USA, ISBN 0-471-32249-0
- Knaus, K. J., Morillas, M., Swietnicki, W., Malone, M., Surewicz, W. K. & Yee,
 V. (2001) Crystal structure of the human Prion Protein reveals a mechanism for oligomerization. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 770-774
- Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T. & Caughey, B. (1994) Cell-free formation of proteaseresistant Prion Protein. *Nature*, **370**, 471-474
- Krebs, M. R. H., Bromley, E. H. C. & Donald, A. M. (2004) The binding of thioflavin T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct. Biol.*, **149**, 30-37
- Kretzschmar, H. A., Tings, T., Madlung, A., Giese, A. & Herms, J. (2000) Function of PrP^C as a copper-binding protein at the synapse. *Arch. Virol. Suppl.*, **16**, 239-249
- Kunkel, G. R., Mahrabian, M. & Martinson, G. (1981) Contact-site cross-linking agents. *Mol. Cell. Biochem.*, **34**, 3-13
- Lämmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685
- Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Demaimay, R., Adjou, K. T., Lamoury, F., Dormont, D., Robain, O., Ironside, J. & Hauw, J. J. (1996) BSE transmission to macaques. *Nature*, **381**, 743-744

- Lasmezas, C. I., Fournier, J. G., Nouvel, V., Boe, H., Marce, D., Lamoury, F., Kopp, N., Hauw, J. J., Ironside, J., Bruce, M., Dormont, D. & Deslys, J. P. (2001) Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: implications for human health. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4142-4127
- Leffers, K.-W., Schell, J., Jansen, K., Lucassen, R., Kaimann, T., Nagel-Steger, L., Tatzelt, J. & Riesner, D. (2004) The structural transition of the Prion Protein into its pathogenic conformation is induced by unmasking hydrophobic sites. *J. Mol. Biol.*, **344**, 839-853
- Leffers, K.-W., Wille, H., Stöhr, J., Junger, E., Prusiner, S. B. & Riesner, D. (2005) Assembly of natural and recombinant Prion Protein into fibrils. *Biol. Chem.*, **386**, 569-580
- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H. O., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J. & Prusiner, S. B. (2004) Synthetic mammalian prions. *Science*, **305**, 673-676
- Leopoldt, J. G. (1759) Nützliche und auf die Erfahrung gegründete Einleitung zur Landwirtschaft, **5**, 344-360
- LeVine, H. (1999) Quantification of β-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol.* **309**, 274-284
- Levinthal, C. (1968) Are there pathways for protein folding. *J. Chim. Phys.*, **65**, 44-45
- Li, A. & Harris, D. A. (2005) Mammalian Prion Protein suppresses Bax-induced cell death in yeast. *J. Biol. Chem.*, **280**, 17430-17434
- Lindahl, E., Hess, B. & van der Spoel, D. (2001) A package for molecular simulation and trajectory anaylsis. *J. Mol. Mod.*, **7**, 306-317
- Litvinovich, S. V., Brew, S. A., Aota, S., Akiyama, S. K., Haudenschild, C., Ingham, K. C. (1998) Formation of amyloid-like fibrils by self-association of a partially unfolded fibronectin type III module. *J. Mol. Biol.*, **280**, 245-258
- Liu, H., Farr-Jones, S., Ulyanov, N. B., Llinas, M., Marqusee, S., Groth, D., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & James, R. L. (1999) Solution structure of Syrian hamster Prion Protein rPrP(90-231). *Biochemistry*, **38**, 5362-5377
- Lorenzo, A., & Yankner, B. A. (1994) β-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by Congo red. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12243-12247
- Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Lugaresi, A., Tinuper, P., Zucconi, M. & Gambetti, P. (1986) Fatal familial insomnia and
dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N. Engl. J. Med.*, **315**, 997-1003

- Lührs, T., Zahn, R. & Wüthrich, K. (2006) Amyloid formation by recombinant full-length Prion Proteins in phospholipids bicelle solutions. *J. Mol. Biol.*, **357**, 833-841
- Marsh, R. F. & Kimberlin, R. H. (1975) Comparison of scrapie and transmissible mink encephalopathy in hamsters. II. Clinical signs, pathology and pathogenesis. *J. Infect. Dis.*, **131**, 104-110
- Matsunaga, Y., Peretz, D., Williamson, A., Burton, D., Mehlhorn, I., Groth, D., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & Baldwin, M. (2001) Cryptic epitopes in Nterminally truncated Prion Protein are exposed in the full-length molecule: dependence of conformation on pH. *Proteins*, **44**, 110-118
- McKinley, M. P., Bolton, D. C. & Prusiner, S. B. (1983) A protease resistant protein is a structural component of scrapie prion. *Cell*, **35**, 57-62
- Means, G. E. & Feeney, R. E. (1971) *Chemical modification of proteins* Holden-Day, San Francisco, 14-15, 68-71
- Mehlhorn, I., Groth, D., Stockel, J., Moffat, B., Reilly, D., Yansura, D., Willett, W. S., Baldwin, M., Fletterick, R., Cohen, F. E., Vandlen, R., Henner, D. & Prusiner, S. B. (1996) High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the Prion Protein. *Biochemistry*, **35**, 5528-5537
- Meredith, S. C. (2005) Protein denaturation and aggregation, cellular responses to denatured and aggregated proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1066**, 181-221
- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M. & Iqbal, K. (1981) Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol.*, **54**, 63-74
- Meyer, R. K., Lustig, A., Oesch, B., Fatzer, R., Zurbriggen, A., Vandevelde, M. (2000) A monomer-dimer equilibrium of a cellular Prion Protein (PrP^C) not observed with recombinant PrP. *J. Biol. Chem.*, **275**, 38081-38087
- Milhavet, O., Lehmann, S. (2002) Oxidative stress and the Prion Protein in transmissible spongifor encephalopathies. *Brain Res. Rev.*, **38**, 328-339
- Mouillet-Richard, S., Ermonval, M., Chebassier, C., Laplanche, J. L., Lehmann, S., Launay, J. M. & Kellermann, O. (2000) Signal transduction through Prion Protein. *Science*, **289**, 1925-1928
- Nguyen, J. T., Inouye, H., Baldwin, M. A., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & Kirchner, D. A. (1995) X-ray diffraction of scrapie prion rods and PrP peptides. *J. Mol. Biol.*, **252**, 412-422

- Novitskaya, V., Bocharova, O. V., Bronstein, I. & Baskakov, I. V. (2006) Amyloid fibrils of mammalian Prion Protein are highly toxic to cultured cells and primary neurons. *J. Biol. Chem.*, **281**, 13828-13836
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E., Prusiner, S. B. & Weissmann, C. (1985) A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40, 735-746
- Onisko, B., Fernandez, E. G., Freire, M. L., Schwarz, A., Baier, M., Camina, F., Garcia, J. R., Rodriguez-Segade Villamarin, S. & Requena, J. R. (2005)
 Probing PrP^{Sc} structure using chemical cross-linking and mass spectrometry: evidence of the proximity of Gly90 amino termini in the PrP 27-30 aggregate. *Biochemistry*, **44**, 10100-10109
- Pan, K. M., Baldwin, M. A., Nguyen, J., Gasset, M. Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E. & Prusiner, S. B. (1993) Conversion of α-helices into β-sheets features in the formation of the scrapie Prion Proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 10962-10966
- Parchi, P., Castellani, R., Cortelli, P., Montagna, P., Chen, S. G., Peterson, R. B., Manetto, V., Vnencak-Jones, C. L., McLean, M. J., Sheller, J. R. et al. (1995) Regional distribution of protease-resistant Prion Protein in fatal familial insomnia. *Ann. Neurol.*, **38**, 21-29
- Pattison, I. H., Hoare, M. N., Jebbet, J. N. & Watson, W. A. (1972) Spread of Scrapie to sheep and goats by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Vet. Rec.*, **90**, 465-468
- Pattison, I. H., Hoare, M. N., Jebbet, J. N & Watson, W. A. (1974) Further observation on the production of scrapie in sheep by oral dosing with foetal membranes from scrapie-affected sheep. *Br. Vet. J.*, **130**, 65-67
- Pauly, P., C. & Harris, D. A. (1998) Copper stimulates endocytosis of the Prion Protein. *J. Biol. Chem.*, **273**, 33107-33110
- Peretz, D., Williamson, R. A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I. R., Legname, G., Wormald, M. R., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Burton, D. R. & Prusiner, S. B. (2001) Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature*, **412**, 739-743
- Pertinhez, T. A., Bouchard, M., Smith R. A., Dobson, C. M. & Smith, L. J. (2002) Stimulation and inhibition of fibril formation by a peptide in the presence of different concentrations of SDS. *FEBS Lett.*, **529**, 193-197
- Phillips, N., Bridgeman, J. & Ferguson-Smith, M. (2000) *BSE inquiry report. Vol.* 2: Science. Stationary Office, London

- Piening, N., Weber, P., Högen, T., Beekes, M., Kretzschmar, H. & Giese A. (2006) Photo-induced crosslinking of Prion Protein oligomers and prions. *Amyloid*, **13**, 67-77
- Post, K., Pitschke, M., Schäfer, O., Wille, H., Appel, T. R., Kirsch, D., Mehlhorn, I., Serban, H., Prusiner, S. B. & Riesner, D. (1998) Rapid acquisition of beta-structure in the Prion Protein prior to multimer formation. *Biol. Chem.*, 379, 1307-1317
- Priola, S. A., Caughey, B., Wehrly, K. & Chesebro, B. (1995) A 60-kDa Prion Protein (PrP) with properties of both the normal and scrapie-associated forms of PrP. J. Biol. Chem., 270, 3299-3305
- Prusiner, S. B. (1982a) Novel proteinaceous infectious particle cause scrapie. *Science*, **216**, 136-140
- Prusiner, S. B., Cochran, S. P., Groth, D. F., Downey, D. E., Bowman, K. A. & Martinez, H. M. (1982b) Measurement of the scrapie agent using an incubation time interval assay. *Ann. Neurol.*, **11**, 353-358
- Prusiner, S. B., Bolton, D. C., Groth, D. F., Bowman, K. A., Cochran, S. P. & McKinley, M. P. (1982c) Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry*, **21**, 6942-6950
- Prusiner, S. B., Groth, D. F., Bolton, D. C., Kent, S. B. & Hood, L. E. (1984) Purification and structural studies of a major scrapie Prion Protein. *Cell*, 38, 127-134
- Prusiner, S. B. (1989) Scrapie Prions. Ann. Rev. Microbiol., 43, 345-374
- Prusiner, S.B., Groth, D., Serban, A., Koehler, R., Foster, D., Torchia, M., Burton, D., Yang, S. L. & DeArmond, S. J. (1993). Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, **90**, 10608-10612.
- Ptitsyn, O. B., Pain, R., Semisotnov, G., Zerovnik, E. & Razgulyaev O. I. (1990) Evidence for a molten globule state as a general intermediate in protein folding. *FEBS Letters*, **26**, 21-24
- Rezaie, P. & Lantos, P. L. (2001) Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. *Brain Res. Rev.*, **35**, 55-72
- Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R. & Wüthrich, K. (1996) NMR structure of the mouse Prion Protein domain (121 – 231). *Nature*, **382**, 180-182
- Riesner, D., Kellings, K., Post, K., Wille, H., Serban, H., Groth, D., Baldwin, M.,
 A. & Prusiner, S. B. (1996) Disruption of prion rods generates 10-nm spherical particles having high alpha-helical content and lacking scrapie infectivity. *J. Virol.*, **70**, 1714-1722

- Roepstorff, P. & Fohlman, J. (1984) Proposal for a common nomenclature of sequence ions in mass spectra of peptides. *Biomed. Mass Spectrom.*, **11**, 601
- Roucou, X. & LeBlanc, A. C. (2005) Cellular Prion Protein neuroprotective function : implications in prion disease. *J. Mol. Biol.*, **83**, 3-11
- Rudd, P. M., Endo, T., Colominas, C., Groth, D., Wheeler, S. F., Harvey, D. J., Wormald, M. R., Serban, H., Prusiner, S. B., Kobata, A., Dwek, R. A. (1999) Glycosylation differences between the normal and pathogenic Prion Protein isoforms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13044-13049
- Rudd, P. M., Wormald, M. R., Wing, D. R., Prusiner, S. B. & Dwek, R. A. (2001) Prion glycoprotein: structure, dynamics, and roles for the sugars. *Biochemistry*, **40**, 3759-3766
- Saborio, G. P., Permanne, B. & Soto, C. (2001) Sensitive detection of pathological Prion Protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, **411**, 810-813
- Safar, J. G., Kellings, K., Serban, Groth, D., Cleaver, J. E., Prusiner, S. B., Riesner, D. (2005a) Search for a prion-specific nucleic acid. *J. Virol.*, **79**, 10796-10806
- Safar, J. G., Geschwind, M. D., Deering, C., Didorenko, S., Sattavat, M., Sanchez, H., Serban, A., Vey, M., Baron, H., Giles, K., Miller, G. L., Dearmond, S. J. & Prusiner, S. B. (2005b) Diagnosis of human prion disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3501-3506
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY
- Schmitt-Ulms, G., Legname, G., Baldwin, M. A., Ball, H. L., Bradon, N., Bosque,
 P. J., Crossin, K. L., Edelman, G. M., DeArmond, S. J., Cohen, F. E. &
 Prusiner, S. B. (2001) Binding of neural cell adhesion molecules (N-CAMs) to the cellular Prion Protein. *J. Mol. Bio.*, **314**, 1209-1225
- Schmitt-Ulms, G., Hansen, K., Liu, J., Cowdrey, C., Yang, J., DeArmond, S. J., Cohen, F. E., Prusiner, S. B. & Baldwin, M. A. (2004) Time-controlled transcardiac perfusion cross-linking for the study of protein interactions in complex tissues. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 724-731
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 68, 850-858

- Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F. & Caughey, B. (2005) The most infectious Prion Protein particles. *Nature*, 437, 257-261
- Sinz, A. (2003) Chemical cross-linking and mass spectrometry for mapping three-dimensional structures of proteins and protein complexes. *J. Mass. Spectrom.*, **38**, 1225-1237
- Sinz, A. (2006) Chemical cross-linking and mass spectrometry to map threedimensional protein structures and protein-protein-interactions. *Mass Spectrometry Reviews*, **25**, 663-682
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85
- Soto, C. (2003) Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, 49-60
- Soto, C. (2004) Diagnosing prion diseases: needs, challenger and hopes. *Nat. Rev. Microbiol.*, **2**, 809-819
- Stahl, N., Borchelt, D. R., Hsiao, K. & Prusiner, S. B. (1987) Scrapie Prion Protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*, **51**, 229-240
- Stahl, N., Baldwin, M. A., Teplow, D. B., Hood, L., Gibson, B. W., Burlingame,
 A. L. & Prusiner, S. B. (1993) Structural studies of the scrapie Prion Protein using mass spectrometry and amino acids sequencing. *Biochemistry*, **32**, 1991-2002
- Stöhr, J. (2003) Möglichkeiten der Fibrillenbildung bei rekombinanten Prion-Proteinen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Sunde, M. & Blake, C. C. F. (1997) The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv. Prot. Chem.*, **50**, 123-159
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avrahami, D., Laszlo, L. & Prusiner, S.
 B. (1995) Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the Prion Protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell. Biol.*, **129**, 121-132
- Tatzelt, J., Prusiner, S. B. & Welch, W. J. (1996) Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie Prion Protein. *EMBO J.*, **15**, 6363-6373
- Thomas, P. J., Qu, B.-H. & Pedersen, P. L. (1995) Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 456-459
- Timkovich, R. (1977) Detection of the stable addition of carbodiimide to proteins. *Anal. Chem.*, **79**, 135-143

- Tobler, Gaus, S. E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rulicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P. A. & Manson, J. C. (1996) Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of Prion Protein. *Nature*, **380**, 639-642
- Turk, E., Teplow, D. B., Hood, L. E. & Prusiner, S. B. (1988) Purification and properties of the cellular and scrapie hamster Prion Proteins. *Eur. J. Biochem.*, **176**, 21-30
- Vey, M., Pilkuhn, S., Wille, H., Nixon, R. DeArmond, S. J., Smart, E. J., Anderson, R. G., Taraboulos, A. & Prusiner, S. B. (1996) Subcellular colocalization of the cellular and scrapie Prion Proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14945-14949
- Virchow, R. (1854) Über eine im Gehirn und Rückenmark des Menschen aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaktion der Cellulose. *Virchows Arch.*, **6**, 415-426
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J. & Selkoe, D. J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature*, **416**, 535-539
- Watt, N. T. & Hooper, N. M. (2003) The Prion Protein and neuronal zinc homeostasis. Trends *Biochem. Sci.*, **28**, 406-410
- Weissmann, C. (1994) Molecular biology of prion diseases. *Trends Cell Biol.*, **4**, 10-14
- Weissmann, C. (1999) Molecular genetics of transmissible spongiform encephalopathies. J. Biol. Chem., **274**, 3-6
- Welker, E., Raymond, L. D., Scheraga, H. A. & Caughey, B. (2002) Intramolecular versus intermolecular disulfide bonds in Prion Proteins. J. Biol. Chem., 36, 33477-33481
- Wells, G. A., Wilesmith, J. W. & McGills, I. S. (1991) Bovine spongiform encephalopathy: a neuropathological perspective. *Brain Pathol.*, **1**, 69-78
- Wetzel, R., Halualani, R., Stults, J. T. & Quan C. (1990) A general method for highly selective cross-linking of unprotected polypeptides via pH-controlled modification of N-terminal α-amino groups. *Bioconjugate Chem.*, **1**, 114-122
- Wiechelman, K., Braun, R. & Fitzpatrick, J. (1988) Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal. Biochem.*, **175**, 231-237

- Will R. G., Ironside J. W., Zeidler M., Cousens S. N., Estibeiro K., Alperovitch A., Poser S., Pocchiari M., Hofman A. & Smith P. G. (1996) A new variant Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, **347**, 921-925
- Wille, H., Michelitsch, M. D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F. E., Agard, D. A. & Prusiner, S. B. (2002) Structural studies of the scrapie Prion Protein by electron crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 3563-3568
- Williams, E. S. & Young, S. (1980) Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy, *J. Wildl. Dis.*, **16**, 89-98
- Yon, J. M. (2002) Protein folding in the post-genomic era. J. Cell. Mol. Med., 6, 307-327
- Zhang, C. C., Steele, A. D., Lindquist, S. & Lodish, H. F. (2006) Prion Protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 2184-2189

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, November 2006

Tina Katharina Kaimann