

**Strukturuntersuchung verschiedener Schafs-
Prion Protein-Fibrillen mit biophysikalischen
Methoden und Festkörper-NMR-Spektroskopie**

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Timo Piechatzek

aus Düsseldorf

Neuss, November 2016

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. Henrike Heise

Korreferent: Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2016

Eidesstattliche Erklärung

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

Neuss,

(Timo Piechatzek)

Für meine Jacqueline

Das Problem dieser Welt ist, dass die intelligenten Menschen so voller Selbstzweifel und die Dummen so voller Selbstvertrauen sind.

- Charles Bukowski

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. Henrike Heise und Prof. Dr. Dieter Willbold, die mir die Möglichkeit eröffnet haben, meine Dissertation am ICS-6 und dem Institut für Physikalische Biologie anzufertigen. Auch möchte ich mich dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit bekommen habe an diesem Interessanten Thema zu arbeiten und dafür, dass sie mich während der gesamten Zeit umfangreich unterstützt haben.

Einen besonderen Dank richte ich an Dr. Lothar Gremer, Dr. Manuel Etkorn, Dr. Oliver Bannach, Dr. Oleksandr Brener, Elke Reinertz, Bernd Esters, Michael Würdehoff für die hilfreichen Diskussionen, Hinweise und Hilfestellungen.

Einen herzlichen Dank möchte ich auch an Dr. Henrik Müller, Dr. Santhosh Ayalur-Karunakaran, Dr. Quynh Hoa Do und Dr. Sabu Varghese, die mir mit Rat und Tat beim Einstieg in das Thema zur Seite standen.

Mein Dank gilt auch allen jetzigen und ehemaligen Mitglieder der AG Heise und allen übrigen Mitgliedern des ICS-6 und des Institut für Physikalische Biologie, insbesondere Franziska Weirich für die etlichen fachlichen und philosophischen Diskussionen, Baran Uluca und Anna König für die fachlichen Diskussionen.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Verantwortlichen der Graduiertenschule iGRASPseed für die Aufnahme in die Forschungsschule, die Finanzierung der Promotionsstudien und die zusätzliche Ausbildung bedanken.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich an meine Eltern richten, für die Hilfe während der gesamten Studienzeit, und meinen Schwiegereltern für ihren Rat und Hilfe in jeder Lebenslage.

Mein größter Dank geht an meine Frau Jacqueline Kemper-Piechatzek, ohne dich wäre ich nicht so weit gekommen. Du standst mir in jeder Lebenslage zur Seite, bist mit mir durch alle Höhen und Tiefen gegangen und hast es immer geschafft mich auf den Boden zurück zu holen, und mir immer den Stoß in die richtige Richtung gegeben. Für alles gilt dir mein ewiger Dank und meine Liebe.

I. Inhaltsverzeichnis	
I. INHALTSVERZEICHNIS	I
II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
III. TABELLENVERZEICHNIS	VI
IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Allgemeine Übersicht zur Einordnung von Prionen als Pathogene	2
1.2. Das zelluläre Prion Protein (PrP ^C)	4
1.3. Die Polymorphismen des Schafs (Ovis Aries) Prion Proteins	5
1.4. Die Struktur des zellulären Prion Protein	6
1.5. Das Scrapie assoziierte PrP ^{Sc}	8
1.6. Proteinase K Proteolyse als Marker zum Nachweis von PrP ^{Sc}	8
1.7. Konversion des PrP ^C zu PrP ^{Sc}	10
1.8. <i>In Vitro</i> Konversion	12
1.9. Die Struktur des PrP ^{Sc}	15
1.9.1. Die Struktur von PrP ^{Sc} Fibrillen	15
1.10. Prionen in Hefepilzen, ein kurzer Auszug	18
1.11. Struktur der amyloiden Fibrillen von Ure2p und Sup35p: Eine gleichsinnige parallele Architektur	20
2. ZIELSETZUNG	22
3. MATERIAL UND METHODEN	24
3.1. Das rekombinante volllängen Schafs Prion Protein ovrecPrP(25-233)	24

3.2. Wolframphosphorsäure Natriumsalz (NaPTA)-Fällung von PrP^{Sc} Fibrillen aus Hirnhomogenat eines an Scrapie erkrankten Schafs mit der Variation MARQ	24
3.3. Fibrillogenese	26
3.4. ThT-Assay	28
3.5. SDS-Ultraschall Assay	29
3.6. Zirkulärer Dichroismus (CD) Spektroskopie	29
3.7. Differentialzentrifugation	31
3.8. Proteinase K (PK) Verdau	31
3.9. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)	32
3.10. Western Blot	33
3.11. Antikörperfärbung	33
3.12. Chemilumineszenz Detektion	33
3.13. Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF)	34
3.14. Rasterkraft Mikroskopie (AFM)	35
3.15. Biologische Sicherheit	35
3.16. Festkörper Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)	36
3.17. Sekundär chemische Verschiebung ($\Delta\delta$)	37
 4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	 45
 4.1. Charakterisierung von <i>de novo</i> generierten amyloiden ovrecPrP Fibrillen durch ein modifiziertes autokatalytisches Konversionssystem	 45
4.1.1. Aggregationskinetik der <i>de novo</i> Fibrillogenese des ovrecPrP im Guanidinium-freie Urea-System	45
4.1.2. Sekundärstrukturanalyse der amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen	46
4.1.3. Totalreflexionsmikroskopische (TIRF) Aufnahmen von amyloiden ovrecPrP(MARQ) Prion-Fibrillen	48
4.1.4. Rasterkraftmikroskopische (AFM) Aufnahmen von amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen	49
4.1.5. Proteinase K Verdau der amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen	51
4.1.6. Die <i>de novo</i> generierten amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen zeigen biophysikalische und makromorphologische Eigenschaften von PrP ^{Sc} Fibrillen.	51

4.1.7.	Festkörper-NMR-Spektroskopie der <i>de novo</i> generierten ovrecPrP Fibrillen	54
4.1.8.	Die strukturellen Eigenschaften der <i>de novo</i> generierten ovrecPrP(MARQ) Prion-Fibrillen.	57
4.1.9.	Zusammenfassende Diskussion der biochemischen/-physikalischen und Festkörper-NMR spektroskopischen Ergebnisse	59
4.2.	Charakterisierung von PrP^{Sc} induzierten, amyloiden ovrecPrP Fibrillen	61
4.2.1.	PTA-Fällung von PrP ^{Sc} aus Hirnhomogenat	61
4.2.2.	Aggregationskinetik Keim-induzierter Fibrillen	62
4.2.3.	Proteinase K Verdau der Keim-induzierten amyloiden ovrecPrP Fibrillen	64
4.2.4.	Die biophysikalischen Untersuchungen zeigen keine Hinweise auf eine Strukturvererbung aber heterogene Strukturen der Prion-Fibrillen	66
4.3.	Festkörper-NMR Untersuchung PrP^{Sc} induzierter, amyloider ovrecPrP Fibrillen	69
4.3.1.	Die erste Generation PrP ^{Sc} induzierter amyloider ovrecPrP(MARQ) Fibrillen	69
4.3.2.	Die erste Generation Keim-induzierter (seeded) Prion-Fibrillen zeigt strukturelle Heterogenität mit Ähnlichkeiten zu den <i>de novo</i> generierten Prion-Fibrillen	75
4.4.	Die dritte Generation PrP^{Sc} induzierter amyloider ovrecPrP(MARQ) Fibrillen	78
4.4.1.	Festkörper-NMR-spektroskopischer Vergleich zwischen der ersten und dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen	78
4.4.2.	Zusammenfassung der deuterierten und ¹³ C/ ¹⁵ N markierten Expression des ovrecPrP	80
4.4.3.	Festkörper-NMR-spektroskopischer Vergleich zwischen den ¹³ C/ ¹⁵ N und ² H/ ¹³ C/ ¹⁵ N markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation	81
4.4.4.	Identifikation aminosäurespezifischer Spinsysteme	83
4.4.5.	Sequentielle Zuordnungen der dritten Fibrillen Generation	85
4.4.6.	Festkörper-NMR-Spektroskopie der PrP ^{Sc} induzierten Fibrillen gibt Hinweis auf zwei heterogene Strukturen	91
5.	AUSBLICK	94
6.	ZUSAMMENFASSUNG	95
7.	SUMMARY	97
8.	LITERATURVERZEICHNIS	99
ANHANG		110

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionelle Bereiche (A) und sekundär Struktur (B) des Schafs PrP.....	5
Abbildung 2: Banddarstellung der Struktur von globulär gefaltetem mPrP(121-231).....	6
Abbildung 3: NMR Struktur zweier globulär gefalteten ovPrP Varianten.....	7
Abbildung 4: Vergleich der nicht-infektiösen und infektiösen Form des PrP.....	8
Abbildung 5: Fragment Größen der Maus PrP Fibrillen nach der Behandlung mit Proteinase K.....	9
Abbildung 6: Schematische Darstellung der beiden Konversionsmodelle.....	10
Abbildung 7: Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA).....	13
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Domänen des PrP.....	16
Abbildung 9: Entwurf der GPI-Anker freien PrP27-30 Fibrillen.....	17
Abbildung 10: Vergleich der charakteristischen Regionen von Sup35p und Ure2p.....	20
Abbildung 11: Aminosäuresequenz der beiden Variationen des ovrecPrP(25-233).....	24
Abbildung 12: Typische CD-Spektren der drei häufigsten Struktur Motive [1].....	30
Abbildung 13: Rotor-Innenkörper für 3,2 mm Agilent Rotoren.....	35
Abbildung 14: Strukturformel des Polyformaldehyds.....	36
Abbildung 15: Verlauf der Fibrillogenese der <i>de novo</i> generierten ovrecPrP Fibrillen.....	45
Abbildung 16: CD-Messung der amyloiden ovrecPrP Fibrillen in Abhängigkeit der SDS-Konzentration.	46
Abbildung 17: Vergeleich der CD-Spektren von Prion-Fibrillen und Prion-Rods.....	47
Abbildung 18: TIRF-mikroskopische Aufnahmen der ThT-gefärbten Prion-Fibrillen.....	49
Abbildung 19: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Prion-Fibrillen.....	50
Abbildung 20: Überprüfung der partiellen PK-Resistenz der <i>de novo</i> hergestellten Prion-Fibrillen.....	51
Abbildung 21: 2D- ¹³ C/ ¹³ C-Korrelationsspektren der <i>de novo</i> hergestellten ovrecPrP Fibrillen.....	55
Abbildung 22: Vergleich der PDSD-Spektren zwischen den <i>de novo</i> hergestellten Prion-Fibrillen und den Prion-Rods (Müller et al.).....	56
Abbildung 23: Vergleich der relativen Signalintensitäten zwischen α -Helix und β -Faltblatt Alanine.....	57
Abbildung 24: Western Blot der PTA-Fällung.....	62
Abbildung 25: Verlauf der Fibrillogenese der verschiedenen Generationen der Keim-induzierten Fibrillogenese.....	63
Abbildung 26: Überprüfung der partiellen PK-Resistenz der Keim-induzierten Prion-Fibrillen.....	64
Abbildung 27: Streifen Darstellung der spezifischen Zuordnung der Alanine der ersten Generation Keim- induzierter Prion-Fibrillen.....	70
Abbildung 28: 2D- ¹³ C/ ¹³ C-Korrelationsspektren der ersten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen.	71
Abbildung 29: Sekundär chemische Verschiebungen der identifizierten Spinsysteme der ersten Generation Keim-induzierte Prion-Fibrillen.....	72
Abbildung 30: Vergleich der relativen Signalintensitäten zwischen α -Helix und β -Faltblatt Alanine.....	73
Abbildung 31: Vergleich der PDSD-Spektren zwischen den <i>de novo</i> hergestellten Prion-Fibrillen und der ersten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen.....	74
Abbildung 32: Vergleich der relativen Signalintensitäten zwischen α -Helix und β -Faltblatt Alanine.....	78

Abbildung 33: Vergleich der Spektren zwischen den vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Prion-Fibrillen der ersten und dritten Generation.....	79
Abbildung 34: Vergleich der DREAM-Spektren zwischen den vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten und dreifach markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen.	82
Abbildung 35: Vergleich der 2D-NCaCx-/NCaCB-Spektren zwischen den vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten und dreifach markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen. .	83
Abbildung 36: Vergleich der DREAM-Spektren zwischen den dreifach markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen.	85
Abbildung 37: Streifen Darstellung der sequentiellen Zuordnung der dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen der Struktur A.	87
Abbildung 38: Streifen Darstellung der sequentiellen Zuordnung der dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen der Struktur B.	87
Abbildung 39: Sekundär chemische Verschiebungen der sequentiellen Zuordnungen.....	89
Abbildung 40: Schematische Darstellung der Domänen der Prion-Fibrillen aus dieser Arbeit im Vergleich zur Literatur.	93

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prionerkrankungen (nach Prusiner [9] geändert).....	3
Tabelle 2: Puffer und Lösungen für die NaPTA-Fällung.....	25
Tabelle 3: Zusammensetzungen der einzelnen GDH-Reduktionsansätze.....	26
Tabelle 4: Zusammensetzungen der einzelnen Fibrillisationsansätze.....	27
Tabelle 5: Verwendet ThT-Messparameter.....	28
Tabelle 6: Verwendete CD-Messparameter.....	31
Tabelle 7: Zusammensetzungen der Puffer und Gele für die SDS-PAGE.....	32
Tabelle 8: Parameter der Festkörper-NMR Experimente durchgeführt an den <i>de novo</i> hergestellten Prion-Fibrillen.....	38
Tabelle 9: Parameter der Festkörper-NMR Experimente durchgeführt an der ersten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen.....	39
Tabelle 10: Parameter der Festkörper-NMR Experimente durchgeführt an der dritten Generation vollständig markierter und Keim-induzierter Prion-Fibrillen.....	42
Tabelle 11: Parameter der Festkörper-NMR Experimente durchgeführt an der dritten Generation dreifach markierte (mit 30:70 % H/D-Verhältnis gewaschen) und Keim-induzierter Prion-Fibrillen.....	43
Tabelle 12: Parameter der Festkörper-NMR Experimente durchgeführt an der dritten Generation dreifach markierte (mit 100 % D ₂ O gewaschen) und Keim-induzierter Prion-Fibrillen.....	44
Tabelle 13: Relative Bandenintensitäten der gelelektrophoretischen Trennung nach PK-Verdau.....	65
Tabelle 14: Chemische Verschiebungen der sequentiellen Zuordnung der Struktur A.....	90
Tabelle 15: Chemische Verschiebungen der sequentiellen Zuordnung der Struktur B.....	90

IV. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
µl	Micro Liter	mM	Millimolar
Å	Angstrom	mPrP	Murine Prion protein
AFM	Rasterkraft Mikroskopie	NaCl	Natriumchlorid
bPrP	Bovines Prion Protein	NaOAc	Natriumacetat
BSE	Schwammartige Enzephalopathie bei Rindern (Rinderwahnsinn)	NaPTA	Wolframphosphorsäure Natriumsalz
CC	Charged Cluster	ng	Nanogramm
CD	Zirkular Dichroismus	NL	nicht isotoopenmarkiert
CJD	Creutzfeldt-Jakob disease	nm	Nanometer
CP	Cross-Polarisation	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
CWD	Chronische Auszehrungskrankheit	ovrecPrP	ovines rekombinantes Prion Protein
DREAM	Dipolar Recoupling Enhancement Through Amplitude Modulation	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
ECL	Enhanced Chemiluminescence	PDS	Proton Driven Spin Diffusion
EPR	Electron Paramagnetic Resonance	PK	Proteinase K
fCJD	familiäre CJD	PMCA	Protein Misfolding Cyclic Amplification
FFI	Tödliche familiäre Schlafkrankheit	Prnp	Gen welches das zelluläre Prion Protein kodiert
FSE	Schwammartige Enzephalopathie bei Katzen	PrP	Prion Protein
FSI	Tödliche spontane Schlafkrankheit	PrP ²⁷⁻³⁰	Verkürztes Prion Protein mit einer Masse von 27-30 kDa
FID	Free-Induction Decay	PrP ^C	zelluläres Prion Protein
FTIR	Fourier-Transform-Infrared-Spektroskopie	PrP ^{Sc}	Scrapie Prion Protein
GAM-PO	Goat Anti-Mouse Peroxidase	RFU	Relative Fluoreszenzeinheit
GdnHCl	Guanidiniumchlorid	rPrP	rekombinantes Prion Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol-Anker Protein	SAF32	Monoclonal Prion Protein Antibody (scrapie associated fibrils)
GSH	Glutathion	sCJD	sporadische CJD
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrome	SDS	Natriumdodecylsulfat
HGH	Menschliche Wachstumshormone	SDS-PAGE	SDS-Gelelektrophorese
HORROR	Homonuclear Rotary Resonance	SHaPrP	Syrian Hamster Prion Protein
hPrP	humanes Prion Protein	TBS-T	Tris-Buffered Saline
HRP	Horseradish Peroxidase	ThT	Thioflavin T
iCJD	iatrogenisches CJD	TL	einheitlich 2H/13C/15N isotoopenmarkiert
KCl	Kaliumchlorid	TME	Übertragbare Nerz Enzephalopathie
kDa	kilo Dalton	TPPM	two pulse phase modulation
kHz	kilo Hertz	TSE	Transmissible Spongiform Encephalopathy
M	molar	UL	einheitlich 13C/15N isotoopenmarkiert
MAS	Magic Angle Spinning	vCJD	variante CJD
MBM	Fleisch und Knochen Futter		

1. Einleitung

Die Evolution hat in vielen Millionen Jahren unzählige verschiedene Formen von Organismen hervorgebracht, Organismen die per Definition „leben“. Was ist es das wir als „Leben“ definieren? In der Biologie definieren wir „Leben“ wie folgt: ein lebender Organismus besitzt ein von der Umwelt abgegrenztes Stoffsystem (1), sowie einen damit verbundenen Stoff- und Energiewechsel der in Austausch mit der Umgebung steht (2). Des Weiteren organisieren sich lebende Organismen selbst (Homöostase) (3), pflanzen sich fort (4), wachsen und haben die Möglichkeit sich zu differenzieren (5). Des Weiteren reagieren sie auf einen chemischen oder physikalischen Stimulus aus ihrer Umgebung (6). Alle lebenden Organismen folgen einem gemeinsamen Dogma: sie speichern ihre vollständige Erbinformation, den Bauplan für ihre jeweilige Erscheinung, auf einzigartige Weise in Form von Genen in jeder Zelle des Organismus. Dieser Informationsträger ist die DNA (Deoxyribonucleic acid, *engl.*), welche die Downstream gerichtete Verarbeitung der Informationen zu den Bausteinen des Lebens ermöglicht. Die Evolution hat jedoch auch Partikel hervorgebracht die nicht als lebende Organismen kategorisiert werden können, sich aber dennoch der DNA, in einigen Fällen auch RNA, als Informationsträger bedienen. Diese als Viren bezeichnete Organismengruppe erfüllt keine der oben aufgeführten Bedingungen. Viren gelten allgemein als Krankheitserreger, da sie zur Verarbeitung der Information auf ihrer DNA einen sogenannten Wirt benötigen. Ihr Mechanismus der Infiltration des Wirts, also der Bevollmächtigung des Stoffwechsels zur Erstellung von Kopien der eigenen Erbinformation, das „Verpacken“ dieser Informationen in den Viruspartikeln und deren Freisetzung führen zu der Zerstörung des Wirtes, was als Pathogenität bezeichnet wird. Die Pathogenität der Viren ist auf vielfältige Weise von Organismus zu Organismus übertragbar. Die Wissenschaft fasste die Übertragung von Wirt zu Wirt zur Etablierung einer Infektion unter dem Dogma zusammen, dass diese nur möglich ist, wenn die Übertragung der nötigen Informationen über das genetische Material, also die Nukleinsäure (DNA oder RNA), erfolgt. Dieses Dogma fand Anfang der 1980er Jahre ein abruptes Ende mit der Entdeckung der sogenannten Prionen durch Stanley B. Prusiner und Mitarbeiter. Stanley B. Prusiner formulierte daraufhin die sogenannte „Protein only Hypothesis“ welche besagt, dass einzig ein Protein für die Prionerkrankung verantwortlich ist. Im Jahre 1997 wurde Stanley B. Prusiner für diese Arbeit mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet.

1.1. Allgemeine Übersicht zur Einordnung von Prionen als Pathogene

Schon Mitte der 1960er schlugen Alper und Mitarbeiter vor, dass der Auslöser der Traber-Krankheit (Scrapie) viel zu klein ist um ein virales Genom zu tragen [4]. Ihre Schlussfolgerungen basierten auf der Widerstandsfähigkeit des Auslösers gegen ionisierende Strahlung und UV-Bestrahlung zwischen 250 und 280 nm, welche die bekannten Pathogene wie Viren und Bakterien desaktivieren würde [5]. Es dauerte bis zum Anfang der 1980er Jahre bis Stanley B. Prusiner seine Entdeckung mit folgender Hypothese formulierte: „Because the novel properties of the scrapie agent distinguish it from viruses, plasmids, and viroids, a new term “prion“ is proposed to denote a small *proteinaceous infectious* particle which is resistant to inactivation by most procedure that modify nucleic acids“[6]. Damit war der Terminus “Prion” Protein (PrP) etabliert. Das Prion Protein verursacht tödliche neurodegenerative Erkrankungen, die auch als übertragbare schwammartige Hirnleiden (Transmissible Spongiform Encephalopathies (*engl.*), TSEs) bezeichnet werden. Das Prion Protein unterscheidet sich in jeder Hinsicht von allen anderen bisher bekannten Pathogenen insofern, dass es nur aus Protein besteht und keine weiteren Co-Faktoren und genomische Nukleinsäure zur Weitergabe seiner Erbinformationen benötigt. Die einzige Komponente die für eine Prion Erkrankung von Nöten ist, ist das in seinem Ursprung nativ gefaltete zelluläre Prion Protein (PrP^C). Dieses wird in Folge einer strukturellen Konformationsänderung von der nativen löslichen Form in die unlösliche, teilweise Proteinase-resistente Prion Protein Scrapie Isoform (PrP^{Sc}) konvertiert [7, 8]. Dabei wird die abnormale Scrapie Isoform durch das PrP^{Sc} selbst auf das native PrP^C übertragen. Die Prion assoziierten TSEs kommen in diversen Organismen vor (Tabelle 1). Im Menschen kommt es durch die Übertragung z.B. zu Krankheiten wie Kuru und Creutzfeld-Jakob (CJD), aber auch durch genetische Prädisposition kann es zu Prion basierten Erkrankungen wie dem Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) Syndrom und zur tödlichen familiären Schlaflosigkeit (Fatal Familial Insomnia (*engl.*) FFI) kommen. In Tieren kommen diese TSEs als Scrapie in Schafen und Ziegen vor, sowie als BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy (*engl.*) BSE, auch als Rinderwahnsinn bezeichnet) in Rindern oder auch als chronische Auszehrungskrankheit (Chronical Wasting Disease (*engl.*) CWD) bei Hirschen und Rotwild. Eine Kreuzübertragung von einer Spezies zur nächsten ist aufgrund der sogenannten Spezies-Barriere nur bedingt möglich. Die am besten erforschte Übertragung zwischen verschiedenen Säugetieren, welche Anfang der 1990er fast zu

einer Epidemie führte, ist die Übertragung von BSE auf den Menschen, welches die Creutzfeld-Jakob Erkrankung zu Folge hat.

Tabelle 1: Prionerkrankungen (nach Prusiner [9] geändert).

Erkrankung	Wirt	Mechanismus der Pathogenität
Kuru	Volk der Fore	Infektion durch rituellen Kannibalismus
iCJD	Mensch	Infektion durch Prion kontaminiertes HGH, Dura Mater Transplantationen, etc.
vCJD	Mensch	Infektion durch Rinder Prionen?
fCJD	Mensch	Keimbahnmutation im PrP Gen (D178N-V129, V180I, V180I + M232R, T183A, E196K, E200K, V203I, R208H, V210I, E211Q, M232R [10])
GSS	Mensch	Keimbahnmutation im PrP Gen (P102L-129M, P105L-129V, A117V-129V, Y145STOP-129M, F198S-129V, D202N-129V, Q212P-129?; Q217R-129V [11])
sCJD	Mensch	Somatische Mutation oder spontane Konversion von PrP ^C in PrP ^{Sc} ?
FSI	Mensch	Somatische Mutation oder spontane Konversion von PrP ^C in PrP ^{Sc} ?
FFI	Mensch	Keimbahnmutation im PrP Gen (D178N-M129)
Scrapie	Schafe und Ziegen	Infektion in genetisch anfälligen Schafen und Ziegen
BSE	Rindern	Infektion mit Prion kontaminiertem MBM
TME	Nerz	Infektion mit Prionen von Schafen oder Rindern
CWD	Hirsche und Elche	Nicht bekannt
FSE	Katzen	Infektion mit Prion kontaminiertem Rindergewebe oder MBM
EUE	Nyalas, Große Kudus und Oryx	Infektion mit Prion kontaminiertem MBM

iCJD: iatrogenische CJD, vCJD: variante CJD, fCJD: familiäre CJD, sCJD: sporadische CJD, GSS: Gerstmann-Sträussler-Scheinker Erkrankung, FFI: Tödliche familiäre Schlafkrankheit, FSI: Tödliche spontane Schlafkrankheit, BSE: Schwammartige Enzephalopathie bei Rindern (Rinderwahnsinn), TME: Übertragbare Nerz Enzephalopathie, CWD: Chronische Auszehrungskrankheit, FSE: Schwammartige Enzephalopathie bei Katzen, HGH: Menschliche Wachstumshormone, MBM: Fleisch und Knochen Futter

Neben den Säugetier-Prionen, wurden in den letzten Jahren vermehrt Prionen-ähnliche Proteine in Hefepilzen entdeckt, darunter das Sup35 und das Het-S. Im Gegensatz zu den Säugetier-Prionen wird u.a. vermutet, dass die Aggregation der nativen Isoform in

die fehlgefaltete Isoform in den Hefepilzen zu einer Verbesserung der Fitness und so eine bessere Anpassung an bestimmte Umweltbedingungen ermöglicht [12]. Neusten Studien zufolge, wird auch ein Prion ähnliches Protein in Pflanzen vermutet [13].

1.2. Das zelluläre Prion Protein (PrP^C)

Das zelluläre Prion Protein, welches durch das *Prnp* Gen kodiert ist, ist ein Glykoprotein, dessen Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Im Zusammenhang mit der Alzheimer'schen Demenz, die auch zu den Protein induzierten neurodegenerativen Krankheiten gehört, wird eine Wechselwirkung des PrP^C mit dem Alzheimer-assoziierten A β Protein vermutet [14, 15]. Das *Prnp* Genprodukt hat eine Länge von ca. 250 Aminosäuren (AS), abhängig vom Organismus, und eine Molekularmasse von 33-35 kDa (un-, mono- oder diglykolisiert). Im nativen Zustand ist es löslich und sensitiv für den Proteinase K Verdau [16-19]. Trotz der teilweise großen Unterschiede in der Aminosäuresequenz des PrP^C zwischen den verschiedenen Organismen (z.B. Frösche und Hühner zu den Säugetieren) sind die wesentlichen strukturellen Merkmale des PrP^C hoch konserviert (Abbildung 1) [20]. N-terminal beginnt das PrP^C mit einer 22-25 AS langen Signalsequenz, die posttranslational abgespalten wird. Der folgende nicht gut strukturierte N-Terminus beinhaltet mehrere (2–7) Octarepeats (OR), die von zwei positiv geladenen Clustern (CC1 und CC2) flankiert werden. Durch die hydrophobe Region (HC) ist der N-Terminus mit dem globulär strukturierten C-Terminus verbunden [2, 16]. Innerhalb der HC-Region befindet sich die Palindrom-Sequenz VAGAAAGAV, die für die Rekrutierung neuer Monomere zur Anlagerung an die Fibrillen verantwortlich ist [21]. Im nativen Zustand besitzt das PrP^C eine intramolekulare Schwefelbrücke zwischen den zwei vorhandenen Cysteine Cys182 und Cys217 und, abhängig von der Belegung mit Glykosylgruppen an den Aminosäureresten von Asn184 und Asn200, liegt es im un-, mono- oder diglykolisiert Zustand vor [16, 22]. In einer Transaminierungsreaktion wird posttranslational das hydrophobe Peptid ab AS 233 abgespalten und dafür ein Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker an Ala233 angehängt [16].

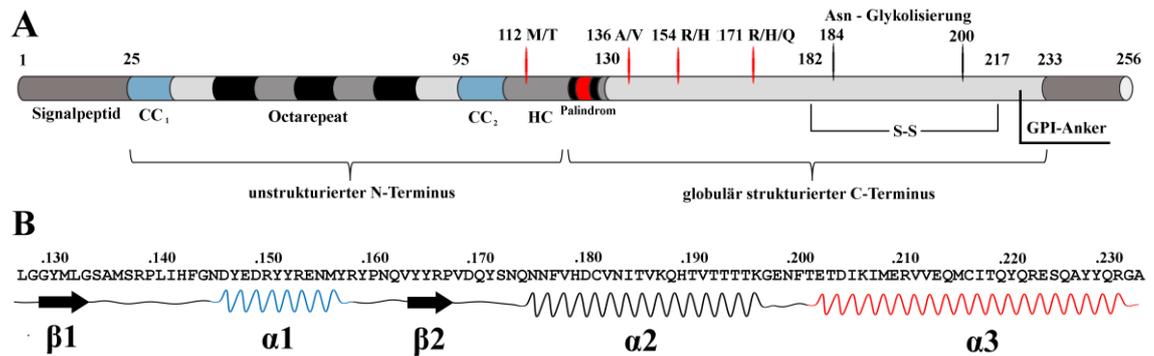


Abbildung 1: Funktionelle Bereiche (A) und sekundär Struktur (B) des Schafs PrP.

(A) N-Terminus wird das Signalpeptid abgespalten, C-Terminus ein GPI-Anker angehängt. Das Propeptid besitzt eine Molekulare Masse von 33-35 kDa abhängig von dem Glykosylierungszustand an Position Asn 184 und Asn 200. Die häufigsten Variationen der Sequenz sind an Positionen 112M/T, 136A/V, 137M/T, 141L/F, 154R/H und 171R/H/Q zu finden. (B) Sekundäre Struktur Motive des Schafs PrP nach Wüthrich [3]. Die drei α -Helices umspannen die Aminosäurereste 144-154 (Helix A), 179-193 (Helix B) und 200-217 (Helix C), das antiparallele β -Faltblatt umfasst Aminosäurereste 128-131 sowie Aminosäurereste 161-164

1.3. Die Polymorphismen des Schafs (*Ovis Aries*) Prion Proteins

Das *Prnp* Genprodukt in Schafen (*ovis aries*) besitzt eine Länge von 256 AS, wobei posttranslational das Signalpeptid (AS 1-24) und das Propeptid (AS 234-256) abgespalten werden, sodass das prozessierte Major Prion Protein eine Länge von 209 AS aufweist (Abbildung 1). Im Gegensatz zu allen anderen Organismen besitzt das Schafs Prion Protein die höchste Sequenzdiversität. Die häufigsten Variationen sind an Position 112 (M/T) [23], 136 (A/V) [24], 137 (M/T) [25], 141 (L/F) [26], 154 (R/H) [24] und 171 (R/H/Q) [27] lokalisiert, wobei nur die drei Positionen 136, 154 und 171 mit der Anfälligkeit für Scrapie in Verbindung gebracht werden. Die Kombinationen dieser Variationen würden zu zwölf verschiedenen Allelen führen, von denen aber üblicherweise nur fünf gefunden werden können, die jeweils eine unterschiedliche Anfälligkeit für Scrapie aufweisen. Das ARQ und VRQ zählen zu den Allelen mit der höchsten Anfälligkeit für Scrapie, AHQ und ARH zu denen mit einer geringen Anfälligkeit und das ARR Allel scheint zu einer Resistenz gegen Scrapie zu führen [27-29]. Aber auch die unterschiedlichen Kombinationen der Allele zeigen verschiedene Anfälligkeiten für Scrapie; die Kombinationen die das VRQ Allel tragen, z.B. ARQ/VRQ, ARH/VRQ oder VRQ/VRQ zählen zu den Allelkombinationen mit der höchsten Anfälligkeit für Scrapie. Die Kombination aus AHQ/VRQ zeigt jedoch nur eine sehr geringe Anfälligkeit, für die homozygote Kombination ARR/ARR konnte bisher kein Fall von Scrapie beobachtet werden [30]. Zu einer der am häufigsten auftretenden als auch anfälligsten Allelkombination zählt auch die homozygote ARQ Variation [29]. In den letzten Jahren mehren sich jedoch die Beweise, dass eine weitere Position in der Sequenz die Anfälligkeit im höchstem Maße beeinflusst, auch in der

homozygoten ARQ Variation. Die Analyse der T₁₁₂ Variation zeigte eine Verlängerung der Überlebenszeit, ebenfalls in heterozygoten Typen MARQ/TARQ, was darauf schließen lässt, dass die M12T Mutation zur genetische Resistenz gegen klassisches Scrapie führt[31].

1.4. Die Struktur des zellulären Prion Protein

Aufgrund der geringen Menge, unzureichender Reinheit und fehlender Isotopenmarkierung des natürlich vorkommenden PrP^C, konnte bis dato keine NMR-Spektroskopie und/oder Röntgenkristallographie des natürlich vorkommenden PrP^C gemacht werden. Durch die rekombinante Expression eukaryotischer Gene in *E.coli* war es jedoch möglich das PrP^C in ausreichender Menge, Reinheit und Isotopenmarkierung herzustellen. Damit war es erstmals

für Wüthrich und Mitarbeiter möglich eine hoch aufgelöste NMR-Struktur zu bestimmen. Die erste postulierte PrP^C Struktur war die des C-terminalen Maus PrP^C (Aminosäurereste 121-231 umfassende). Die globuläre Faltung des mPrP(121-231) umfasst drei α -Helices und ein zweisträngiges, antiparallel verlaufendes β -Faltblatt (Abbildung 2). Die drei α -Helices umspannen dabei die

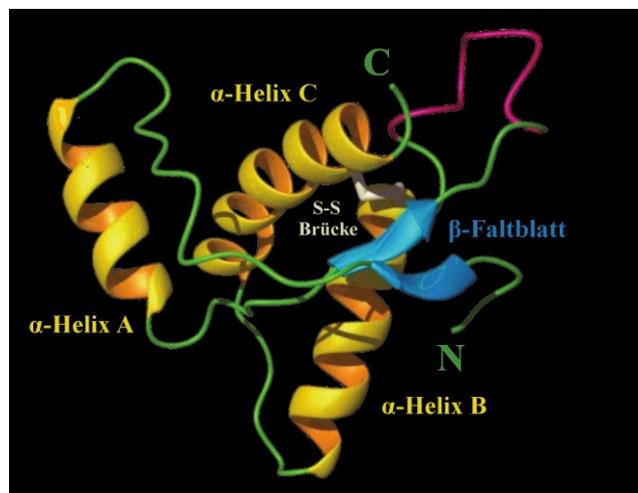


Abbildung 2: Banddarstellung der Struktur von globulär gefaltetem mPrP(121-231)

Gelb: α -Helix, Cyan: β -Faltblatt, Grün: gut strukturierte Loop-Region, Magenta: unstrukturierte Loop-Region (von Aguzzi und caella [2]).

Aminosäurereste 144-154 (Helix A), 179-193 (Helix B) und 200-217 (Helix C). Das antiparallele β -Faltblatt umfasst die Aminosäurereste 128-131 sowie die Aminosäurereste 161-164. Die erste Windung der Helix B und die letzte Windung der Helix C sind über die einzige vorhandene Disulfidbrücke verbunden, wodurch ein verdrehtes V-geformtes Gerüst entsteht, das die Helix A und das β -Faltblatt fixiert [32]. Der Vergleich der 3D-Strukturen des N-terminal verkürzten Fragments mPrP(121-231) mit dem volllängen Maus PrP^C mPrP(23-231) zeigte keinen signifikanten Unterschied des globulär gefalteten C-Terminus, was nahe legt, dass der nicht gefaltete N-Terminus keine Auswirkungen auf die Faltung des C-Terminus hat [33]. Durch die Bestimmung der Prion Protein Strukturen des Hamsters (SHa), Rinds (b), Schafs (ov) und Menschen (hu) konnte gezeigt werden, dass alle Prion Proteine, trotz der kleinen Variationen in

den Längen der α -Helices und dem zweisträngigem β -Faltblatt, hohe strukturelle Ähnlichkeiten des globulären C-Terminus besitzen [3, 18, 34-36]. Der strukturelle Vergleich zwischen dem Schafs und Rinder Prion zeigte außerdem eine fast identische Faltung [37], was zur Tatsache passt, dass Scrapie auf Rinder (und vice versa) übertragen werden kann. Wahrscheinlich führte die Tiermehl Verfütterung, gewonnen aus Schafen die an Scrapie erkrankt waren, zu der BSE Epidemie in den USA und England Mitte der 1980er und schlussendlich zu der Übertragung von BSE auf den Menschen und die damit verbundene variante Creutzfeld-Jakob (vCJD) Epidemie Ende der 1980er bzw. Anfang der 1990er Jahre [38]. Eine direkte Übertragung von Schaf auf Mensch konnte bisher nicht beobachtet werden. Die Gründe scheinen in der sog. Speziesbarriere zu liegen, die nicht nur Spezies übergreifend sondern auch innerhalb einer Spezies beobachtet werden kann. So ist die Anfälligkeit sehr unterschiedlich innerhalb der verschiedenen Schafs Prion Varianten (siehe Kapitel 1.3).

Die Aufklärung der Struktur des Schafs Prion mit dem Polymorphismus an Position 171 (R/H/Q) zeigte, dass dieser Aminosäurerest freiliegend an der Proteinoberfläche sitzt

(Abbildung 3). Ist diese Position mit einem Glutamin (Q171) oder einem Histidin (H171) besetzt, so ist die jeweilige Variation hoch anfällig für Scrapie [27]. Wird diese Position jedoch mit einem positiv geladenen Arginin (R171) besetzt, ist die jeweilige Variation resistent gegen Scrapie [27]. Dementsprechend ist die Untersuchung verschiedener Varianten, und der Vergleich der Strukturen in Bezug auf die Übertragung zwischen den einzelnen Spezies/Varianten von bedeutender Wichtigkeit für das Verständnis des Übertragungsmechanismus und der daraus folgenden Speziesbarriere.

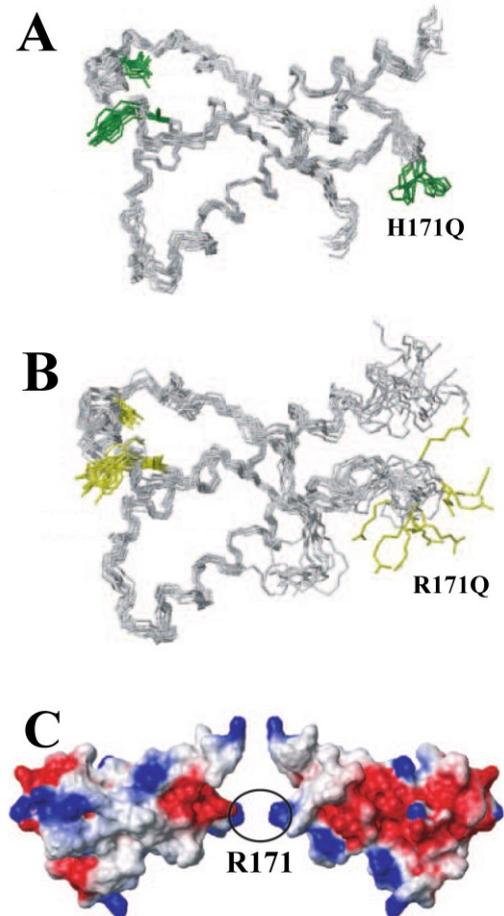


Abbildung 3: NMR Struktur zweier globulär gefalteten ovPrP Varianten.

A) ovPrP(H171), **B)** ovPrP(R171), Grau zeigt das Proteinrückgrat, Gelb und Grün zeigen jeweils die Unterschiede zum bPrP, **C)** Elektronendichtemappe der ovPrP(R171) Variante. Nummerierung der Aminosäurereste wurde an die Schafssequenz angepasst im Vergleich zur Original Publikation (von Lysek et al. [3]).

1.5. Das Scrapie assoziierte PrP^{Sc}

Sei es überraschend oder nicht, die Entdeckung des Scrapie assoziierten Erregers, das Prion Protein zeigte, dass das PrP Gen als einzelne Kopie vorliegt. Daraus folgend existieren zwei Isoformen, wovon eine ungefährlich ist, die andere aber zu einer tödlich verlaufenden neurodegenerativen Krankheit führt [17]. Tatsächlich zeigt die PrP^{Sc} Isoform unterschiedliche Eigenschaften zu der zellulären nativen Isoform PrP^C. Im Gegensatz zu der nativen Isoform ist das PrP^{Sc} unter nicht-denaturierenden Bedingungen unlöslich und teilweise resistent gegen den Verdau durch Proteinase K (Kapitel 1.6) [39, 40]. Des Weiteren erhöht sich der β -Faltblatt Anteil während sich der α -Helix Anteil verringert [7].

nicht Infiziert



zelluläre Isoform PrP^C

- löslich
- PK-sensitiv
- α -Helikal
- Nicht-infektiös

Infiziert



Scrapie Isoform PrP^{Sc}

- unlöslich (Plaques)
- PK-resistent
- überwiegend β -Faltblätter
- Infektiös

Abbildung 4: Vergleich der nicht-infektiösen und infektiösen Form des PrP.
Abbildung aus kronehit.at und fotkyfoto.de

1.6. Proteinase K Proteolyse als Marker zum Nachweis von PrP^{Sc}

Eine der wichtigsten Entdeckungen in der Entwicklung des Prion Strukturmodells, war die Tatsache, dass das aufgereinigte PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat von infizierten Tieren höchst resistent gegen den proteolytischen Verdau durch Proteinase K (PK) ist, während das PrP^C aus nicht infizierten Tieren sensitiv gegen den proteolytischen Verdau ist [41]. Durch den proteolytischen Verdau werden vom PrP^{Sc} ca. 70 Aminosäurereste N-terminal abgespalten, sodass nur der 27-30 kDa große PK-resistente Kern, das sog. PrP²⁷⁻³⁰, übrigbleibt [42]. Trotz des proteolytischen Verdaus behält das PrP²⁷⁻³⁰ seinen infektiösen Charakter und zeigt damit, dass der N-Terminus nicht in den Infektionsprozess involviert ist [43]. Durch die gleichzeitige Behandlung von PrP^{Sc} mit Proteinase K und dem Detergenz Sarkosyl, entstehen die sog. Prion-Rods, infektiöses

PrP²⁷⁻³⁰ mit kompakten fibrillären, stabähnlichen Formen und amyloiden Eigenschaften [44]. Diese amyloiden Prion-Rods besitzen einen noch höheren Anteil an β -Faltblättern (~54 %) und einen geringeren Anteil an α -Helices (21 %) als das PrP^{Sc} [45]. Der proteolytische Verdau mit Proteinase K und die damit verbundene Resistenz wird zudem als Hinweis für eine potentielle Infektiösität verwendet, vor allem für *in vitro* generierte amyloide Fibrillen, welche auch als PrP^{res} bezeichnet werden [46, 47]. *In vitro* generiertes und PK-resistentes PrP^{res} zeigt, unter anderem durch die fehlende Glykolisierung und den fehlenden GPI-Anker, ein anderes Bandenmuster nach PK Proteolyse als aus Hirnhomogenat aufgereinigtes PrP^{Sc}.

Das *in vitro* generierte Maus PrP^{res} zeigt z.B. ein Bandenmuster mit drei verschiedenen Größen (12, 10 und 8 kDa), die mit den Fragmenten 138/141-230, 152/153-230 und 162-230 korrespondieren (Abbildung 5A). Im ggs. dazu zeigt das Maus PrP^{Sc} (ohne Glykolisierung) zwar auch ein Bandenmuster mit drei Größen, die aber höher sind als beim PrP^{res} mit 16 kDa, 14 kDa und 12 kDa bzw. den Fragmenten ~130-230, ~142-230 und ~157-230 entsprechen (Abbildung 5B) [48].

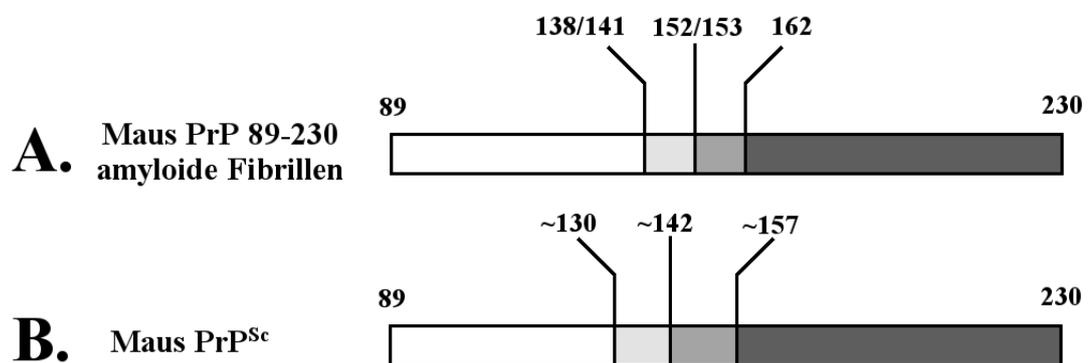


Abbildung 5: Fragment Größen der Maus PrP Fibrillen nach der Behandlung mit Proteinase K.
A. Fragmente der *in vitro* generierten Maus PrP Fibrillen. B. Fragmente des Maus PrP^{Sc} ohne Glykolysierung [48].

1.7. Konversion des PrP^C zu PrP^{Sc}

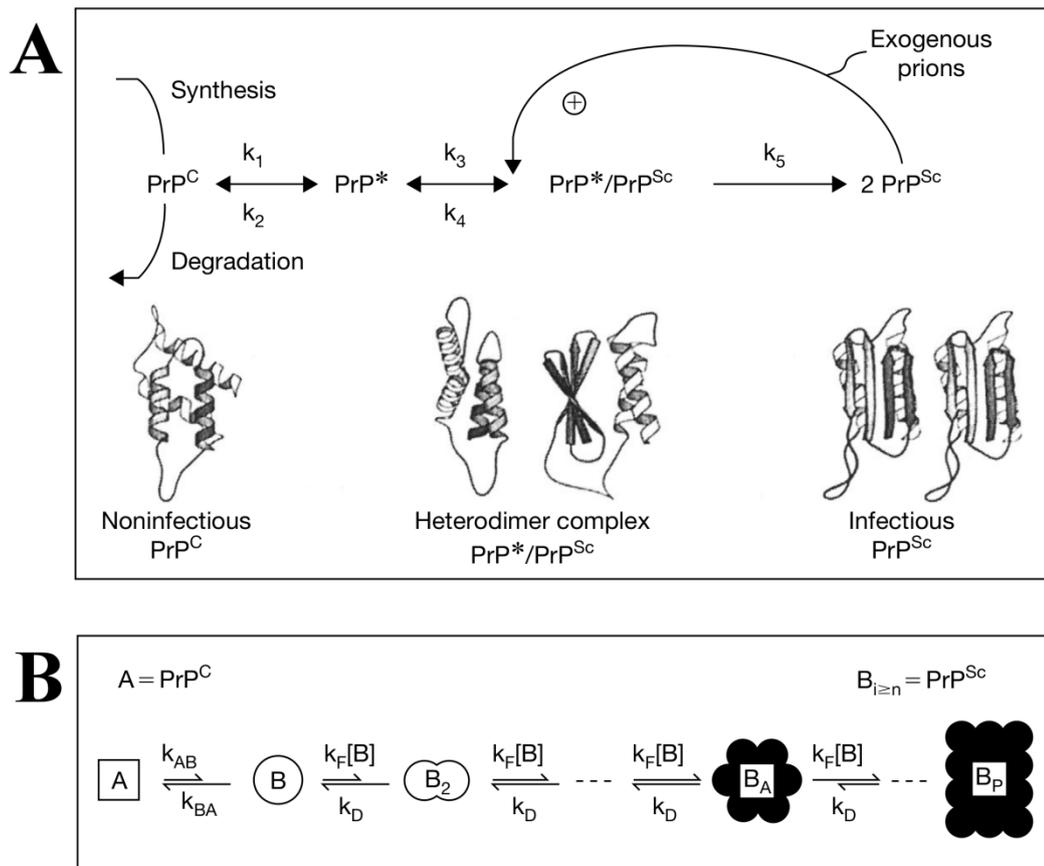


Abbildung 6: Schematische Darstellung der beiden Konversionsmodelle

(A) von Huang et al. [49], (B) von Eigen [50]. (A) Das originale Prusiner Konversionsmodell: PrP^C wird durch den zelleigenen Metabolismus synthetisiert und wieder degradiert. PrP* wird durch exogenes PrP^{Sc} in einem Heterodimer rekrutiert, zu PrP^{Sc} konvertiert und in Aggregaten abgelagert. (B) Das Lansbury Modell: PrP^C und PrP^{Sc}-ähnliche Struktur stehen in einem thermodynamischen Äquilibrium, das PrP^C wird bevorzugt. Nach Bildung etlicher Intermediate durch die PrP^{Sc}-ähnlichen Moleküle, entsteht ein PrP^{Sc} Nucleus mit den typischen Prionen Eigenschaften.

Seitdem bekannt ist, dass das Prion Protein für eine Vielzahl neurodegenerativer Krankheiten verantwortlich ist, konnte das eigentliche Hauptereignis, die Konversion des zellulären und nativ gefalteten PrP^C zu dem fehlgefalteten und infektiösem PrP^{Sc}, noch nicht aufgeklärt werden. Dies ist wohl auch dem Fakt geschuldet dass, im Gegensatz zu dem nativ gefalteten PrP^C, noch keine detaillierte 3D-Struktur des PrP^{Sc} publiziert werden konnte. Eine der ersten Konversionsmechanismen die diskutiert wurden, sind die von Prusiner und Mitarbeitern bzw. von Lansbury [2, 43, 47, 49, 50], die jedoch nach heutigem Stand keine Rolle mehr spielen.

In dem von Prusiner und Mitarbeitern entwickelten Konversionsmodell (Abbildung 6Abbildung 5A) [2, 43, 49] wird das PrP^C als Teil des normalen Metabolismus synthetisiert und degradiert. Exogenes PrP^{Sc} kann im Zuge einer Infektion das

Intermediat PrP^* , welches spontan entsteht, in einem Heterodimer binden. Das ist auch der Grund, warum angenommen wird, dass PrP^{Sc} allein nur als Heterodimer existieren kann. Analog zu den Chaparonen wird angenommen, dass das PrP^{Sc} dann die Konversion von PrP^* zu PrP^{Sc} induziert. Die Konversion wird so lange vorangetrieben, wie PrP^{C} durch den Zellmetabolismus synthetisiert wird. Das neugenerierte PrP^{Sc} bildet sodann neue Aggregate oder wird in bestehende eingebaut. Diese sog. Aggregation stabilisiert zugleich die PrP^{Sc} Isoform. Das von Lansbury und Mitarbeitern postulierte zweite Konversionsmodell (Abbildung 6B) [2, 43, 47, 50] geht davon aus dass die Fibrillenformation, ähnlich der Formation der „linearen Kristalle“ von Actin oder β -Amyloid, und die Generierung von Infektiösität eng miteinander verbunden sind. Das PrP^{C} steht dabei in einem sehr schnellen thermodynamischen Äquilibrium mit einer PrP^{Sc} -ähnlichen Struktur, wobei das PrP^{C} thermodynamisch bevorzugt wird. Etliche Intermediate müssen gebildet werden bevor ein stabiler PrP^{Sc} Nucleus generiert werden kann. Dieser stabile Nucleus ist das erste Aggregat mit den typischen Prionen Eigenschaften. Eigen verglich beide Modelle in Bezug auf die Gesetze der Thermodynamik und Kinetiken [50]. Es stellte sich heraus, dass beide Modelle nicht an realistische Bedingungen angepasst werden können. Innerhalb der Lebensspanne eines Säugetiers würde nach beiden eine Infektion immer oder nie geschehen, was im Gegensatz zur Realität steht. Jedoch wenn mehrere PrP^{Sc} kooperativ PrP^{C} Moleküle transformieren würden, vergleichbar mit einer allosterischen Enzymreaktion, würde ein sog. Schwellenwert mit einbezogen und der daraus resultierende Mechanismus würde nicht entgegen der bekannten Thermodynamiken und Kinetiken verstoßen. Zusammen genommen haben somit beide Modelle viele Ähnlichkeiten in dem Sinne, dass mehrere PrP^{Sc} Moleküle in den Konversionsmechanismus involviert werden müssen.

Ein weiterer entscheidender Faktor für die Rekrutierung und Konversion von PrP^{C} zu PrP^{Sc} scheint die palindromische Sequenz (116-AGAAAAGA-123) zu sein. Mastrianni und Mitarbeiter [51] konnten zeigen, dass PrP^{C} mit fehlender palindromischer Sequenz weder zu PrP^{Sc} konvertiert werden kann noch kann eine PK-Resistenz generiert werden kann.

1.8. *In Vitro* Konversion

Durch die Entwicklung von Systemen zur Expression des Prion Proteins in *E.coli* wurde es erstmal möglich die native Struktur des PrP^C zu untersuchen. Wüthrich und Mitarbeiter war es dann möglich die Strukturen von Prion Proteinen aus diversen Tieren aufzuklären (siehe Kapitel 1.4). Doch dies war erst der Anfang auf einem langen Weg zum Verständnis der Fehlfaltung des PrP^{Sc} und dem damit verbundenen Mechanismus zur Entstehung der Infektiösität. Analog zu den Voraussetzungen die an die Strukturaufklärung des nativen PrP^C gestellt wurden, werden diese auch an die Strukturaufklärung des PrP^{Sc} gestellt. Im Einzelnen heißt das: hoch reine und hoch konzentrierte Proben, die im Idealfall keine heterogenen Strukturen aufweisen und je nach hochauflösender Technik (wie z.B. NMR-Spektroskopie), auch isotopenmarkierte sind. Ein erstes Problem ist dabei die Probenvorbereitung von amyloiden Fibrillen, die die Eigenschaften von PrP^{Sc} imitieren. In den Jahren nach dem Prusiner seine „Protein only Hypothesis“ postulierte, versuchten viele Gruppen die Eigenschaften der PrP^{Sc} Fibrillen *in vitro* zu imitieren. Dabei wurden zahlreiche Methoden entwickelt, jedoch scheiterten die meisten Methoden an der *in vitro* Generierung von infektiösen amyloiden Fibrillen. Aber auch die Methoden zur *in vitro* Generierung von nicht-infektiösen amyloiden Fibrillen konnten und können dabei helfen ein besseres Verständnis über den Mechanismus und damit auch die nötigen Eigenschaften von amyloiden Fibrillen zu erlangen.

Der zellfreie Konversionsassay, erstmals eingeführt von Caughey und Mitarbeitern, war der *in vitro* Konversionsassay mit dem es möglich war PK-resistent amyloide Fibrillen herzustellen [52]. Bei dieser Methode werden unter denaturierenden Bedingungen mit Guanidiniumchlorid (GdnHCl) kleine Mengen an PrP^C, welches aus Mausfibroblasten gewonnen wird, in Anwesenheit von hohen Konzentrationen des PrP^{Sc}, aufgereinigt aus infiziertem Gehirnmaterial, konvertiert. Unter diesen Bedingungen werden jedoch nur 10-20 % des PrP^C in PK-resistentes PrP^{Sc} konvertiert[47]. Zur Optimierung wurden weitere Versuche unter variierten Bedingungen durchgeführt. Zum einen wurde das GdnHCl entweder durch KCl oder auch NaCl, die näher an die physiologischen Bedingungen heran reichen, substituiert. Zum anderen wurde das PrP^C aus Fibroblasten durch rekombinant expremiertes rPrP ersetzt. In Anwesenheit von PrP^{Sc} konnte hierbei ebenfalls PrP^C in PK-resistente amyloide Fibrillen konvertiert werden [53]. Dieser Konversionsassay hat jedoch einige Einschränkungen. Unter anderem muss das PrP^{Sc} in ca. 50-fachem Überschuss

hinzugefügt werden. Des Weiteren sind die generierten PK-resistenten amyloiden Fibrillen nicht in der Lage die Krankheit in Bioassays auf die verwendeten Tiere zu übertragen [52, 54]. Eine ähnliche Methode wurde von Soto und Mitarbeitern entwickelt [55] und unterscheidet sich dadurch, dass Zelllysate für die Konversion des PrP^C verwendet wird. Interessanterweise unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass die Generierung von PK-Resistenz durch zelluläre Co-Faktoren unterstützt wird. Aber auch diese Methode hat dieselben Einschränkungen wie der zuvor erwähnte zellfreie Konversionsassay.

Die „**Protein Misfolding Cyclic Amplification**“ (PMCA) wurde zum ersten Mal von Soto und Mitarbeitern beschrieben und wurde zur autokatalytischen Konversion des PrP^C zu PrP^{Sc} entwickelt [56]. Die PMCA Methode amplifiziert PrP^{Sc} aus PrP^C in einer zyklischen Weise, wobei nicht-infiziertes Hirnhomogenat (NBH) mit Prion infiziertem Hirnhomogenat (IBH) bei 37 °C inkubiert wird. Durch Ultraschall werden die Prion Aggregate in kleinere Einheiten zerbrochen und dienen dann als Nukleus für die weitere Rekrutierung von PrP^C und Formierung von weiteren Aggregaten. Das entstandene PrP^{Sc} ist sowohl PK-resistent als auch infektiös und über 99 % des PrP^C wird in PrP^{Sc} konvertiert [56, 57]. Eine Weiterentwicklung der PMCA Methode ist die „serial automated PMCA“ (saPMCA), eine Kombination automatisierter Ultraschall Schemata mit einer sich wiederholenden Serie von PMCA und Verdünnungszyklen [57].

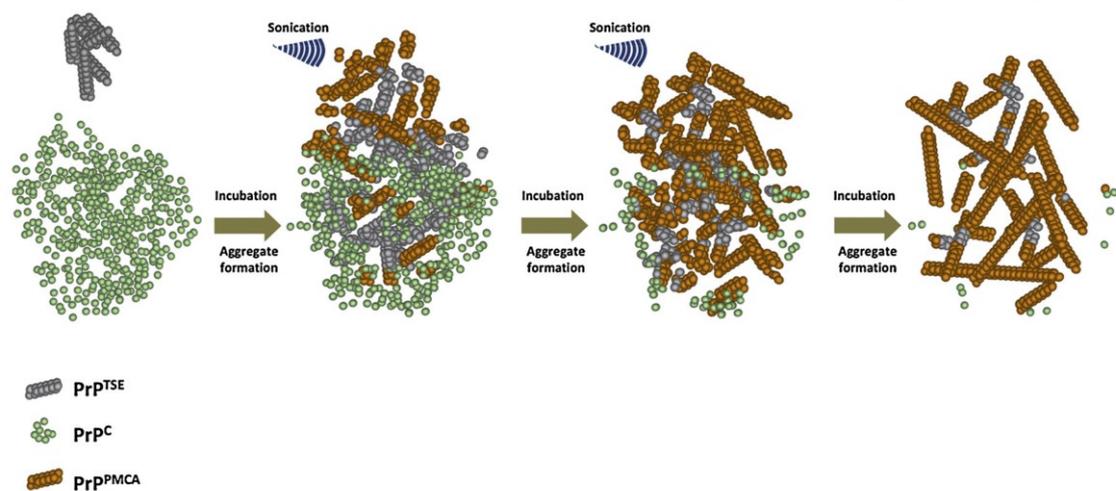


Abbildung 7: Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA).

Schematische Darstellung der PMCA Methode. Ein kleiner Teil von PrP^{TSE} (Reaktionsvorlage) wird mit einer großen Menge an PrP^C vermischt (Reaktionssubstrat). Die Mischung wird sonifiziert um die großen PrP^{TSE} Aggregate in kleinere Nukleus-Einheiten zu fraktionieren. Die Proben werden anschließend bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubation übertragen die PrP^{TSE} die Fehlfaltung auf die PrP^C Moleküle und ermöglichen so das Wachstum der PrP^{TSE} (als PrP^{PMCA} dargestellt). Die mehrfache Wiederholung des Sonifizierungs- und Inkubationszyklus ermöglicht so die Vervielfältigung der PrP^{TSE} von einer verschwindend geringen Menge [57].

Diese Methode hat den Vorteil, dass sie eine extrem hohe Sensitivität im Bereich von 20 fg/ml PrP^{Sc} als Ausgangsmaterial hat [58]. Des Weiteren konnte mit dieser Methode zum ersten Mal PK-resistente und infektiöse amyloide Fibrillen *in vitro de novo* hergestellt werden [59].

Der „Autocatalytic Conversion Assay“, entwickelt von Prusiner und Mitarbeitern, ermöglicht die selektive Konvertierung von denaturiertem rekombinant exprimierten PrP (rPrP) in Abwesenheit von PrP^{Sc} [60-62]. Durch die Inkubation von rPrP in Urea oder GdnHCl werden sowohl β -Oligomere, als auch PK-resistent amyloide Fibrillen gebildet. Des Weiteren kann durch kontinuierliches Schütteln unter diesen denaturierenden Bedingungen die Bildung von amyloiden Fibrillen direkt induziert werden ohne dass zuvor β -Oligomere gebildet werden. Die relativ lange Lag-Phase zu Beginn dieses Assays kann durch Hinzugabe von PrP^{Sc} signifikant reduziert werden. Eine Weiterentwicklung dieses Assays stellt das sog. „Semi-Automated Conversion Assay“ dar [60, 63], das die GdnHCl Methode verwendet um rekombinantes volllängen PrP (Aminosäurereste 23-230), in 96-Well Platten unter kontinuierlichem Schütteln in amyloide Fibrillen zu konvertieren. Diese Methode wird in erster Linie zur kinetischen Untersuchung der Fibrillenformation verwendet. Beide Assays, der Autocatalytic Conversion Assay und der Semi-Automation Assay, haben vielfache Vorteile im Vergleich zu allen anderen *in vitro* Konversionsassays. Zum einen werden alle zellulären Faktoren, die die Interaktion zwischen PrP^C und PrP^{Sc} stören könnten eliminiert. Zum anderen ist die *de novo* Konversion von PrP^C zu PrP^{Sc}, ohne einen ursprünglichen PrP^{Sc} Nukleus, eine relevante *in vitro* Methode zur Simulation der Bedingungen von sporadischen Prion Erkrankungen. Weiterhin ist, im Gegensatz zum PMCA Assay, keine Reduzierung der Disulfidbrücke nötig. Das wiederum ahmt den Zustand des PrP^C und PrP^{Sc} unter nativen Bedingungen nach. Nichtsdestotrotz existiert um die Infektiösität der synthetischen Prionen immer noch eine kontroverse Diskussion. Um Infektiösität im Mausmodell (Wildtyp) zu erhalten müssen die synthetischen Prionen mehrmals durch transgene Mäuse, die PrP⁸⁹⁻²³⁰ überexprimieren, passagiert werden, bevor diese eine Infektiösität zeigen können. Die Infektion zeigt sich aber auch direkt in den transgenen Mäusen [64, 65]. Doch auch transgene Mäuse, die PrP^C überexprimieren, aber nicht mit PrP^{Sc} inkubiert wurden, zeigen nach gewisser Zeit Anzeichen von spontanen neurologischen Erkrankungen [66], und stellen damit die Infektiösität der synthetischen Prionen in Frage.

1.9. Die Struktur des PrP^{Sc}

Die spezifischen Eigenschaften der PrP^{Sc} Fibrillen (unlöslich, nicht krisallisierbar) bergen Hindernisse für hochauflösende Methoden wie Röntgenkristallographie oder auch Flüssig-NMR. Erste strukturelle Untersuchungen blieben somit auf niedrigauflösende Methoden wie z.B. Zirkulardichroismus- (CD) oder Fouriertransform-Infrarot- (FTIR) Spektroskopie beschränkt. In den letzten Jahren wurde jedoch die Zugänglichkeit zu hochauflösenden Methoden wie Festkörper-NMR oder der Elektronenmikroskopie möglich.

1.9.1. Die Struktur von PrP^{Sc} Fibrillen

Mittels CD- und FTIR-Spektroskopie konnten die sekundären Strukturelemente der Prionen-Fibrillen aufgedeckt werden. Der β -Faltblatt Anteil erhöht sich von 3 % (PrP^C) auf ~43 % (PrP^{Sc}) während sich der α -Helix Anteil von 42 % (PrP^C) auf ~30 % (PrP^{Sc}) verringert [8]. Im Falle des PrP²⁷⁻³⁰ ist hingegen ein noch höherer Anteil an β -Faltblättern (~54 %) und ein geringerer Anteil an α -Helices (21 %) als beim PrP^{Sc} erkennbar [45]. Die limitierte Proteolyse durch die Proteinase K entfernt ein ca. 6 kDa großes Fragment, wodurch das gekürzte 27-30 kDa schwere PrP²⁷⁻³⁰ entsteht, welches seinen infektiösen Charakter behält. Das legt nahe, dass der C-Terminus der eigentliche β -Faltblattkern ist und benötigt wird, um weitere PrP^C Moleküle zu rekrutieren und konvertieren, und um die Prionkrankheit weiter zu geben. Antikörper Bindungsstudien konnten zeigen dass der Bereich der Aminosäurereste ~90-120 nicht für Antikörper zugänglich ist bis das gesamte Molekül entfaltet ist, die C-terminal davon liegenden Regionen jedoch schon [67]. Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Rasterkraftmikroskopie (AFM) konnten zeigen, dass Fibrillen die mit Proteinase K und Sarkosyl behandelt wurden eine markante, makroskopische Struktur aufweisen (die sog. „Prion-Rods“) welche kürzer (100-200 nm) und schmaler (10-20 nm) sind als die Prionen-Fibrillen [44, 68]. Röntgen-Faserbeugungsstudien von faserähnlichen amyloiden zeigen eine Kreuz- β -Faltblatt Struktur, aufgebaut aus β -Faltblättern die senkrecht zur Faser Achse gestapelt sind. Vergleichbar zu diesen Ergebnissen, zeigen Faserbeugungsstudien von rekombinanten, Proteinase K behandelte PrP²⁷⁻³⁰ Fibrillen ähnliche Beugungsmuster wie die der Kreuz- β -Faltblatt Struktur, eine meridionale Reflexion bei ~4.8 Å und eine äquatorial Reflexion bei ~10 Å [69]. Im Gegensatz dazu fehlte bei volllängen PrP^{Sc} die äquatorial Reflexion bei 10 Å, die durch eine Reflexion bei ~8 Å ersetzt wurde. Das suggeriert, dass PrP^{Sc} eine Struktur ähnlich dem Kreuz- β -Faltblatt besitzt, die aber wesentliche Unterschiede aufweist [69]. Elektronen

Paramagnetische Resonanz (EPR) Spektroskopie Studien von gezielt Spin markierten rekombinanten hPrP(30-231) (*de novo* generierte Fibrillen) zeigten ein parallel gleichsinnig verlaufendes β -Faltblatt, welche die Aminosäurereste ~160-220 umschließt (Abbildung 8) [70]. Davon ausgehend ist für die strukturelle Konversion, hin zu dem parallel gleichsinnig verlaufenden β -Faltblatt, eine vollständige Neuordnung des C-Terminus nötig. Es ist jedoch fragwürdig ob diese Struktur die des natürlich vorkommenden PrP^{Sc} widerspiegelt, da diese Fibrillen in keinem Bioassay eine Infektiosität zeigen konnten. Nichtsdestotrotz konnten Massenspektroskopie Studien, von ebenfalls *de novo* generierten hPrP(90-230) Fibrillen, die zuvor einem H/D-Austausch unterzogen wurden, eine ähnliche β -Falblattregion, die die Aminosäurereste 168-223 einschließt, zeigen (Abbildung 8) [71].

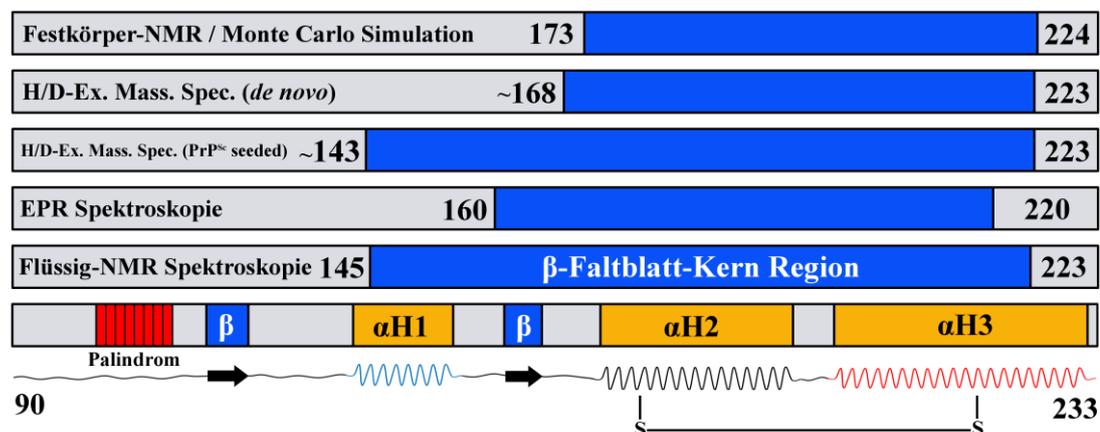


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Domänen des PrP.

Die amyloiden Fibrillen wurden mit Hilfe von Massenspektroskopie [71], EPR Spektroskopie [70], Flüssig-NMR [72], als auch mit Festkörper-NMR [73, 74] untersucht. Das zelluläre Prion Protein ist mit seinen Domänen der nativen Faltung dargestellt [18].

Die erste indirekte und hochauflösende NMR Strukturanalyse von amyloiden PrP Fibrillen, wurden von Schwalbe und Mitarbeitern durchgeführt [72]. Sie untersuchten die Fibrillenbildung von hPrP(90-230) und hPrP(166-230) unter denaturierenden Bedingungen mittels Lösungs-NMR-Spektroskopie. In den von ihnen durchgeführten ^1H - ^{15}N -HSQC Spektren beobachteten sie das Verschwinden der Signale im Bereich der Aminosäurereste 145-223, die Region die den Helices A und C im nativen Zustand entsprechen (Abbildung 8). Der N-terminale Bereich zwischen den Aminosäureresten 90-126 bleibt flexibel. Des Weiteren konnten sie zeigen dass der Bereich der Aminosäurereste 90-166 für die Fibrillenbildung notwendig ist. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die palindromische Sequenz für die Rekrutierung neuer PrP^{Sc} Moleküle und die Aggregation eine tragende Rolle spielt [51, 75]. Tycko

und Mitarbeiter publizierten die ersten Studien die an volllängen SHaPrP(23-231), *de novo* generierter Fibrillen mittels Festkörper-NMR durchgeführt wurden [73, 74]. In diesen Studien konnten sie über die intermolekularen Dipol-Kopplungen den Abstand zwischen zwei ^{13}C Atomen, von selektiv markierten Carbonyl-Kohlenstoffen, messen und fanden heraus, dass die β -Faltblätter parallel und gleichsinnig verlaufen müssen [73]. In ihrer zweiten Studie war es ihnen zwar nicht möglich aus den ^{13}C - ^{13}C und ^{13}C - ^{15}N Korrelationsspektren spezifische Aminosäurereste zuzuordnen, jedoch konnten sie mittels des Monte Carlo/Simuliertes Annealing Algorithmus den β -Faltblatt-Kern im Bereich der Aminosäurereste 173-224 ausmachen (Abbildung 8) [74].

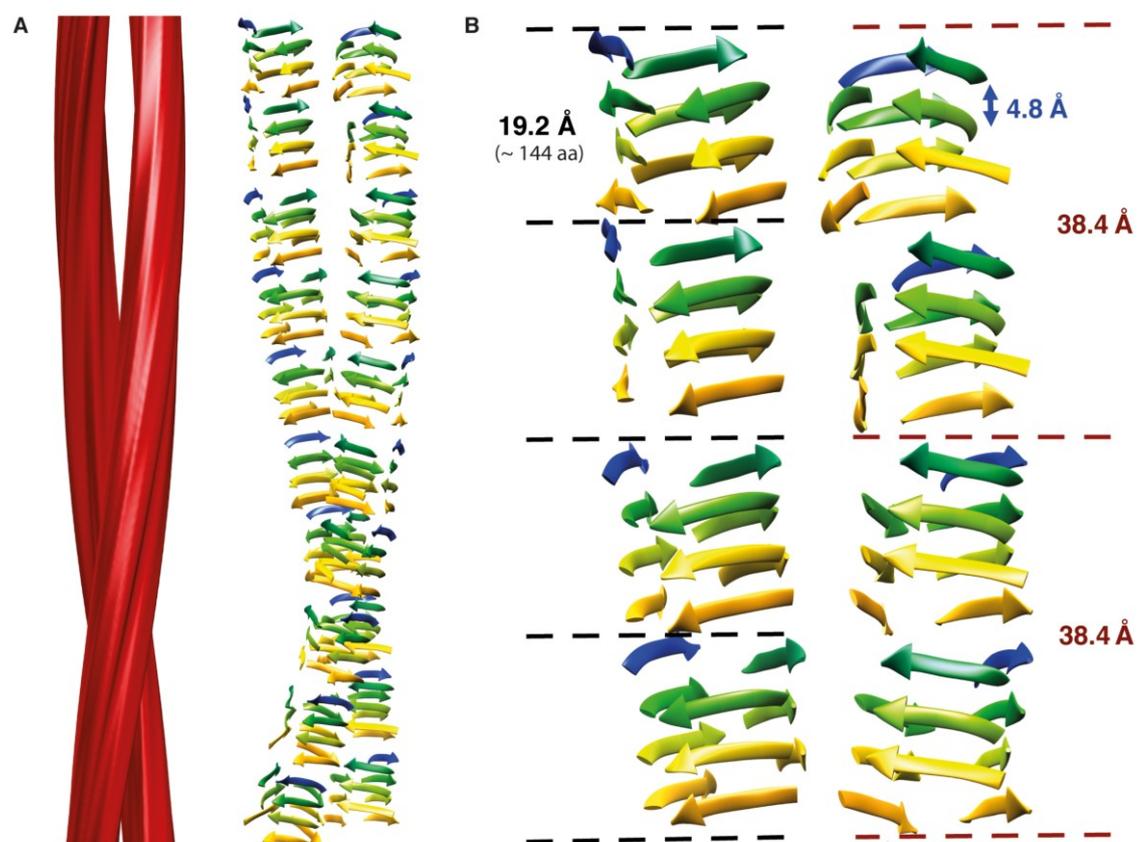


Abbildung 9: Entwurf der GPI-Anker freien PrP27-30 Fibrillen.

(A) 3D Rekonstruktion einer individuellen GPI-Anker freien PrP27-30 Fibrille mit zwei Protofilamenten (links). Entwurf einer potentiellen Konfiguration der Polypeptidketten in den PrP27-30 Monomeren (rechts). Diese Entwürfe zeigen kein atomares Model der PrP^{Sc} Struktur. (B) Großaufnahme der möglichen β -Faltblatt Stapelung der vier-Sprossen β -Solenoid Architektur. Die unterschiedlichen Farben zeigen die verschiedenen β -Solenoid Sprossen. Die charakteristischen Abstände der vier-Sprossen β -Solenoid Architektur sind angegeben. (Übersetzt aus dem Englischen nach Vázquez-Fernández et al. [76])

In einer ähnlichen Studie untersuchten Caughey und Mitarbeiter amyloide recPrP Fibrillen die durch PrP^{Sc} induziert wurden [77]. Die Autoren bestimmten den Abstand zwischen den spezifisch markierten Aminosäuren Isoleucin (Ile-1- ^{13}C), Phenylalanin (Phe-1- ^{13}C) und Leucin (Leu-1- ^{13}C) in den amyloiden recPrP Fibrillen und fanden heraus, dass neben der Helix A auch die Cystein flankierten Helix B und C eine parallel

gleichgesinnt orientierte Architektur übernehmen. Die Autoren beobachteten intermolekulare Abstände von ~ 0.5 nm zwischen den vier Isoleucine (182, 184, 203 und 205) sowie 0.5-0.6 nm zwischen den drei Phenylalaninen (140, 174 und 197). Sie schlussfolgerten, dass alle Isoleucine und zwei der drei Phenylalanine eine gleichgesinnte parallele β -Faltblatt Struktur übernahmen. Es konnte jedoch nicht gezeigt werden, in wie weit PrP^{Sc} induzierte amyloide recPrP Fibrillen die Struktur und Infektiösität von, aus Gehirnmaterial gewonnen, PrP^{Sc} Fibrillen übernehmen. Wille und Mitarbeiter publizierten eine Studie von GPI-Anker freien PrP27-30 welches sie mit Elektronenkryomikroskopie untersuchten [76]. Die 3D Rekonstruktion aus den Daten der Elektronenkryomikroskopie der amyloiden Fibrillen zeigten, dass die Fibrillen aus zwei distinkten Protofibrillen bestehen (siehe Abbildung 9). Diese Protofibrillen bestehen aus einzelnen PrP Molekülen mit einer Höhe von $\sim 17,7$ Å, deren Faltung einer vier-Sprossen β -Solenoid Architektur entspricht. Anhand der Daten war es den Autoren nicht möglich den genauen Bereich des Amyloid-Kerns zu bestimmen.

1.10. Prionen in Hefepilzen, ein kurzer Auszug

Ogleich per Definition die Säugetier-TSEs immer tödlich verlaufen ist klar, dass nach der Entdeckung von Proteinen, die die Eigenschaften von Prionen aufweisen, die bisher bekannte Definition der Prionen erweitert werden musste; wäre die Prionen in einzelligen Organismen immer tödlich, so wären sie nie entdeckt worden. Es waren Wickner und Mitarbeiter [78], die im Jahre 1994 drei Eigenschaften zusammenfassten die der Definition für Prionen auch in der Hefe gerecht werden:

1. **Die reversible Heilbarkeit:** Die „Heilung“ eines DNA Replikons, z.B. die des mitochondrialen Genoms durch Ethidiumbromid, ist ein irreversibler Vorgang; das mitochondriale Genom wird nicht spontan wiederkehren. Die „Heilung“ von einem Prion hingegen ist reversibel, d.h. das Prion kann, mit einer sehr geringen Frequenz, *de novo* entstehen, da das Protein welches dafür verantwortlich ist, von der Zelle weiterhin synthetisiert wird.
2. **Das Auftreten der Prionen wird induziert durch die Überproduktion des Prion Proteins:** Im Gegensatz zu den DNA Replikons, die nicht *de novo* entstehen können, auch wenn die Proteine die an ihrer Replikation beteiligt sind überexprimiert werden, wird durch die Überexpression des Prion Proteins die Frequenz des Auftretens des Prion-Phänotypen erhöht. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass mit erhöhter Syntheserate des Prion Proteins die

Wahrscheinlichkeit der Konversion vom funktionellen zellulären Prion Protein zu der nicht-funktionellen Form, unabhängig vom Konversionsmechanismus, ebenfalls erhöht wird.

3. **Phänotypische Beziehung zwischen dem Prionen Zustand und Mutationen in den Genen dieses Proteins:** Der Prion Zustand einer Zelle kann nur dann aufrecht gehalten werden, wenn das betreffende Gen auch in dieser Zelle expremiert wird. So ahmen Prion-Phänotypen den Verlust der Prion Protein Funktion nach, die auch durch Mutationen oder Deletionen des betreffenden Prion-Gens entstehen würden. Der Grund dafür ist, dass das nicht-funktionelle Prion das funktionelle Prion Protein aufbraucht. Wenn der Phänotyp eines nicht-funktionellen Prionen durch eine Mutation oder Gen-Deletion entstanden ist, so kann der Wildtyp nicht mehr wiederhergestellt werden, ohne dass die entsprechende DNA wieder in die Zelle eingeführt wird. Ist der nicht-funktionelle Phänotyp jedoch durch das Prion verursacht, so kann der Wildtyp durch die Zugabe eines entsprechenden „Heilmittels“, z.B. die millimolare Zugabe des Denaturants Guanidiniumchlorid (GdnHCl), wiederhergestellt werden.

Zu den Prionen Proteinen des Hefepilzes *S.cerevisiae* zählen unter anderem die durch die Gene [URE3] und [PSI] kodierten Ure2p und Sup35p [78] (Abbildung 10).

Das Sup35p ist ein Protein mit 685 Aminosäureresten, einer molekularen Masse von 76.551 kDa [79] und kann in drei Regionen unterteilt werden: Die N-terminale Region (N) umfasst die Aminosäurereste 1-122 und ist reich an Glutamin (Q), Asparagin (N) und Glycin (G) (~47 % der Aminosäurereste) [80, 81]. Die N-Region ist unwesentlich für die native Funktion des Sup35p, also die Translationstermination, jedoch spielt sie eine große Rolle in der Prionen Propagation und wird deshalb auch als Prion-Domäne (PrD) bezeichnet [82]. Die Mittelregion (M), die von Aminosäurerest 123 bis 253 reicht, hat eventuell eine strukturelle Funktion, und C-terminal befindet sich die funktionelle Domäne für die Translationsterminationsaktivität [80, 83]. Hefezellen die das funktionelle und lösliche Sup35p besitzen, werden als [psi⁻] Zellen bezeichnet, wo hingegen die Hefezellen mit dem nicht-funktionellen und unlöslichen Sup35p, als [PSI⁺] Zellen bezeichnet werden [84, 85]. In seiner Funktion als Translationsterminator bewirkt das Sup35p, welches auch als eRF3 (eucaryotic release factor 3, engl., Eukaryotischer Freigabefaktor 3) bezeichnet wird, dass das Stopp-Codon Ocker (UAA) erkannt wird und das entstandene Polypeptid freigesetzt wird [86, 87]. Im Prion-

Zustand jedoch verliert das Sup35p seine Funktion, was dazu führt dass das Ocker Stopp-Codon mit erhöhter Frequenz von Ribosomen überlesen wird und neue Phänotypen, die unter Umständen besser an ihre Umgebung angepasst sind, entstehen können [12, 88].

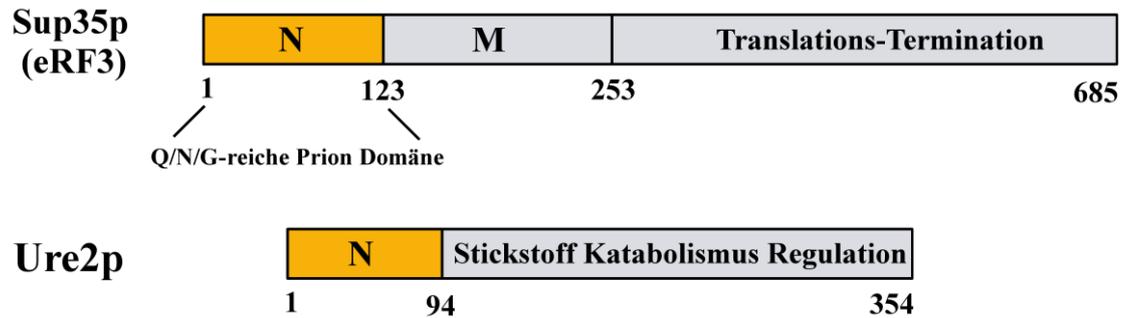
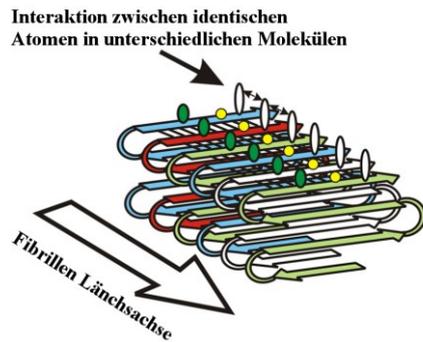


Abbildung 10: Vergleich der charakteristischen Regionen von Sup35p und Ure2p.
Die Prion Domänen sind in gelb gefasst, die funktionellen Regionen in grau.

Das Ure2p ist ein Protein mit 354 Aminosäureresten und einer molekularen Masse von 40.271 kDa und kann in zwei Regionen unterteilt werden: Die N-terminale Region umfasst die Aminosäurereste 1 bis 94 und ist reich an Glutamin (Q), Asparagin (N), Serin (S) und Threonin (T) (~62 % der Aminosäurereste) [89]. Die N-Region wird, wie auch bei Sup35p, für die Prionen Propagation benötigt und wird deshalb auch hier als Prion-Domäne (PrD) bezeichnet [90]. Der C-Terminus umfasst Aminosäurereste 94 bis 354 und ist für die native Funktion des Proteins verantwortlich [89, 90]. Die eigentliche Funktion des Ure2p ist bisher noch nicht ganz aufgeklärt worden, jedoch wird vermutet dass das Ure2p eine Rolle in der Regulation des Stickstoffkatabolismus spielt [91-93]. Demnach soll das funktionelle Ure2p mit dem GATA-Transkriptionsfaktor Gln3p interagieren und damit den Eintritt des Gln3p in den Zellkern verhindern. Wird der Eintritt von Gln3p in den Zellkern verhindert, so kann unter anderem der Allantoat-Transporter Dal5p nicht exprimiert werden, was dazu führt dass keine komplexen Stickstoffquellen aus der Umgebung aufgenommen werden können [94].

1.11. Struktur der amyloiden Fibrillen von Ure2p und Sup35p: Eine gleichsinnige parallele Architektur

CD-Spektroskopie, FTIR, Röntgen Faserbeugung und Festkörper-NMR-Spektroskopie mit all diesen Methoden konnte gezeigt werden, dass alle Amyloide der Prion-Domänen von Sup35p und Ure2p eine gleichsinnig parallele β -Faltblatt Struktur aufweisen [95-101]. Typische Abstände für gleichsinnig parallel angeordnete β -Faltblätter betragen ~



0,5 nm zwischen denselben Atomen in unterschiedlichen Molekülen. Der Abstand zwischen den einzelnen Molekülen von Ure2p und Sup35p amyloiden Fibrillen wurde mittels Festkörper-NMR bestimmt und zeigte jeweils einen einheitlichen Abstand von 0,5 nm [97, 102-104]. Masse per Länge Analysen zeigten auch, dass sich immer nur ein Molekül pro $\sim 0,5$ nm befinden muss [105-107]. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass es sich tatsächlich um eine gleichsinnig parallel angeordnete β -Faltblatt Architektur handeln muss, im ggs. zu der bekannten β -Helix Architektur des Het-s [108-110].

2. Zielsetzung

Seit der Entdeckung des Prion Proteins ist der Mechanismus, der verantwortlich für die Konversion des PrP^C zu der TSE assoziierten Isoform PrP^{Sc}, und die resultierende Faltung des PrP^{Sc}, das Ziel vieler wissenschaftlicher Untersuchungen. Diese Arbeit hat das Ziel einen Teil zu der Aufklärung der Faltung bzw. Struktur des PrP^{Sc} beizutragen.

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Etablierung eines modifizierten autokatalytischen Konversionssystems, abgeleitet von der in Müller et al. [111] beschriebenen Methode. Ausschlaggebend war der Umstand, dass die *in vitro* generierten amyloiden Fibrillen makromorphologisch den stäbchenähnlichen sog. „Prion-Rods“ entsprachen, und nicht den faserigen PrP^{Sc} Fibrillen. Vorversuche zeigten, dass die Verwendung der eben erwähnten Konversionsmethode, ohne die Verwendung von GdnHCl im Konversionspuffer, zu dem gewünschten makromorphologischen faserigen Erscheinungsbild führt. Die so *in vitro* generierten Fibrillen sollen in dieser Arbeit mit biophysikalischen Methoden, und insbesondere mit der Festkörper-NMR-Spektroskopie, charakterisiert werden. Um diese auch zugänglich für die NMR-Spektroskopie zu machen, wurden die Proben unter Verwendung von vollständig ¹³C/¹⁵N-markierten Monomeren hergestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Kapitel 3.1 dargestellt.

Abgrenzend zu diesen Untersuchungen war das zweite Ziel dieser Arbeit die Fortführung der bisherigen Studien unter Verwendung des autokatalytischen Konversionssystems mit GdnHCl (Kapitel 4.2). Wie wir bereits zeigen konnten, ist es möglich, unter diesen Bedingungen *in vitro* amyloide PrP Fibrillen zu generieren die durch PrP^{Sc}-Keime induziert wurden. Aufbauend auf diesen Ansatz, wurden in dieser Arbeit mehrere Generationen von ursprünglich PrP^{Sc} induzierten amyloiden ovrecPrP Fibrillen, durch das sog. „Repeated Seeding“ hergestellt. Im Fokus der strukturellen Charakterisierung stehen dabei die 1. und 3. Generation dieser Keim-induzierten amyloiden ovrecPrP Fibrillen.

Für die Untersuchung der 1. Generation wurden Proben unter der Verwendung von vollständig ¹³C/¹⁵N-markierte Monomeren als Ausgangsmaterial hergestellt. Für die 3. Generation wurden ebenfalls Proben hergestellt, die vollständig ¹³C/¹⁵N markiert wurden. Des Weiteren sollte in dieser Arbeit ein neues Expressionssystem etabliert werden, durch welches es möglich ist große Mengen an deuteriertem PrP zu exprimieren. Die Deuterierung von Proteinen ermöglicht zum einen die Detektion von ¹H ohne Hilfe von technisch aufwendigen Mitteln (hier: MAS Probenköpfe mit

Drehfrequenzen von >100 kHz). Zum anderen ist keine Protonen Entkopplung mehr nötig. Das hat folglich den Vorteil, dass keine Gefahr mehr besteht die Probe durch Verwendung einer zu hohen RF-Leistung zu zerstören. Aber auch eine homogene Linienverbreiterung, die durch ineffektive Entkopplung verursacht wird, kann somit ausgeschlossen werden. Die deuterierten und vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Monomere wurden verwendet um eine weitere Probe der 3. Generation herzustellen.

Zusätzlich zu dem bisher verwendeten ovrecPrP Konstrukt, welches den $\text{M}_{112}\text{A}_{136}\text{R}_{154}\text{Q}_{171}$ Polymorphismus trägt, wurde in dieser Arbeit auch das ovrecPrP Konstrukt mit dem $\text{T}_{112}\text{A}_{136}\text{R}_{154}\text{Q}_{171}$ Polymorphismus verwendet. Für einen ersten Vergleich zwischen diesen beiden Polymorphen wurden Fibrillen der 3. Generation hergestellt, die als Ausgangsmaterial ausschließlich den ovrecPrP(MARQ) bzw. den ovrecPrP(TARQ) Polymorphen erhielten, oder aber eine 1 zu 1 Mischung aus beiden monomeren ovrecPrP Polymorphen. Die verwendeten Keime aus der 2. Generation, sowie alle anderen verwendeten Keime der unterschiedlichen Generationen und auch der PrP^{Sc} -Fällung, bestehen aus Monomeren mit dem $\text{M}_{112}\text{A}_{136}\text{R}_{154}\text{Q}_{171}$ Polymorphen. Der Vergleich der beiden Polymorphen bzw. der drei hergestellten Proben die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, beschränkt sich ausschließlich auf den biophysikalischen/-chemischen Vergleich mit dem Proteinase K Assay.

Zusammengefasst sind die Ziele dieser Arbeit:

1. Biophysikalische- und Festkörper-NMR-Charakterisierung der *de novo* generierten ovrecPrP Fibrillen, die durch das GdnHCl-freie autokatalytische Konversionssystem hergestellt wurden.
2. Festkörper-NMR-Charakterisierung der 1. Generation PrP^{Sc} -induzierter ovrecPrP Fibrillen
3. Etablierung eines Expressionssystems zur Herstellung $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -markierten ovrecPrP
4. Festkörper-NMR-Charakterisierung der 3. Generation PrP^{Sc} -induzierter ovrecPrP Fibrillen
5. Erster biophysikalische/-chemische Vergleich zwischen den beiden Polymorphen $\text{M}_{112}\text{A}_{136}\text{R}_{154}\text{Q}_{171}$ und $\text{T}_{112}\text{A}_{136}\text{R}_{154}\text{Q}_{171}$ mit dem Proteinase K Assay

3. Material und Methoden

3.1. Das rekombinante volllängen Schafs Prion Protein ovrecPrP(25-233)

Bei dem Prion Protein, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, handelt es sich um das volllängen (25-233) Schafs (*Ovis Aries*) Prion Protein, mit den Variationen M₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ und T₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ (Abbildung 11). Das Prion Protein wurde rekombinant, ohne das Signalpeptid (1-24) in *E.coli* hergestellt.

ovrecPrPMARQ (25-233)				
25 KKRPKPGGGW	35 NTGGSRYPGQ	45 GSPGGNRYPP	55 QGGGGWGQPH	65 GGGWWGPHGG
75 GWGQPHGGGW	85 GQPHGGGGWG	95 QGGSHSQWNK	105 PSKPKNMKH (112)	115 VAGAAAAGAV
125 VGGLGGYMLG	135 SAMSRLIHF (136)	145 GNDYEDRYR (154)	155 ENMYRPNQV	165 YYRPVDQYSN (171)
175 QNNFVHDCVN	185 ITVKQHTVTT	195 TTKGENFTET	205 DIKIMERVVE	215 QMCITQYQRE
225 233 SQAYYQRGA				
ovrecPrPTARQ (25-233)				
25 KKRPKPGGGW	35 NTGGSRYPGQ	45 GSPGGNRYPP	55 QGGGGWGQPH	65 GGGWWGPHGG
75 GWGQPHGGGW	85 GQPHGGGGWG	95 QGGSHSQWNK	105 PSKPKNTKH (112)	115 VAGAAAAGAV
125 VGGLGGYMLG	135 SAMSRLIHF (136)	145 GNDYEDRYR (154)	155 ENMYRPNQV	165 YYRPVDQYSN (171)
175 QNNFVHDCVN	185 ITVKQHTVTT	195 TTKGENFTET	205 DIKIMERVVE	215 QMCITQYQRE
225 233 SQAYYQRGA				

Abbildung 11: Aminosäuresequenz der beiden Variationen des ovrecPrP(25-233)

3.2. Wolframphosphorsäure Natriumsalz (NaPTA)-Fällung von PrP^{Sc}

Fibrillen aus Hirnhomogenat eines an Scrapie erkrankten Schafs mit der Variation MARQ

Die NaPTA-Fällung ist eine universelle Methode um größere polare Proteinkomplexe, wie z.B. amyloide Fibrillen, auszufällen. Jedoch ist diese Methode nicht Fibrillen spezifisch, so dass weitere große polare Proteinkomplexe ebenfalls gefällt werden. Auch der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht verstanden [112]. In dieser Arbeit wurde die NaPTA-Fällung verwendet um PrP^{Sc} Fibrillen aus dem Hirnhomogenate von

Scrapie kranken Schafen, mit der Variation M₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁, zu fällen. Für die NaPTA-Fällung wurden Lösungen verwendet, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind.

Tabelle 2: Puffer und Lösungen für die NaPTA-Fällung

NaPTA	Sarkosyl	PBS (1x)
- PTA	- 20 % Natrium N-	- 137 mM NaCl
- pH 7,4	Lauryl-sarkosinat	- 2,7 mM KCl
- steril filtriert		- 4,3 mM Na ₂ HPO ₄
		- 1,4 mM KH ₂ PO ₄
		- pH 7,3

- 1. Separation der Zellreste:** Zu den 700 µl gefrorenem Hirnhomogenat (in 2 % Sarkosyl) werden 90 µl 20 %ige Sarkosyllösung hinzugegeben (entspricht eine Endkonzentration von 4 % Sarkosyl) und 15 min bei 37 °C und 650 rpm aufgetaut. Die Zell- und Gewebereste werden bei 5.000 g für 2 min abzentrifugiert. 600 µl des Überstandes werden weiter verwendet, weitere 100 µl werden für eine spätere SDS-PAGE aufbewahrt.
- 2. 1st NaPTA-Fällung:** Die 600 µl des Überstandes aus 1. werden mit 600 µl 4 %ige NaPTA-Lösung vermischt (ergibt eine Endkonzentration von 2 % NaPTA und 2 % Sarkosyl) und für 1 h bei 37 °C und 650 rpm inkubiert. Die ausfallenden amyloiden Fibrillen werden für 30 min bei 14.000 g und 20 °C abzentrifugiert. 100 µl des Überstandes werden für eine spätere SDS-PAGE abgenommen, der restliche Überstand wird verworfen.
- 3. 2nd NaPTA-Fällung:** Auf das Pellet aus Schritt 2. werden 100 µl 4 %ige Sarkosyl in PBS (entspricht dann 0,8 x PBS) und 100 µl NaPTA hinzugegeben (ergibt eine Endkonzentration von jeweils 2 % NaPTA und Sarkosyl). Das Pellet wird durch Schütteln resuspendiert und anschließend für 1 h bei 37 °C und 650 rpm inkubiert. Anschließend werden die ausfallenden amyloiden Fibrillen für 30 min bei 14.000 g und 20 °C abzentrifugiert. 100 µl des Überstandes werden für eine spätere SDS-PAGE abgenommen, der restliche Überstand wird verworfen.
- 4. Waschschrift:** Das Pellet aus Schritt 3. wird in 200 µl 0,2 %ige Sarkosyl Lösung (in PBS) vollständig resuspendiert und anschließend für 1 h bei 37 °C und 650 rpm inkubiert. Die ausfallenden amyloiden Fibrillen werden anschließend für 30 min bei 14.000 g und 20 °C abzentrifugiert. 100 µl des

Überstandes werden für eine spätere SDS-PAGE abgenommen, der restliche Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in dem gewünschten Puffer resuspendiert oder bis zu weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.3. Fibrillogenese

Mit der Fibrillogenese wurden im Zuge dieser Arbeit amyloide Fibrillen *in vitro* generiert. Es wurde zwei Verfahren angewandt, zum einen eine *de novo* Generierung der amyloiden Fibrillen und zum anderen eine Induktion von Fibrillenwachstum durch die Zugabe von „Seeds“, also amyloide Fibrillen die entweder aus Hirnhomogenat aufgereinigt wurden oder Fibrillen aus einer vorangegangenen Fibrillogenese. Die Bedingungen für die Fibrillogenese sind ähnlich zum „Autokatalytischen Konversionsessay“ (siehe Kapitel 1.8) [60].

In dieser Arbeit wurden zwei Pufferbedingungen verwendet die sich ausschließlich durch die Verwendung von Guanidiniumchlorid (GdnHCl) unterscheiden. Für die *de novo* Generierung von amyloiden PrP Fibrillen wurde der Puffer ohne GdnHCl verwendet. Für die PrP^{Sc} induzierte Fibrillogenese wurde in dieser Arbeit der Puffer mit GdnHCl verwendet. Zur Induktion dieser Fibrillogenese wurden PrP^{Sc} Fibrillen verwendet die aus Hirnhomogenat gewonnen wurden (siehe Kapitel 3.2) oder durch das sog. „Repeated Seeding“, mit dessen Hilfe es möglich sein soll, aus einem ursprünglich polymorphen Zustand eine einzelne intrinsische Struktur selektiv zu amplifizieren [113]. Die so gewonnenen Fibrillen, die als Keim eingesetzt wurden, wurden vor der Verwendung für 15 s bei ~150 W mit Ultraschall behandelt um eine höhere Anzahl von einzelnen Fibrillen bzw. Keimen zu erhalten.

Tabelle 3: Zusammensetzungen der einzelnen GDH-Reduktionsansätze.

	<i>De Novo</i> -GdnHCl UL [µl]	1. Gen UL [µl]	3. Gen UL [µl]	3. Gen MARQ TL [µl]	3. Gen TARQ TL [µl]
ovrecPrP	810 (13,6 mg/ml)	740 (13,5 mg/ml)	715 (14 mg/ml)	465 (43 mg/ml)	215 (93 mg/ml)
GSH (0,4 mM)	220 (8 mM)	200 (8 mM)	200 (8 mM)	200 (8 mM)	200 (8 mM)
Urea (6 M)	3300 (8 M)	3000 (8 M)	2400 (10 M)	3200 (7,5 M)	3200 (7,5 M)
H₂O	70	60	685	135	385
Σ	4400	4000	4000	4000	4000

NL: nicht isotoopenmarkiert, UL: einheitlich ¹³C/¹⁵N isotoopenmarkiert, TL: einheitlich ²H/¹³C/¹⁵N isotoopenmarkiert, MARQ: ovrecPrP mit der Variation M₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁, TARQ: ovrecPrP mit der Variation M₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁T₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁

Vor jeder Fibrillogenese wurden die ovrecPrP Monomere mit Glutathion (GSH) behandelt um intermolekulare Disulfidbrücken zu reduzieren. Die verwendeten Lösungen und Reduktionsansätze sind in Tabelle 3 aufgeführt, die Inkubationszeit betrug 6 h bei 20 °C.

Anschließend wurden die Fibrillogenese Bedingungen wie in Tabelle 4 beschrieben angesetzt. Abhängig vom Volumen wurden entweder 1 ml oder 15 ml Reaktionsgefäße verwendet. Die Fibrillogenese wurde bei 37 °C und 650 rpm mehrere Tage inkubiert. Die Fibrillenbildung wurde mit Hilfe von ThT-Assays (siehe Kapitel 3.4) überwacht. Aus jedem Ansatz wurde nach Abschluss der Fibrillogenese 1/10 des Gesamtvolumens für biochemische/biophysikalische Untersuchungen und für die Induktion weiterer Generationen, abgenommen.

Tabelle 4: Zusammensetzungen der einzelnen Fibrillisationsansätze.

	<i>De Novo</i> -GdnHCl UL [μ l]	1. Gen UL [μ l]	3. Gen UL [μ l]	3. Gen MARQ TL [μ l]	3. Gen TARQ TL [μ l]
GSH-Ansatz	4400	4000	4000	4000	4000
GdnHCl (1 M)	0	1250 (8 M)	1250 (8 M)	2000 (5 M)	2000 (5 M)
NaCl (167 mM)	1100 (1,67 M)	1000 (1,67 M)	1000 (1,67 M)	1000 (1,67 M)	1000 (1,67 M)
NaOAc (20 mM pH 5,0)	1100 (200 mM)	1000 (200 mM)	1000 (200 mM)	1000 (200 mM)	1000 (200 mM)
Seed	0	180	25 (~30 μ g)	20 (~25 μ g)	20 (~25 μ g)
ThT (5 μM)	550 (100 μ M)	0	0	0	0
H₂O	3850	2570	2725	1980	1980
Σ	11000	1000	10000	10000	10000

NL: nicht isotopenmarkiert, UL: einheitlich $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ isotopenmarkiert, TL: einheitlich $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ isotopenmarkiert, MARQ: ovrecPrP mit der Variation $\text{M}_{112}\text{A}_{136}\text{R}_{154}\text{Q}_{171}$, TARQ: ovrecPrP mit der Variation $\text{M}_{112}\text{A}_{136}\text{R}_{154}\text{Q}_{171}$ $\text{T}_{112}\text{A}_{136}\text{R}_{154}\text{Q}_{171}$

Anschließend an die Fibrillogenese wurden die generierten amyloiden Fibrillen mittels Differentialzentrifugation (siehe Kapitel 3.7) 1 h bei 100.00 g vom Überstand getrennt und mit H₂O gewaschen und, abermals 1 h bei 100.000 g, zentrifugiert. Der Waschschrift wurde dreimal wiederholt. Die amyloiden Fibrillen der 3. Generation, die dreifach isotopenmarkiert sind und für Festkörper-NMR Untersuchungen hergestellt wurden, wurden vor der Differentialzentrifugation in zwei Teile aufgeteilt. Ein Teil wurde mit 100 % D₂O, der andere mit 70 % D₂O gewaschen.

3.4. ThT-Assay

Für die Überwachung des Wachstums von amyloiden Fibrillen wurde ein spezifischer Farbstoff, Thioflavin T (ThT), verwendet. In Anwesenheit von gestapelten β -Faltblättern bindet ThT an diese Strukturen. Dadurch wird das π -Elektronensystem des Doppelringes stabilisiert, was dazu führt, dass das ursprüngliche Fluoreszenzemissionsmaximum von 430 nm eine Rotverschiebung erfährt und nun sein Fluoreszenzemissionsmaximum bei 482 nm hat. Weiterhin steigt die Emissionsintensität beträchtlich im Vergleich zu dem nicht gebundenen Zustand. Dieser Effekt entsteht nur wenn ThT an gestapelten β -Faltblattstrukturen bindet, wie sie in amyloiden Fibrillen zu finden sind und nicht bei Monomeren oder amorphen Aggregaten [114].

Für jede Messung wurde ein Endvolumen von 150 μ l verwendet, bestehend aus 15 μ l aus dem jeweiligen Fibrillogenese-Ansatz und 135 μ l Fibrillogenesebuffer mit 5 μ M ThT. Die Proben wurden in 96-Wellplatten (Nunclon 96 U Bottom Schwarz Polypropylen, *Thermo Scientific*) mit einem Infinite 200Pro Fluorescence Reader (*Tecan*) vermessen. Die Messparameter sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

Tabelle 5: Verwendet ThT-Messparameter

Wellenlängen Scan Typ	Fluoreszenz von oben
Exzitationswellenlänge	442 nm
Emissionswellenlänge Start	475 nm
Emissionswellenlänge Ende	555 nm
Emissionswellenlänge Schrittgröße	2 nm
Exzitationsbandbreite	5 nm
Emissionsbandbreite	20 nm
Gain	90
Anzahl der Blitze	10
Integrationszeit	40 μ s
z-Position	18.300 μ m
Schütteln vor Messung	60 s, linear Amplitude 1 mm
Temperatur	37 °C

3.5. SDS-Ultraschall Assay

Generell ist die Bestimmung der sekundären Struktur von amyloiden Fibrillen mittels CD-Spektroskopie aufgrund der Unlöslichkeit von aggregierten Fibrillen unmöglich. Zum einen sedimentieren die Fibrillen und zum anderen ist durch ihre dichte Packung die Lichttransmission sehr gering. Um die sekundäre Strukturmessung mit CD-Spektroskopie möglich zu machen, ist es nötig die Fibrillen in Anwesenheit von SDS zu sonifizieren [115].

Für die CD-Messung (siehe Kapitel 3.6) werden die amyloiden Fibrillen mit einer Endkonzentration von 1 mg/ml in 200 µl Natriumacetat 20 mM, pH 5,0 und 0,2 % SDS resuspendiert. Anschließend werden sie 1 min bei ~210 W sonifiziert. Für die CD-Messung wird die Lösung in eine CD-Küvette überführt.

3.6. Zirkulärer Dichroismus (CD) Spektroskopie

Eine spezielle Eigenschaft von nahezu allen Proteinen und speziell der Aminosäuren ist ihre Asymmetrie oder Chiralität. Chirale Strukturen können durch ihre Interaktion mit polarisiertem Licht charakterisiert werden. Diese optische Eigenschaft kann entweder über den Unterschied in der Refraktion der optischen Rotationsdispersion (ORD) oder durch die unterschiedliche Absorption von links- und rechtspolarisiertem Licht (zirkulärer Dichroismus, CD) gemessen werden. Die CD-Spektroskopie wird hauptsächlich verwendet um die sekundären Strukturelemente zu charakterisieren, da hier die einzelnen sekundären Strukturelemente (α -Helix, β -Faltblatt, unstrukturierte Bereiche) besser differenziert werden können. Das liegt daran, dass die Wellenlängen der einzelnen sekundären Strukturelemente in der ORD stärker überlappen als bei der CD-Spektroskopie.

Die CD-Spektroskopie wird in dem spektralen Bereich durchgeführt in dem die designierte Probe absorbiert. Im Falle von Proteinen liegt die spektrale Bandbreite zwischen 180 nm und 240 nm. Dies ist der Bereich in dem das Proteinerückgrat absorbiert. Der zirkuläre Dichroismus ist definiert durch:

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (1)$$

A_L = Absorption von links-polarisiertem Licht

A_R = Absorption von rechts-polarisiertem Licht

Die unterschiedliche Absorption von links- und rechts-polarisiertem Licht eines Makromoleküls wird verursacht durch die unterschiedlichen Extinktionskoeffizienten ϵ_L und ϵ_R :

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R \quad (2)$$

Der Zusammenhang zwischen ΔA und $\Delta\epsilon$ ist durch das Lambert-Beer'sche Gesetz gegeben:

$$\Delta A = \Delta\epsilon * c * d \quad (3)$$

c = Konzentration (g/cm^3)

d = Schichtdicke (cm)

Elliptisch polarisiertes Licht ist das Ergebnis der Differenz zwischen der Absorption von links- und rechts-polarisiertem Licht. Historisch wird immer noch die spezifische Elliptizität θ verwendet, die proportional zu $\Delta\epsilon$ ist:

$$\theta = 2,303 * \Delta\epsilon \frac{180^\circ}{4\pi} \quad (4)$$

Die sekundären Strukturelemente von Proteinen, α -Helices, β -Faltblätter und ungeordnete Region unterscheiden sich nicht nur in ihrer Elliptizität in der CD-Spektroskopie, sondern auch in der Form der jeweiligen Elliptizität in Abhängigkeit der Wellenlänge. So haben CD-Spektren der einzelnen Strukturelemente folgende Merkmale [116]:

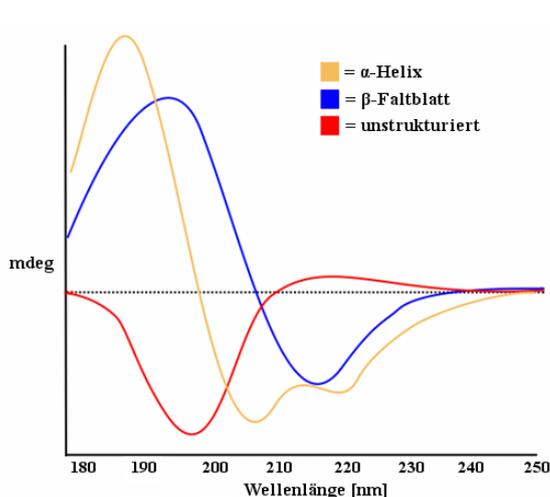


Abbildung 12: Typische CD-Spektren der drei häufigsten Struktur Motive [1]

α -Helix: Maximum bei 190 nm, 0-Durchgang bei 198 nm und Minima bei 208 nm und 222 nm

β -Faltblatt: Maximum bei 198 nm, 0-Durchgang bei 205 nm und Minimum bei 215 nm

Unstrukturiert: Maximum bei 218 nm, 0-Durchgang bei 209 nm und Minimum bei 198 nm

Alle CD-Messungen wurden an einem J-815 CD-Spektrometer (Jasco)

durchgeführt. Die verwendeten Messparameter sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Verwendete CD-Messparameter

Temperatur	20 °C
Wellenlängenbereich	180 – 260 nm
Auflösung	1 nm
Reaktionszeit	1 s
Scan Geschwindigkeit	50 nm/min
Bandbreite	1 nm
Anzahl der Wiederholungen	10
N₂-Durchflussrate	~5 l/min
CD-Sensitivität	Standard
Küvette	1.0 mm

3.7. Differentialzentrifugation

Um die lösliche von der unlöslichen Fraktion zu trennen wurde in dieser Arbeit die Differentialzentrifugation verwendet. Dies beinhaltet die Zentrifugation von Proben bei 100.000 g für 1 h bei 4 °C. Für die Zentrifugation wurden spezielle widerstandsfähige 1,5 ml Reaktionsgefäße (*Beckman*) verwendet. Die Zentrifugation wurde mit einer Optima TL Ultrazentrifuge (*Beckman*) und den dafür vorgesehenen Rotor TLA45 durchgeführt.

3.8. Proteinase K (PK) Verdau

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene PK Verdau-Methoden verwendet. Zum einen wurde das Protokoll nach Zhang et al. [59] verwendet, zum anderen das Protokoll nach Bocharova et al. [117].

Protokoll nach Zhang et al.: Für diesen PK-Verdau wurde ein Gesamtvolumen von 20 µl verwendet. Es wurden PK Konzentrationen von 0, 10, 50, 250 und 500 ng/µl verwendet. Die Protein Konzentration betrug in jedem Ansatz 1 µg. Die Lösung sowie die Verdünnungen der PK wurden in PBS (1x) durchgeführt. Als Zusatz für die Aktivität der PK wurden 2 mM MgCl₂ hinzugegeben. Zuerst wurden alle Ansätze ohne die Zugabe von PK vorbereitet um eine gleichmäßige Inkubationszeit zu gewährleisten. Anschließend wurden die verschiedenen PK Mengen hinzugegeben und bei 37 °C und 650 rpm für 30 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde Ladepuffer auf jeden Ansatz gegeben und bei 95 °C für 10 min inkubiert, um die Reaktion zu stoppen und vollständig zu denaturieren (für die SDS-PAGE). Anschließend wurden die SDS-PAGE und Western Blot nach Kapitel 3.9 und 3.10 durchgeführt.

Protokoll nach Bocharova et al.: Für diesen Ansatz wurden 6 µl der Fibrillenlösung (~0,2 mg/ml) verwendet. Es wurden 7,6 µl H₂O, 1,6 µl 1 M Tris-HCl Puffer pH 7,5 und 0,8 µl 1 % Triton X-100 (in H₂O) hinzugegeben. Zuletzt wurden 1 µl PK (20 µg/ml) hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 µl AEBSF (1mM) gestoppt, Ladepuffer hinzugegeben, bei 95 °C für 10 min inkubiert und schließlich eine SDS-PAGE durchgeführt.

3.9. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)

Die Trennung von Proteinen unter nativen Bedingungen ist im Prinzip sehr schwer, da jedes Protein unterschiedlich geladen und strukturiert ist. Deshalb wird die Natriumdodecylsulfat (SDS) Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) als biochemische Methode unter denaturierenden Bedingungen verwendet. Zur Denaturierung werden die Protein in SDS und β-Mercaptoethanol bei 95 °C inkubiert. Zur Ladungsdeckung bzw. um eine gleichmäßige Ladungsverteilung über das Protein zu erhalten wird SDS verwendet. Etwa 1,4 g SDS binden an 1 g Protein und überdecken die Ladung des Proteins, so dass das Protein gleichmäßig negativ geladen ist [118].

Die SDS-PAGEs die in dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden unter denaturierenden Bedingungen mit einem diskontinuierlichen Gel-System nach Laemmli durchgeführt [118]. Das Gel besteht aus einem 5 %-igem Sammelgel und einem 12 %-igem Trenngel (siehe Tabelle 7). Die Elektrophorese wurde mit einem SE600 (*Hoefler Scientific Instruments*) Gelapparatsystem mit 125 V Durchflussstrom für ca. 1.5 h durchgeführt.

Tabelle 7: Zusammensetzungen der Puffer und Gele für die SDS-PAGE.

Ladepuffer (4x)	5 % Sammelgel (2x),	12 % Trenngel (2x)	Laufpuffer Laemmli (10x, 1 l)
2,4 ml 1 M Tris pH 6,8	7,1 ml H ₂ O	8 ml H ₂ O	30 g Tris Base
0,8 g SDS	3,75 ml Tris/HCl pH 6,8	3,75 ml Tris/HCl pH 8,8	144.0 g Glycin
4 ml 100% Glycerol	2,5 ml Acrylamid	1,5 ml Acrylamid	10 g SDS
0.01% Bromophenolblau	150 µl SDS (10%)	150 µl SDS (10%)	
1 ml β-Mercaptoethanol	20 µl TEMED	20 µl TEMED	
2.8 ml H ₂ O	1,5 ml APS (1%)	1,5 ml APS (1%)	

3.10. Western Blot

Um die Proteine für die Antikörperfärbung zugänglich zu machen, müssen diese vom Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Dies wird durch das Western Blotting ermöglicht. Der in dieser Arbeit verwendete Aufbau des Western Blots besteht aus dem Polyacrylamidgel welches auf eine durch Ethanol aktivierte Nitrozellulosemembran platziert wird. Auf und unter die Kombination aus Polyacrylamidgel und Nitrozellulosemembran werden drei Whatman-Paper platziert, die zuvor mit Laemmli Puffer ohne SDS vollgesogen wurden. Dieses „Sandwich“ wurde dann in einer Semi-Dry Blotapparatur SV20-SDB (*Sigma-Aldrich*) platziert. Die Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nitrozellulosemembran wurden schließlich für 45 min bei einer Stromstärke von ~0,3 A durchgeführt.

3.11. Antikörperfärbung

Die Antikörperfärbung wird mit Protein-spezifischen Antikörpern durchgeführt. In dieser Arbeit wurde der Antikörper SAF32, welcher im Bereich der Aminosäurereste 57-88 bindet [119, 120] verwendet als sekundärer Antikörper wurde das Goat Anti-Mouse (Gam) mit konjugierter

TBS-Tween pH 7.6

50 mM Tris

150 mM NaCl

0.05% Tween 20

Horseradish Peroxidase (HRP) verwendet. Nach dem Western Blot wird die Membran mit einer 5 %igen Milchlösung (Milchpulver in TBS-T) für 1 h inkubiert. Danach wird die Membran 3x für 5 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wird die Membran mit dem 1. Antikörper (1:10.000 Verdünnung) für mindestens 1 h oder über Nacht inkubiert. Die Membran wird anschließend 4x für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Dann wird die Membran mit dem 2. Antikörper GamPO (1:10.000 Verdünnung) für 45 min inkubiert und anschließend 4x für 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Membran ist nun bereit für die Chemilumineszenz Detektion.

3.12. Chemilumineszenz Detektion

Das „Enhanced Chemiluminescence“ (ECL) System ist eine nicht radioaktive Detektionsmethode für Proteine. Die konjugierte Peroxidase des sekundären Antikörpers katalysiert die Oxidation des Luminol durch Wasserstoffperoxid. Diese Reaktion produziert einen angeregten Carbonyltriplett Zustand, welcher beim Rückgang in den Singulettzustand Licht der Wellenlänge 428 nm emittiert. Das ECL System erlaubt die Detektion von wenigen Pikogramm Mengen eines Proteins.

In dieser Arbeit wurde das SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (*Thermo Scientific*) verwendet. Die Membran wurde in einer 1:1 Mischung der Substratlösungen für 1 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran in eine Plastikhülle verschweißt um die Kontamination mit Prionen zu verhindern. Die Detektion wurde entweder mit einem Röntgenfilm und der Entwicklung an einem Curix 60 (*AGFA*), oder aber mit Gel Dokumentationsanlage Gel Doc™ XR (*BioRad*) durchgeführt.

3.13. Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF)

Die „Total internal reflection Fluorescence“- (TIRF)-Mikroskopie beruht auf dem Prinzip, das Licht in einem Winkel unterhalb des Objektträgers eingestrahlt wird in welchem es zu einer sog. „Totalreflexion“ kommt [121]. Bei diesem Vorgang bildet sich sein evaneszentes elektromagnetisches Feld mit gleicher Wellenlänge wie das des eingestrahltten Lichtes. Im Vergleich zu der Fluoreszenz- oder Konfokalmikroskopie bietet die TIRF-Mikroskopie eine verbesserte Auflösung, da die Eindringtiefe des evaneszenten elektromagnetischen Feldes nur 100-200 nm (im vgl.: über 500 nm bei Fluoreszenz- und Konfokalmikroskopie) beträgt. Ein weiterer Vorteil der geringeren Eindringtiefe ist das deutlich verbesserte Signal-zu-Rausch-Verhältnis.

In dieser Arbeit wurden die *de novo* generierten amyloiden ovrecPrP Fibrillen (siehe Kapitel 3.3) durch Trocknung auf einem gereinigten Objektträger (25 x 6 x 0,17 mm; Menzel Gläser; *Thermo Fisher Scientific*; San Jose; USA) fixiert. Die Fibrillen wurden anschließend durch Auftropfen von 10 µl einer 5 µM Lösung gefärbt und mit einem TIRF-Mikroskop analysiert (Leica AM TIRF MC; HCX PL APO 100 x 1,47 Öl-Immersionsobjektiv; *Leica microsystems*; Wetzlar; Deutschland). Alle Bilder wurden bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm über eine EM-CCD Kamera (Model 9100-2, *Hamamatsu City*, Japan) aufgenommen. Die Expositionszeit betrug 1 Sekunde. Die aufgenommenen Bilder wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ prozessiert (Wayne Rasband, *National Institutes of Health*, Bethesda, USA). Die Durchführung der TIRF-mikroskopischen Untersuchungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Lars Lüers und Michael Würdehoff aus dem Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

3.14. Rasterkraft Mikroskopie (AFM)

Die Rasterkraft Mikroskopie (AFM) ist eine hochauflösende Methode zur Darstellung von Oberflächen und Molekülen im Nanometer Bereich. Damit ist diese Methode etwa 1.000-fach besser in der Auflösung als gängige optische Systeme. Die effektive Auflösung ist nur durch die Größe der Spitze des Cantilevers begrenzt, im ggs. zu optischen Systemen, bei denen die Wellenlänge die Beschränkung der Auflösung vorgibt.

Für die AFM Messungen in dieser Arbeit wurden 30 µl einer 1:100 verdünnten Probe auf einem Mica Plättchen für 30 min adsorbiert. Anschließend wurden die Mica-Oberflächen 20x mit 20 µl H₂O gewaschen. Alle Messungen wurden an einem NanoWizard II AFM (*JPK Instruments AG*) mit einer *Olympus* Silikonspitze auf einem Siliconcantilever (OMCL-160TS-R3) und einer typischen Spitzengröße von 7 nm durchgeführt. Als Scanmethode wurde der Tapping Mode verwendet um mögliche Kontaminationen des AFM zu verhindern. Die Messungen wurden von Stefanie Schiefer durchgeführt.

Für die Bild Prozessierung und Auswertung wurde die Software Gwyddion [122] verwendet alle Bilder wurden in Bezug auf die Neigung der Oberfläche und Servoreichweite korrigiert. Jede Linienebene wurde in Bezug auf Streifen, Kratzer und Rauschen aufgrund der Micaoberfläche korrigiert. Fibrillenhöhe und -breite wurden rechtwinklig zur Fibrillenachse gemessen. Höhe und Breite wurden in Bezug auf die Spitzengröße und Form korrigiert.

3.15. Biologische Sicherheit

Alle Arbeiten mit Prionenmaterial wurden in einem S3** Labor durchgeführt. Arbeiten mit tierischem Material, z.B. Hirnmaterial von Scrapie kranken Schafen sowie Prionenmaterial welches in Kontakt mit tierischem Material gekommen ist, wurden in Sterilbänke durchgeführt die die Auflagen der BSL-3 erfüllen. Für die Festkörper-NMR-Spektroskopie wurden



Abbildung 13: Rotor-Innenkörper für 3,2 mm Agilent Rotoren.

alle Proben in speziell für diese Anwendung hergestellten Rotor-Innenkörper gefüllt und mittels Schraubverschluss versiegelt. Nach Versiegelung wurden die Außenseiten

der Innenkörper mit 2 M Natronlauge (NaOH) für mindestens 1 h dekontaminiert und anschließend mit H₂O gewaschen. Trotz der geringen Fähigkeit zur Wasseraufnahme von 0,2-0,4 Prozent (*DuPont*) kann über einen längeren Zeitraum Wasser austreten, was zur Austrocknung der Proben führen kann. Auch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Wasser über die Verschraubung austreten kann. Die Rotor-Innenkörper (Abbildung 13) bestehen aus deformierbaren und unzerbrechlichem Polyformaldehyd (Delrin, Abbildung 14) welches ¹³C-Signale bei 89.1 ppm und 1.0 ppm aufweist. Die Rotor-Innenkörper wurden von Esther Macziolk aus der Feinmechanik-Werkstatt der WE-Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf hergestellt.

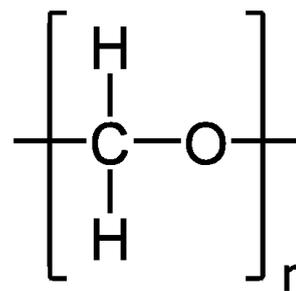


Abbildung 14: Strukturformel des Polyformaldehyds.

3.16. Festkörper Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Alle Festkörper-NMR Experimente wurden an Agilent Spektrometern mit einer ¹H Frequenz von 600 MHz (14,1 T) oder 800 MHz (18,8 T) durchgeführt. Als MAS Probenkopf wurden 3,2 mm Narrow-Bore (NB) Probenköpfe verwendet. Abhängig vom NMR Experiment wurden MAS Geschwindigkeiten von 8 kHz bis 24 kHz verwendet. In dieser Arbeit wurden 2D-¹³C-¹³C-Korrelationsexperimente wie 2D-PDSD [123], 2D-DARR [124], 2D-DREAM [125], 2D-HORROR [126] und 2D-SPC5-3 [127] durchgeführt. Des Weiteren wurden sowohl 2D- und 3D-¹³C-¹⁵N-Korrelationsexperimente, wie 2D/3D-NCACX (PDSD oder DARR), 2D/3D-NCOCX (PDSD oder DARR), als auch 2D/3D-NCACB (DREAM), 2D/3D-NCOCA (BSH-CP) [128-130] und 2D/3D-NCOCACB (BSH-CP und DREAM) [128-130] durchgeführt. Alle durchgeführten Experimente und deren Messparameter sind in den Tabellen 8-13 aufgeführt. Alle FIDs wurden mit dem Programm NMRPipe [131] prozessiert und mit CCPNmr [132] ausgewertet.

Für die Messung von potentiell infektiösen amyloiden PrP Fibrillen, wurden die Proben wie in Kapitel 3.15 in einen speziellen für diese Anwendung hergestellten Innenkörper gefüllt.

3.17. Sekundär chemische Verschiebung ($\Delta\delta$)

Anhand der chemischen Verschiebung der $C\alpha$ und $C\beta$ ist es möglich die sog. „sekundäre chemische Verschiebung“ ($\Delta\delta$) wie folgt zu berechnen:

$$\Delta\delta = \delta^{13}C\alpha - \delta^{13}C\beta \quad (5)$$

$$\delta^{13}C\alpha = {}^{13}C\alpha_{(\text{exp})} - {}^{13}C\alpha_{(\text{rc})} \text{ und } \delta^{13}C\beta = {}^{13}C\beta_{(\text{exp})} - {}^{13}C\beta_{(\text{rc})} \quad (6)$$

Die sekundäre chemische Verschiebung beschreibt in welcher sekundär strukturellen Lage sich die jeweilige Aminosäure befindet. So deutet ein negativer Wert für $\Delta\delta$ auf eine β -Faltblattstruktur, ein positiver Wert auf eine α -Helix hin. Ein Wert zwischen +1.5 und -1.5 deutet auf eine ungeordnete Region hin [133]. Aufgrund seiner ungewöhnlichen Seitenkette ist der dihedrale Winkel φ des Prolins in einem Winkel von -65° arretiert, was zu einer hohen Rigidität des Proteinrückgrats führt. Folglich sind Proline nicht in sekundären Strukturmotiven, wie α -Helices oder β -Faltblättern zu finden [134]. Ausnahmen sind Proline die an erster Stelle einer α -Helix stehen oder Proline an der Stelle Φ_{i+1} in β -Turns (Type I und II) [135].

Für die Berechnung der sekundären chemischen Verschiebungen wurden „Random Coil“ (rc)-Werte aus der Publikation von Wishart et al. verwendet [133].

Tabelle 8: Parameter der Festkörper-NMR Experimente durchgeführt an den *de novo* hergestellten Prion-Fibrillen.

	CC20	CC50	CC150	DREAM
Spectrometer (MHz)	600	600	600	600
T	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C
MAS (kHz)	11	11	11	11
Transfer 1	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP
Field (kHz)-H	56,75	56,75	56,75	62,5
Field (kHz)-X	38,6	38,6	38,6	38,6
Shape	linear	linear	linear	linear
Carrier (ppm)	99,94	99,94	99,94	77,42
Time (ms)	0,4	0,4	0,4	0,2
Transfer 2	PDSD	PDSD	PDSD	DREAM
Field (kHz)-H	-	-	-	-
Field (kHz)-C	-	-	-	10
Field (kHz)-N	-	-	-	-
Shape	-	-	-	-
Carrier (ppm)	56,75	56,75	56,75	77,42
Time (ms)	20	50	150	1,25
Transfer 3	-	-	-	-
Field (kHz)-H	-	-	-	-
Field (kHz)-C	-	-	-	-
Field (kHz)-N	-	-	-	-
Shape	-	-	-	-
Carrier (ppm)	-	-	-	-
Time (ms)	-	-	-	-
Transfer 4	-	-	-	-
Field (kHz)-H	-	-	-	-
Field (kHz)-C	-	-	-	-
Field (kHz)-N	-	-	-	-
Shape	-	-	-	-
Carrier (ppm)	-	-	-	-
Time (ms)	-	-	-	-
t1 increments	140	140	140	140
SW (kHz)	30	30	30	30
Acq Time (ms)	4,6	4,6	4,6	4,6
t2 increments	-	-	-	-
SW (kHz)	-	-	-	-
Acq Time (ms)	-	-	-	-
number of scans	560	584	416	720
SW (kHz)	37,5	37,5	37,5	40
Acq Time (ms)	12	12	12	12
Decoupling Power (kHz)	83	83	83	80
interscan delay (s)	2	2	2	2

Tabelle 9: Parameter der Festkörper-NMR Experimente durchgeführt an der ersten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen.

	PDSD 20 ms	PDSD 20 ms	PDSD 80 ms	PDSD 200ms	DARR 20 ms	DREAM	HORROR	Spc5	2D-NCaCx 50 ms	3D-NCaCx 50 ms
Spectrometer (MHz)	600	600	600	600	600	600	600	600	600	600
T	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C				
MAS (kHz)	11	9.375	11	9.375	22	22	22	8	11	11
Transfer 1	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HN-CP	HN-CP
Field (kHz)-H	53,7	52,6	53,7	52,6	63,3	64,9	63,8	57,8	46,8	46,8
Field (kHz)-X	39,9	39,9	39,9	39,9	39,9	40,4	39	40,4	30,6	30,6
Shape	linear	linear	linear	linear	linear	linear	linear	linear	linear	linear
Carrier (ppm)	80	80	80	80	79,8	57	44,1	70,7	114	114
Time (ms)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3
Transfer 2	PDSD	PDSD	PDSD	PDSD	DARR	DREAM	HORROR	SPC3-5	NC-CP	NC-CP
Field (kHz)-H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-C	-	-	-	-	-	10,4	10,2	36,1	16,8	16,8
Field (kHz)-N	-	-	-	-	-	-	-	-	26,6	26,6
Shape	-	-	-	-	-	tan du	-	-	linear	linear
Carrier (ppm)	80	80	80	80	79,8	57	44,1	70,7	54	54
Time (ms)	20	20	80	200	20	1,4	4 x 0,045	10 x 0,025	1,4	1,4
Transfer 3	-	-	-	-	-	-	-	-	PDSD	PDSD
Field (kHz)-H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shape	-	-	-	-	-	-	-	-	tan	tan
Carrier (ppm)	-	-	-	-	-	-	-	-	54	54
Time (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	50	50
Transfer 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shape	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carrier (ppm)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Time (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
t1 increments	150	210	210	210	210	120	146	140	20	8
SW (kHz)	33	33	33	33	33	18	22	36	3,6	2,4
Acq Time (ms)	4,5	6,4	6,4	6,4	6,4	6,7	6,6	3,8	5,6	3,3
t2 increments	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14
SW (kHz)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,5
Acq Time (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1
number of scans	112	192	192	272	192	304	728	736	880	1264
SW (kHz)	38	38	78	38	78	78	78	78	83	83
Acq Time (ms)	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Decoupling Power (kHz)	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83
interscan delay (s)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Fortsetzung der Parameter der Festkörper-NMR Experimente durchgeführt an der ersten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen.

	2D-NCaCx 80 ms	3D-NCaCx 80 ms	2D-NCOCx 50 ms	2D-NCOCx 50 ms	3D-NCOCx 50 ms	PDS D 20 ms	PDS D 20 ms	PDS D 200ms	PDS D 200ms
Spectrometer (MHz)	600	600	600	600	600	800	800	800	800
T	0 °C								
MAS (kHz)	14	14	11	14	14	11	12.5	11	12.5
Transfer 1	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP
Field (kHz)-H	52	52	43	64,5	64,5	46,9	46,9	46,9	46,9
Field (kHz)-X	34	34	30,6	37	37	24,6	25,6	24,6	25,6
Shape	linear								
Carrier (ppm)	119,96	119,96	119,96	119,96	119,96	79,7	79,7	79,7	79,7
Time (ms)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,2	0,2
Transfer 2	NC-CP	NC-CP	NC-CP	NC-CP	NC-CP	PDS D	PDS D	PDS D	PDS D
Field (kHz)-H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-C	3,5	3,5	17,1	3,5	3,5	-	-	-	-
Field (kHz)-N	9,4	9,4	26,6	9,9	9,9	-	-	-	-
Shape	linear	linear	linear	linear	linear	-	-	-	-
Carrier (ppm)	54,42	54,42	54,32	54,62	54,62	79,7	79,7	79,7	79,7
Time (ms)	4,98	4,98	1,1	4,8	4,8	20	20	20	20
Transfer 3	DARR	DARR	PDS D	DARR	DARR	-	-	-	-
Field (kHz)-H	21	21	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shape	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carrier (ppm)	54,42	54,42	54,32	173,78	173,78	-	-	-	-
Time (ms)	80	80	50	50	50	-	-	-	-
Transfer 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-H	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Shape	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Carrier (ppm)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Time (ms)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
t1 increments	12	10	12	12	9	260	260	260	260
SW (kHz)	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	42	42	42	42
Acq Time (ms)	5	4,2	5	5	3,8	6,2	6,2	6,2	6,2
t2 increments	-	15	-	-	15	-	-	-	-
SW (kHz)	-	4,5	-	-	4,5	-	-	-	-
Acq Time (ms)	-	3,3	-	-	3,3	-	-	-	-
number of scans	3072	736	11840	2720	832	112	112	192	192
SW (kHz)	78	78	83	78	78	104	104	104	104
Acq Time (ms)	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Decoupling Power (kHz)	83	83	83	83	83	80	80	80	80
interscan delay (s)	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Fortsetzung der Parameter der Festkörper-NMR Experimente durchgeführt an der ersten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen.

	2D-NCaCx 80 ms	3D-NCaCx 80 ms	2D-NCaCb	3D-NCaCb
Spectrometer (MHz)	800	800	800	800
T	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C
MAS (kHz)	18	18	21.5	21.5
Transfer 1	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP
Field (kHz)-H	63,8	63,8	62,5	62,5
Field (kHz)-X	43	43	39,3	39,3
Shape	linear	linear	linear	linear
Carrier (ppm)	120,21	120,21	120,21	120,21
Time (ms)	0,5	0,5	0,5	0,5
Transfer 2	NC-CP	NC-CP	NC-CP	NC-CP
Field (kHz)-H	-	-	-	-
Field (kHz)-C	5,7	5,7	6,1	6,1
Field (kHz)-N	13,5	13,5	16	16
Shape	linear	linear	linear	linear
Carrier (ppm)	55,4	55,4	55,2	55,2
Time (ms)	4,7	4,7	2,7	2,7
Transfer 3	DARR	DARR	DREAM	DREAM
Field (kHz)-H	17,2	17,2	-	-
Field (kHz)-C	-	-	10,5	10,5
Field (kHz)-N	-	-	-	-
Shape	-	-	tan du	tan du
Carrier (ppm)	55,4	55,4	55,2	55,2
Time (ms)	80	80	1,8	1,8
Transfer 4	-	-	-	-
Field (kHz)-H	-	-	-	-
Field (kHz)-C	-	-	-	-
Field (kHz)-N	-	-	-	-
Shape	-	-	-	-
Carrier (ppm)	-	-	-	-
Time (ms)	-	-	-	-
t1 increments	26	18	15	12
SW (kHz)	3,2	3,2	3,2	3,2
Acq Time (ms)	8,1	5,6	4,7	5
t2 increments	-	26	-	20
SW (kHz)	-	6,2	-	6
Acq Time (ms)	-	4,2	-	3,3
number of scans	4664	504	4400	1016
SW (kHz)	104	104	104	104
Acq Time (ms)	12	12	12	12
Decoupling Power (kHz)	83	83	80	80
interscan delay (s)	2	2	2	2

Tabelle 10: Parameter der Festkörper-NMR Experimente durchgeführt an der dritten Generation vollständig markierter und Keim-induzierter Prion-Fibrillen.

	PDSD 20 ms	DARR 80 ms	PDSD 200 ms	DREAM	SPC5-3	2D-NCaCx 80 ms	3D-NCaCx 80 ms
Spectrometer (MHz)	600	600	600	600	600	600	600
T	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C
MAS (kHz)	11	14	11	22	8	11	11
Transfer 1	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HC-CP	HN-CP	HN-CP
Field (kHz)-H	55,2	61,9	55,2	64,4	56,2	47,5	47,5
Field (kHz)-X	39,3	45,5	39,3	40,4	45,5	32,5	32,5
Shape	linear	linear	linear	linear	linear	linear	linear
Carrier (ppm)	80	74,6	80	57	74,8	119,52	119,52
Time (ms)	0,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4
Transfer 2	PDSD	DARR	PDSD	DREAM	SPC3-5	NC-CP	NC-CP
Field (kHz)-H	-	15,6	-	-	-	-	-
Field (kHz)-C	-	-	-	10,2	40	19,8	19,8
Field (kHz)-N	-	-	-	-	-	29,9	29,9
Shape	-	-	-	tan du	-	linear	linear
Carrier (ppm)	80	74,6	80	57	74,8	54,4	54,4
Time (ms)	20	80	200	1,4	10 x 0,025	1,5	1,5
Transfer 3	-	-	-	-	-	PDSD	PDSD
Field (kHz)-H	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-C	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-N	-	-	-	-	-	-	-
Shape	-	-	-	-	-	-	-
Carrier (ppm)	-	-	-	-	-	54,4	54,4
Time (ms)	-	-	-	-	-	80	80
Transfer 4	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-H	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-C	-	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-N	-	-	-	-	-	-	-
Shape	-	-	-	-	-	-	-
Carrier (ppm)	-	-	-	-	-	-	-
Time (ms)	-	-	-	-	-	-	-
t1 increments	210	216	216	120	240	18	8
SW (kHz)	33	36	36	18	40	3,6	2,4
Acq Time (ms)	6,4	6	6	6,7	6	5	3,3
t2 increments	-	-	-	-	-	-	14
SW (kHz)	-	-	-	-	-	-	4,5
Acq Time (ms)	-	-	-	-	-	-	3,1
number of scans	160	176	256	496	320	2000	1072
SW (kHz)	38	78	78	78	78	78	78
Acq Time (ms)	12	12	12	12	12	12	12
Decoupling Power (kHz)	83	80	83	80	80	77	77
interscan delay (s)	2	2	2	2	2	2	2

Tabelle 11: Parameter der Festkörper-NMR Experimente durchgeführt an der dritten Generation dreifach markierte (mit 30:70 % H/D-Verhältnis gewaschen) und Keim-induzierter Prion-Fibrillen.

	DREAM	2D-NcaCB	3D-NCACB	3D-NCACB	2D-NcoCA	3D-NCOCA
Spectrometer (MHz)	600	600	600	600	600	600
T	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C
MAS (kHz)	24	24	24	24	24	24
Transfer 1	HC-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP
Field (kHz)-H	68,9	60,1	60,1	60,1	60,1	60,1
Field (kHz)-X	45,5	34,7	34,7	34,7	34,7	34,7
Shape	linear	linear	linear	linear	linear	linear
Carrier (ppm)	58	119,94	119,94	119,94	119,94	119,94
Time (ms)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Transfer 2	DREAM	NC-CP	NC-CP	NC-CP	NC-CP	NC-CP
Field (kHz)-H	-					
Field (kHz)-C	12	6	6	6	6	6
Field (kHz)-N	-	17,1	17,1	17,1	17,1	17,1
Shape	tan du	linear	linear	linear	linear	linear
Carrier (ppm)	58	54,42	54,42	54,42	173,67	173,67
Time (ms)	2,7	4,75	4,75	4,75	4,75	4,75
Transfer 3	-	DREAM	DREAM	DREAM	BSH-CP	BSH-CP
Field (kHz)-H	-					
Field (kHz)-C	-	12	12	12	20	20
Field (kHz)-N	-					
Shape	-	tan du	tan du	tan du	linear ud	linear ud
Carrier (ppm)	-	54,42	54,42	54,42	54,42	54,42
Time (ms)	-	1,7	1,7	1,7	3	3
Transfer 4	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-H	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-C	-	-	-	-	-	-
Field (kHz)-N	-	-	-	-	-	-
Shape	-	-	-	-	-	-
Carrier (ppm)	-	-	-	-	-	-
Time (ms)	-	-	-	-	-	-
t1 increments	290	25	11	16	25	21
SW (kHz)	30	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Acq Time (ms)	9,7	10	4,4	6,4	10	8,4
t2 increments	-	-	19	25	-	14
SW (kHz)	-	-	4,5	4,5	-	2,5
Acq Time (ms)	-	-	4,2	5,6	-	5,6
number of scans	192	3888	96	128	1520	176
SW (kHz)	78	78	78	78	78	78
Acq Time (ms)	25	12	12	12	12	12
Decoupling Power (kHz)						
interscan delay (s)	2	2	2	2	2	2

Tabelle 12: Parameter der Festkörper-NMR Experimente durchgeführt an der dritten Generation dreifach markierte (mit 100 % D₂O gewaschen) und Keim-induzierter Prion-Fibrillen.

spectrometer (MHz)	2D-NcaCB	3D-NCACB	3D-NCOCA	2D-NcocaCB	3D-NCOcaCB
T	800	800	800	800	800
MAS (kHz)	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C	0 °C
Transfer 1	21,5	21,5	21,5	21,5	21,5
Field (kHz)-H	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP	HN-CP
Field (kHz)-X	60,7	60,7	60,7	60,7	60,7
Shape	38,4	38,4	38,4	38,4	38,4
Carrier (ppm)	linear	linear	linear	linear	linear
Time (ms)	117,13	117,13	117,13	117,13	117,13
Transfer 2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Field (kHz)-H	NC-CP	NC-CP	NC-CP	NC-CP	NC-CP
Field (kHz)-C					
Field (kHz)-N	5,3	5,3	5,3	5,3	5,3
Shape	14,5	14,5	14,5	14,5	14,5
Carrier (ppm)	linear	linear	linear	linear	linear
Time (ms)	55,43	55,43	175,07	175,07	175,07
Transfer 3	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Field (kHz)-H	DREAM	DREAM	BSH-CP	BSH-CP	BSH-CP
Field (kHz)-C					
Field (kHz)-N	10,3	10,3	15	15	15
Shape					
Carrier (ppm)	tan du	tan du	linear ud	linear ud	linear ud
Time (ms)	55,43	55,43	55,43	55,43	55,43
Transfer 4	1,5	1,5	4,5	4,5	4,5
Field (kHz)-H	-	-	-	DREAM	DREAM
Field (kHz)-C	-	-	-		
Field (kHz)-N	-	-	-	9,9	9,9
Shape	-	-	-		
Carrier (ppm)	-	-	-	tan du	tan du
Time (ms)	-	-	-	55,43	55,43
t1 increments	-	-	-	1,8	1,8
SW (kHz)	30	22	24	32	24
Acq Time (ms)	3,3	3,3	3,3	3,3	3,3
t2 increments	9,1	6,7	7,3	9,7	7,3
SW (kHz)	-	33	22	-	20
Acq Time (ms)	-	6	3,4	-	3,4
number of scans	-	5,5	6,4	-	5,9
SW (kHz)	1312	128	88	1520	288
Acq Time (ms)	60	60	78	78	78
Decoupling Power (kHz)	20	15	12	15	12
interscan delay (s)	2	2	2	2	2

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Charakterisierung von *de novo* generierten amyloiden ovrecPrP Fibrillen durch ein modifiziertes autokatalytisches Konversionssystem

Bisherige autokatalytische Konversionssysteme basierten auf einem Guanidinium-Urea-System (siehe Kapitel 1.8). Auch das in Kapitel 4.2 verwendete Konversionssystem basierte auf diesem Guanidinium-Urea-System. Im nachfolgendem wird ein auf diesem System aufbauendes Guanidinium-freies Urea-Konversionssystem beschrieben und die Charakterisierung der durch dieses System *de novo* generierten amyloiden ovrecPrP Fibrillen.

4.1.1. Aggregationskinetik der *de novo* Fibrillogenese des ovrecPrP im Guanidinium-freie Urea-System

Zunächst sollte die erfolgreiche Generierung von amyloiden ovrecPrP Fibrillen durch Fluoreszenzmessung des Thioflavin T (ThT) nachgewiesen werden. Wie in Kapitel 3.3 beschrieben wurde die Fibrillogenese des ovrecPrP in einem 15 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Die ovrecPrP Konzentration betrug 1 µg/µl in 20 mM NaOAc pH 5,0; 167 mM NaCl; 2,4 M Urea und 5 µM ThT. Der Ansatz wurde bei 37 °C und 650 rpm inkubiert. Für die täglich durchgeführte ThT-Messung wurden jeweils 150 µl entnommen und in eine 96-Well Mikrotiterplatte (MTP) überführt. Die Messungen der

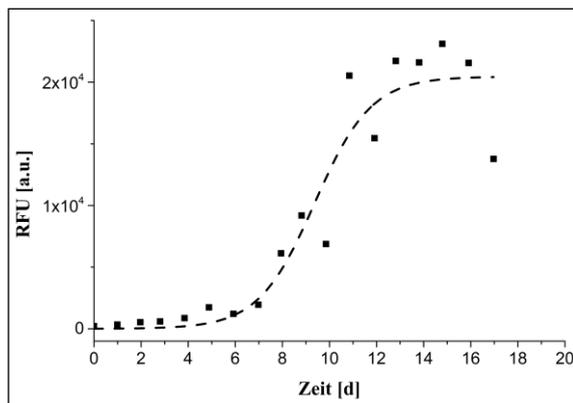


Abbildung 15: Verlauf der Fibrillogenese der *de novo* generierten ovrecPrP Fibrillen.

Die *de novo* Fibrillogenese des ovrecPrP wurde mit Hilfe der ThT-spezifischen Fluoreszenz untersucht. Die Intensität der Fluoreszenz ist das Integral über die gemessenen Wellenlängen und wurde in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Die Fibrillogenese wurde mit dem modifizierten GdnHCl-freiem autokatalytischen Konversionssystem durchgeführt. Die gestrichelte Linie zeigt den Fit der Wachstumskurve.

relativen Fluoreszenzwerte wurden wie in Kapitel 3.4 beschrieben durchgeführt. Anschließend wurden die 150 µl wieder zurück in das 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Parallel wurden Messungen desselben Ansatzes ohne ovrecPrP durchgeführt und diese Messwerte dann zur Subtraktion des Hintergrundrauschens verwendet. Der relative Fluoreszenzwert (RFU) entspricht dem Integral über der gemessenen Spektralweite.

Abbildung 15 zeigt die Aggregationskinetik des

ovrecPrP(MARQ) die mit einer sigmoidal verlaufenden Wachstumsfunktion gefittet wurde:

$$y = \frac{a}{1 + e^{-k(x-x_c)}} \quad (7)$$

Die Aggregationskinetik zeigt einen sigmoidalen Verlauf bestehend aus einer Lag-Phase von 6 Tagen, einem folgenden exponentiellem Anstieg und einer Plateau-Phase die nach 12 Tagen erreicht wurde. Die Fluoreszenzerhöhung zeigt einen Anstieg um ca. das 100-fache im Zuge der Fibrillenbildung.

4.1.2. Sekundärstrukturanalyse der amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen

Die Sekundärstrukturanteile der *de novo* generierten amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen wurden durch CD-Spektroskopie bestimmt. Aufgrund der Unlöslichkeit und dichten Packung von amyloiden Fibrillen, ist es per se nicht möglich, diese mit UV/VIS-Methoden, die auf Transmission basieren, zu untersuchen. Aus früheren Arbeiten mit amyloiden ovrecPrP Fibrillen ist bekannt, dass die CD-Messung erst möglich wird, sobald die mit SDS versetzten amyloiden Fibrillen sonifiziert und somit suspendiert wurden. Vor der spektroskopischen Messung der amyloiden

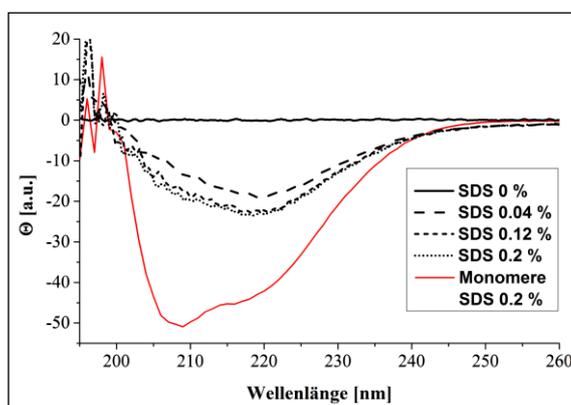


Abbildung 16: CD-Messung der amyloiden ovrecPrP Fibrillen in Abhängigkeit der SDS-Konzentration.

Die CD-Spektren wurden nach Ultraschall Behandlung (~150 W) von ~1 µg/µl Fibrillen bzw. Monomere in Anwesenheit von SDS aufgenommen. Schwarz: Fibrillen in Anwesenheit von SDS in den Konzentrationen 0 %, 0,04 %, 0,12 % und 0,2 %. Rot: Monomere in Anwesenheit von 0,2 % SDS

ovrecPrP(MARQ) Fibrillen in 20 mM NaOAc pH 5,0 wurden die amyloiden Fibrillen dementsprechend unter vorherigem Zusatz von SDS in Konzentrationen zwischen 0 % und 0,2 %, 1 min bei 150 W sonifiziert (siehe Kapitel 3.5). Die Konzentration der

amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen in der Suspension betrug ~1 µg/µl. Die CD-Messungen wurden wie in Kapitel 3.6 beschrieben über einen Wellenlängenbereich von 190-260 nm bei

20 °C durchgeführt. Zum Vergleich wurden ovrecPrP(MARQ) Monomere unter identischen Bedingungen gemessen.

Die Ergebnisse der CD-Messungen der amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen in Abhängigkeit der SDS-Konzentration sind in Abbildung 16 dargestellt. Ohne den Zusatz von SDS vor der Sonifizierung zeigte das CD-Spektrum keine auswertbaren Amplituden auf. Durch den Zusatz von SDS in Konzentrationen zwischen 0,04 % und 0,2 % vor der Sonifizierung, zeigten die CD-Spektren auswertbare Amplituden mit einem einzelnen Minimum bei ~218 nm und einem Null-Durchgang bei ~200 nm. Im Vergleich zu den CD-Referenzspektren (Abbildung 12) deuten die hier gezeigten Spektren auf eine β -Faltblatt-dominierte Sekundärstruktur mit α -helikalen und unstrukturierten Anteilen hin. Mit zunehmender SDS-Konzentration änderte sich der Verlauf der CD-Spektren nicht, die Amplitude wurde geringfügig intensiver durch die Erhöhung der SDS-Konzentration von 0,04 % auf 0,12 %. Im Vergleich zu den Fibrillen zeigen die Monomere in einer SDS Konzentration von 0,2 %, mit zwei Minima bei ~209 nm und ~219 nm und einem Null-Durchgang bei ~199 nm, ein Spektrum welches auf eine Faltung deutet, die überwiegend α -helikale Motive und

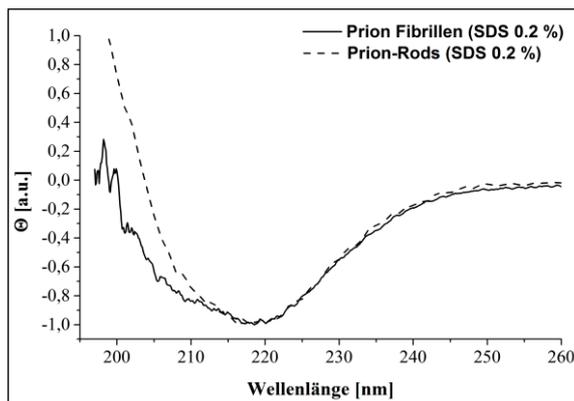


Abbildung 17: Vergleich der CD-Spektren von Prion-Fibrillen und Prion-Rods.

Die CD-Spektren wurden nach Ultraschall Behandlung (~150 W) von ~1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Fibrillen in Anwesenheit von SDS aufgenommen. Durchgezogene Linie: Prion-Fibrillen in Anwesenheit von 0,2 % SDS. Gestrichelte Linie: Prion-Rods in Anwesenheit von 0,2 % SDS

einen geringen Anteil von ungeordneten Strukturen bzw. β -Faltblättern beinhaltet.

In Abbildung 17 sind die CD-Spektren der Prion-Fibrillen und der Prion-Rods vergleichend dargestellt. Die CD-Spektren wurden unter identischen Bedingungen wie die Prion-Fibrillen gemessen (NaOAc Puffer pH 5,0, SDS 0,2 %).

Da sich die Intensitäten der beiden CD-Spektren unterscheiden, wurden die Daten beider Spektren für eine bessere Vergleichbarkeit

normalisiert. Der Verlauf des CD-Spektrum der Prion-Rods beginnt identisch zu dem der Prion-Fibrillen, bis hin zum Minimum bei ~218 nm. Im weiteren Verlauf unterscheidet sich das CD-Spektrum der Prion-Rods durch einen Null-Durchgang bei ~204 nm, im Vergleich zu ~200 nm der Prion-Fibrillen. Bei beiden ist eine Auswertung des Maximums nicht möglich, da bei beiden Messungen das Rauschen ab ca. 197 nm zu groß wurde.

Eine weitere Auswertung der CD-Spektren der Prion-Fibrillen ist nicht möglich, da die tatsächliche Konzentration der messbaren Fibrillen nicht bestimmbar ist. Zwar ist

bekannt, wie hoch die Gesamtkonzentration der in der Probe vorhandenen Fibrillen ist (hier: $\sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$), jedoch sind nicht alle Fibrillen zugänglich für die CD-Messungen. Es wird davon ausgegangen, dass durch die Behandlung der Fibrillen mit SDS und Ultraschall, kleiner Proteinkomplexe aus den Fibrillen herausgelöst werden und durch SDS in Lösung gehalten werden können. Ein Hinweis auf einen Unterschied zwischen der tatsächlichen und messbaren Konzentration gibt auch die Signalintensität wieder. Obwohl bei den Monomeren und den Fibrillen eine sehr ähnliche Konzentration verwendet wurde, unterscheiden sich die Signalintensität um fast das zweifache. Bei den kleineren Proteinkomplexen könnte es sich um Oligomere handeln, die im Vergleich zu den β -Oligomeren, die sich unter bestimmten Umständen im Faltungsverlauf bilden können [60], aber dennoch ihre Faltung beibehalten. Ein Übergang zwischen zwei Faltungszuständen benötigt viel Energie und Zeit (vgl. Übergang von Monomeren zu β -Oligomeren oder Fibrillen [60]), was einen sofortigen Übergang zwischen zwei Faltungszuständen unwahrscheinlich macht.

4.1.3. Totalreflexionsmikroskopische (TIRF) Aufnahmen von amyloiden ovrecPrP(MARQ) Prion-Fibrillen

Die markomorphologische Struktur der *de novo* generierten amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen wurde mit Hilfe der TIRF-Mikroskopie untersucht. Die Abbildung der amyloiden Fibrillen wurde durch die Anregung des an die ovrecPrP(MARQ) Fibrillen gebundenen, für amyloide Fibrillen spezifischen, Fluoreszenzfarbstoffs ThT ermöglicht.

10 μl der in 20 mM NaOAc pH 5,0 gelösten amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen wurden auf einem gereinigten Objektträger durch Trocknung fixiert. Anschließend wurden 10 μl einer 5 μM ThT-Lösung aufgetragen. Die Aufnahmen mittels TIRF-Mikroskopie wurden mit Hilfe des Öl-Immersionsobjektivs durchgeführt. Die Bilder wurden bei einer Anregungswellenlänge von 405 nm und durch eine CCD-Kamera aufgenommen (siehe Kapitel 3.13).

In Abbildung 18 ist eine Auswahl von amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen, die durch TIRF-Mikroskopie aufgenommen wurden, dargestellt. Am häufigsten waren mehrere μm -große „klumpige“ Aggregate zu erkennen, seltener freiliegende faserige Aggregate. Die faserigen Aggregate, die teilweise bis zu 100 μm lang sein konnten, waren zum großen Teil über die gesamte Länge mit den klumpigen Aggregaten in Kontakt. In einigen Fällen waren kleine klumpige Aggregate der Ursprung mehrerer sternförmig auseinander laufenden faseriger Aggregate. In Negativkontrollen, in denen monomeres

ovrecPrP(MARQ) analysiert wurde, waren keine vergleichbaren ThT-positive Strukturen zu finden.

Aggregate die ein ThT-positives Signal in der TIRF-Mikroskopie zeigen, deuten auf amyloide Strukturen des ovrecPrP(MARQ) hin, jedoch ist die Auflösung der optischen Mikroskopie zu gering, um fibrilläre Strukturen nachzuweisen. Um einen Nachweis für fibrilläre Strukturen zu erbringen, wurden daher rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der ovrecPrP(MARQ) Aggregate durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.4).

Die hier gezeigten Aufnahmen wurden mit Hilfe von Dr. Lars Lüers und Michael Würdehoff, aus dem Institut für physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, durchgeführt.

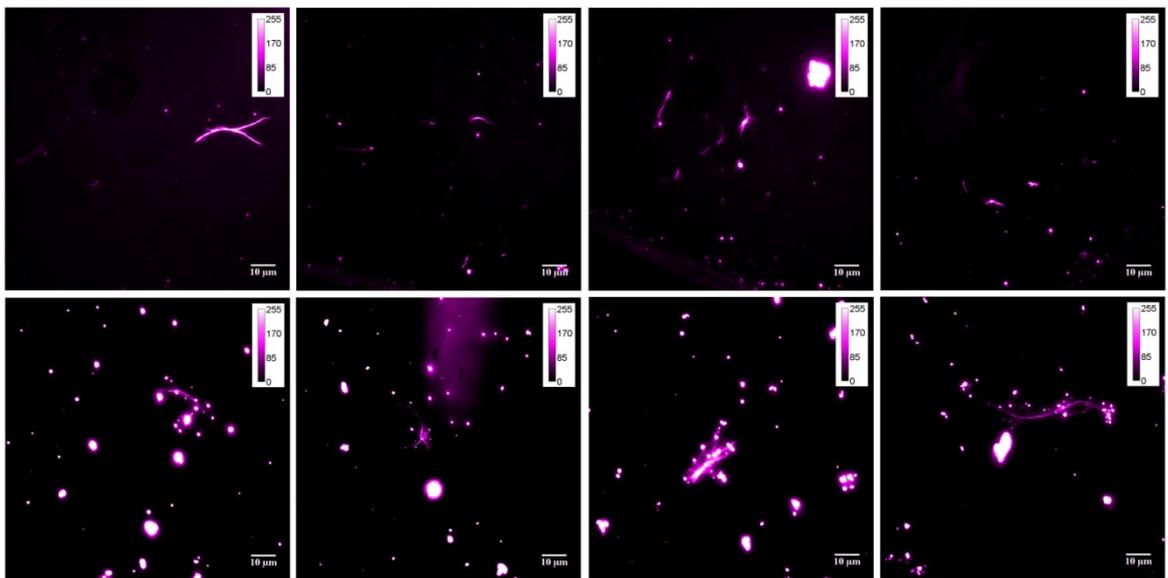


Abbildung 18: TIRF-mikroskopische Aufnahmen der ThT-gefärbten Prion-Fibrillen

Die mittels Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder zeigen die ThT gefärbten ovrecPrP Fibrillen der *de novo* Fibrillogenese. Es sind sowohl freiliegende faserige Aggregate als auch klumpige Aggregate zu sehen

4.1.4. Rasterkraftmikroskopische (AFM) Aufnahmen von amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen

Die Untersuchungen mittels AFM wurden mit Proben aus dem identischen Fibrillogeneseansatz wie die CD- und TIRF-Analyse durchgeführt, um zu analysieren, ob es sich bei den ThT-positiven Aggregaten um Fibrillen handelt.

30 µl einer 1:100 verdünnten Probe wurden auf die Mica Oberfläche aufgetragen und für eine halbe Stunde adsorbiert. Anschließend wurde die Mica Oberfläche 20x mit 20 µl ddH₂O gewaschen. Die detaillierte Aufnahmemethode ist in Kapitel 3.14 beschrieben.

Abbildung 19 zeigt eine Auswahl von AFM Aufnahmen, auf denen einzelne fibrilläre Strukturen erkennbar sind, die eine Länge von mehreren μm aufweisen. Die fibrillären Strukturen wiesen nach der Spitzen-Korrektur einen Durchmesser zwischen 11,30 nm und 15,60 nm auf. Durch die Rasterkraftmikroskopie konnten einzelne Proteinfibrillen visualisiert werden.

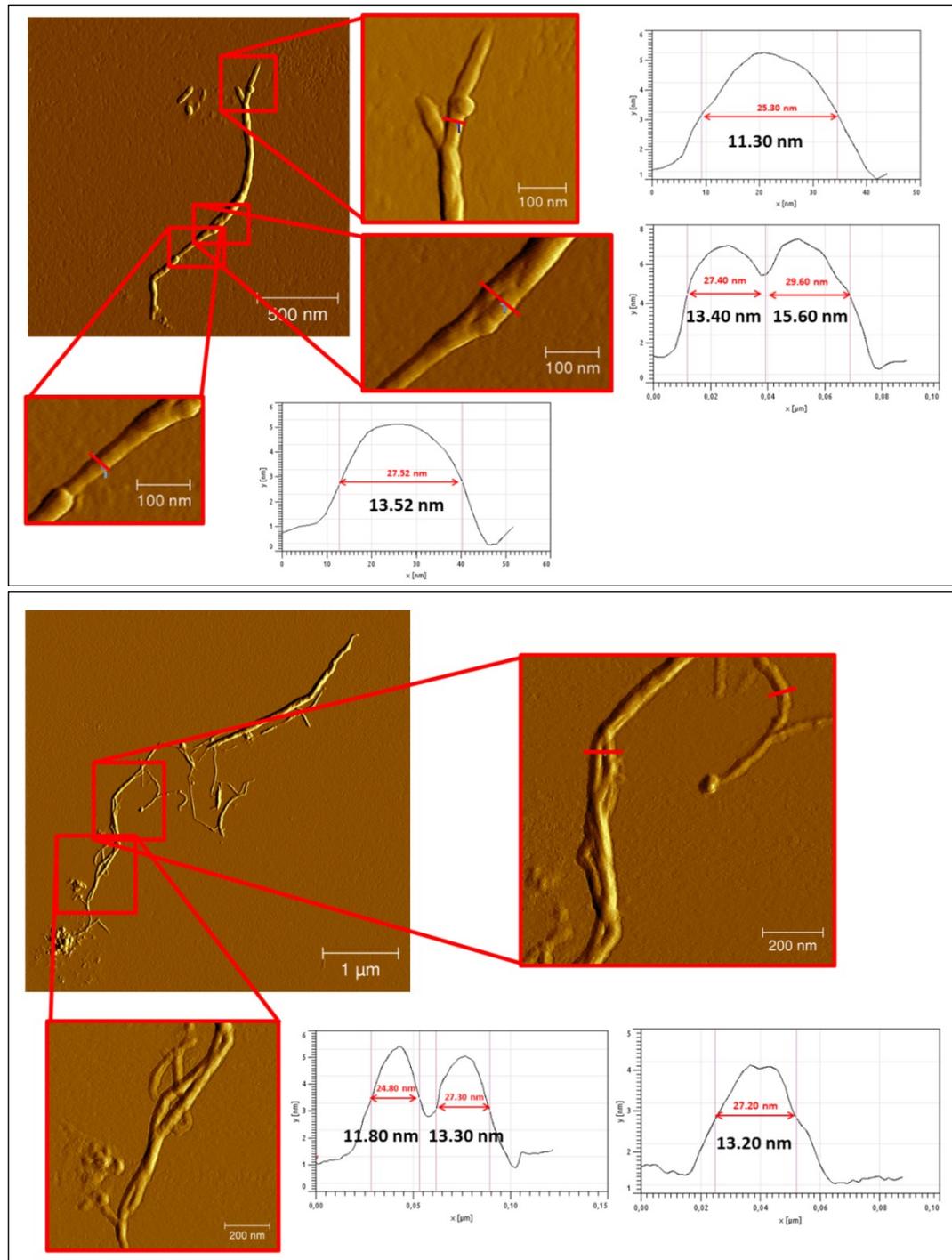


Abbildung 19: Rasterkraftmikroskopische Aufnahmen der Prion-Fibrillen.

Die AFM Aufnahmen zeigen die ovrecPrP Fibrillen der *de novo* Fibrillognese. Sowohl einzelne als auch ineinander gewundene Prion-Fibrillen von bis zu mehreren Mikrometer Länge sind erkennbar, der Durchmesser einzelner Fibrillen beträgt $\sim 11-16$ nm.

4.1.5. Proteinase K Verdau der amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen

Um zu analysieren, ob die amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen eine partielle Resistenz gegen einen Proteinase K Verdau zeigen, Proben aus dem identischen Fibrillogenseansatz wie die CD-, TIRF- und AFM-Analyse verwendet und mittels Proteinase K verdaut.

Für den Proteinase K Verdau wurden 20 μl der Proben mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 1x PBS mit 2 mM MgCl_2 und den

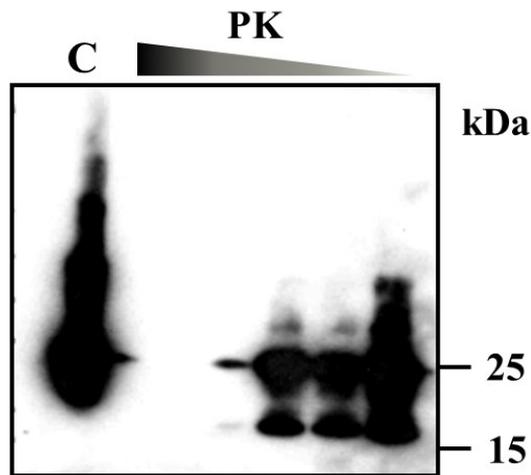


Abbildung 20: Überprüfung der partiellen PK-Resistenz der *de novo* hergestellten Prion-Fibrillen. Der Western-Blot zeigt die partiell PK-Resistenten Fragmente der Prion-Fibrillen in Abhängigkeit der PK-Konzentration. Von rechts nach links sind die Ansätze mit PK-Konzentrationen 10, 50, 100, 250 und 500 $\text{ng}/\mu\text{l}$ aufgetragen. Die linke Spur zeigt zu Kontrolle die gleiche Menge Prion-Fibrillen ohne PK Zusatz.

jeweiligen Proteinase K Konzentrationen für 30 min bei 37 °C und einer Agitation von 650 rpm inkubiert. Die Proteinase K Konzentrationen waren 10, 50, 100, 250 bzw. 500 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Anschließend wurden die Ansätze mit Hilfe von SDS-PAGE, Western Blot und Immunfärbung mit dem Antikörper SAF32 analysiert.

Abbildung 20 zeigt die Immunfärbung des Western Blot nach der gelelektrophoretischen Auftrennung des konzentrationsabhängigen Proteinase K

Verdaus. Durch die Anwendung der PK auf die amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen wurde eine weitere Bande, neben der zu erwarteten ~ 25 kDa Bande, bei ~ 17 kDa sichtbar. Mit steigender Konzentration der PK nahm die Signalintensität der ~ 25 kDa und ~ 17 kDa Bande ab.

4.1.6. Die *de novo* generierten amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen zeigen biophysikalische und makromorphologische Eigenschaften von PrP^{Sc} Fibrillen.

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Herstellung von *de novo* generierten amyloiden Prion-Fibrillen die makromorphologisch den Fibrillen von PrP^{Sc} ähneln. Ausgehend von den Pufferbedingungen nach Müller et al. wurde die Pufferzusammensetzung variiert. Für diese Arbeit wurde schließlich eine Pufferzusammensetzung verwendet die Fibrillen generiert, welche den PrP^{Sc} Fibrillen ähneln. Im Unterschied zu dem Puffersystem welches die Prion-Rods generiert, verzichtet das hier verwendete System auf den Einsatz von GdnHCl. Die biochemischen/-physikalischen und NMR-Spektroskopie Untersuchungen der Fibrillen wurden vergleichend zu den Untersuchungen in Müller et

al. durchgeführt. Der Vergleich soll Aufschluss über die strukturellen Unterschiede zwischen den Prion Rods nach Müller et al. und den Prion-Fibrillen dieser Arbeit bringen.

Der Start der *de novo* Fibrillogenese ist charakterisiert durch eine Lag-Phase von ca. 6 Tagen, gefolgt von einer exponentiellen Wachstumsphase, die nach ca. 12 Tagen in die stationäre Phase übergeht. Der Anstieg der Fluoreszenzintensität um Faktor ~ 100 ist ein erster entscheidender Hinweis auf die Bildung amyloider Fibrillen. Ein nur geringer Intensitätsanstieg wäre ein Hinweis auf einen Faltungsverlauf der in sog. „ β -Oligomere“ anstelle der gewünschten amyloiden Fibrillen enden würde [60]. Solch ein Faltungsverlauf führt in keinem Falle zu den gewünschten Fibrillen. Der Verlauf dieser Fibrillogenese ähnelt dem Verlauf der Fibrillogenese von Müller et al., mit einer Lag-Phase von 6 Tagen und einer Wachstumsphase die nach 9 Tagen in die stationäre Phase übergeht. Unterschiede in der Länge der Wachstumsphase können durch Unterschiede in der Darstellung verursacht sein, so wurden z.B. die Daten dieser Arbeit gefittet.

Die CD-spektroskopischen Untersuchungen deuten auf eine sekundäre Struktur der amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen hin, die eine dominierende β -Faltblatt Struktur mit weiteren α -helikalen und unstrukturierten Anteilen umfasst. Die CD-Spektren und somit auch die Verteilung der sekundären Strukturelemente ähneln sich in ihrem Anteil an β -Faltblatt Motiven, da der Verlauf bis zum Minimum bei ~ 218 nm identisch ist. Sie unterscheiden sich jedoch in ihrem Anteil an α -Helix Motiven bzw. unstrukturierten Elementen. Aufgrund des unterschiedlichen Nulldurchgangs ist anzunehmen, dass die Prion-Fibrillen ein anderes Verhältnis zwischen α -Helix Motiven und unstrukturierten Elementen haben als die Prion-Rods.

Die folgende Auswertung der TIRF-Mikroskopie zeigte ThT positive Objekte die unter anderem den gewünschten makromorphologischen, fibrillen-artigen Charakter besitzen. Jedoch sind neben den Fibrillen auch viele, auch ThT-positive, klumpige Aggregate zu erkennen. Fibrillen können im Allgemeinen stark in ihrer Länge variieren. Aufgrund der geringen Auflösung der TIRF-Mikroskopie, ein Pixel entspricht etwa 100 nm, kann nur vermutet werden, dass es sich bei den klumpigen Aggregaten um zusammen geklumpete amyloide ovrecPrP(MARQ) Fibrillen handelt. Einzelne dieser kleinen klumpigen Aggregate konnten als Ursprung von Fibrillen beobachtet werden von denen sowohl einzelnen Fibrillen, als auch mehrere Fibrillen sternförmig entsprangen. Das deutet darauf hin, dass die kleinen klumpigen Aggregate als Aggregationsursprung für eine sog. „Sekundärnukleation“ dienen [136].

Das makromorphologische Erscheinungsbild konnte mit rasterkraftmikroskopischen (AFM) Aufnahmen bestätigt werden. Neben dem länglich-faserigen Erscheinungsbild von teilweise mehreren Mikrometer Länge weisen die Fibrillen einen Durchmesser von 11-16 nm auf, was typisch für Protofilamente (5-30 nm) ist die sowohl aus *in vitro* Präparationen als auch aus Gewebe stammen [137-145]. Dass die abgebildeten Fibrillen aus Protofibrillen bestehen ist durch die teilweise sichtbaren Windungen und der Verzweigung der Fibrillen erkenntlich. Neben den besprochenen Unterschieden in den CD-Spektren zwischen den Prion-Fibrillen und den Prion-Rods unterscheiden sich diese ebenfalls in ihrem makromorphologischen Erscheinungsbild. In wie weit sich die Prion-Fibrillen von den Prion-Rods tatsächlich in ihren Faltungen unterscheiden, konnte mit diesen Untersuchungen nicht geklärt werden. Aufgrund der CD-spektroskopischen Auswertung wird vermutet, dass der Unterschied in der Faltung vor allem die Bereiche der α -Helix Motive und der unstrukturierten Elemente umfasst.

Als Hinweise auf eine potentielle Infektiösität der Prion-Fibrillen wurde ein Verdau mit Proteinase K durchgeführt. Die unspezifische exo- und endogene Hydrolyse der Aminosäuren durch die Proteinase K hinterlässt einen teilweise resistenten Amyloid-Kern von ~17 kDa Größe. Aufgrund der Bindungsfähigkeit des SAF32 Antikörper, kann davon ausgegangen werden, dass der Bereich der SAF32 Bindestelle noch vorhanden ist. Nach Zhang et al. umfasst der amyloide Kern, im Falle einer SAF32 Bindung, die im N-Terminus gelegenen Aminosäuren ab ~95 [59]. Die daraus resultierende Größe des Amyloid-Kerns, die die Aminosäuren ~95-233 umfassen, ähnelt der Größe des Amyloid-Kerns von natürlich vorkommendem PrP^{Sc} [146]. Nicht auszuschließen ist jedoch die Existenz von weiteren PK-resistenten Elementen, die eine geringere Größe als 17 kDa besitzen. Der verwendete SAF32 Antikörper erkennt und bindet an die Octarepeat Region, welche bei kleineren Fragmenten nicht mehr vorhanden sein könnte [46-48].

Zusammengenommen zeigen die biochemischen und -physikalische Untersuchungen, dass das GdnHCl-freie autokatalytische Konversionsprotokoll, welches im Zuge dieser Arbeit etabliert wurde, amyloide Fibrillen generiert, die die Eigenschaften von natürlichen PrP^{Sc} Fibrillen zeigen:

1. ThT-Bindung als Marker für das Vorhandensein von amyloiden Strukturen
2. Unlöslich in wässrigen Medien
3. Eine durch β -Faltblätter dominierte Sekundärstruktur
4. Das makromorphologische faserige Erscheinungsbild von Fibrillen

5. Partielle PK-Resistenz
6. Amyloid-Kern der die Aminosäuren ~95-233 umspannt und ähnlich zu dem natürlich vorkommendem PrP^{Sc} ist

Der Vergleich zwischen den Prion-Fibrillen (aus dieser Arbeit) und den Prion-Rods (nach Müller et al.) konnte vorläufig zeigen, dass sich die Unterschiede aus dem makromorphologischen Erscheinungsbild auch auf die Faltung erstrecken. So ist zu vermuten, dass der β -Faltblatt Anteil sehr ähnlich ist, die Unterschiede jedoch zum größten Teil im Verhältnis zwischen α -Helices und strukturlosen Elementen liegen. Im nächsten Kapitel soll dieser Frage mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie nachgegangen werden.

4.1.7. Festkörper-NMR-Spektroskopie der *de novo* generierten ovrecPrP Fibrillen

Mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie ist es möglich detaillierte strukturelle Informationen über die Faltung eines Moleküls zu erhalten. Durch die Verwendung von 2D-¹³C-¹³C-Korrelationsexperimenten können Rückschlüsse auf die strukturelle Ordnung gezogen werden. Im Detail sind das die Homogenität, aufgrund der Linienbreite einzelner Peaks, sowie die tendenzielle sekundäre Struktur, welche sich in den chemischen Verschiebungen von C α und C β der einzelnen Aminosäurereste widerspiegelt.

Für eine erste strukturelle Analyse der *de novo* generierten amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen wurden vier Spektren aufgenommen. Zum einen wurden drei PDSD Experimente, mit Mischzeiten von 20 ms, 50 ms und 150 ms, sowie ein DREAM Experiment aufgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 am Beispiel eines PDSD (20 ms) Spektrum (grau) und eines DREAM Spektrum (rot) dargestellt. Sowohl die PDSD Spektren als auch das DREAM Spektrum zeigen, neben vereinzelt gut aufgelösten Peaks, hauptsächlich Regionen mit schlechter Signaldispersion. Die einzelnen gut aufgelösten Peaks haben eine Linienbreite zwischen 1-1.5 ppm in beiden ¹³C-Dimensionen. Aufgrund der geringen Auflösung war es nicht möglich einzelne Spinsysteme eindeutig zuzuordnen, es konnten lediglich Bereiche teilweise den einzelnen Aminosäuretypen zugeordnet werden. Anhand dieser sog. „Finger-Print“ (engl., Fingerabdruck) Spektren ist es ebenfalls möglich die Aminosäurebereich mit Hilfe der sekundär chemischen Verschiebung (siehe Kapitel 3.17) den

Strukturelementen näherungsweise zuzuordnen. Des Weiteren ist es mit den Finger-Print Spektren möglich Proben zu vergleichen.

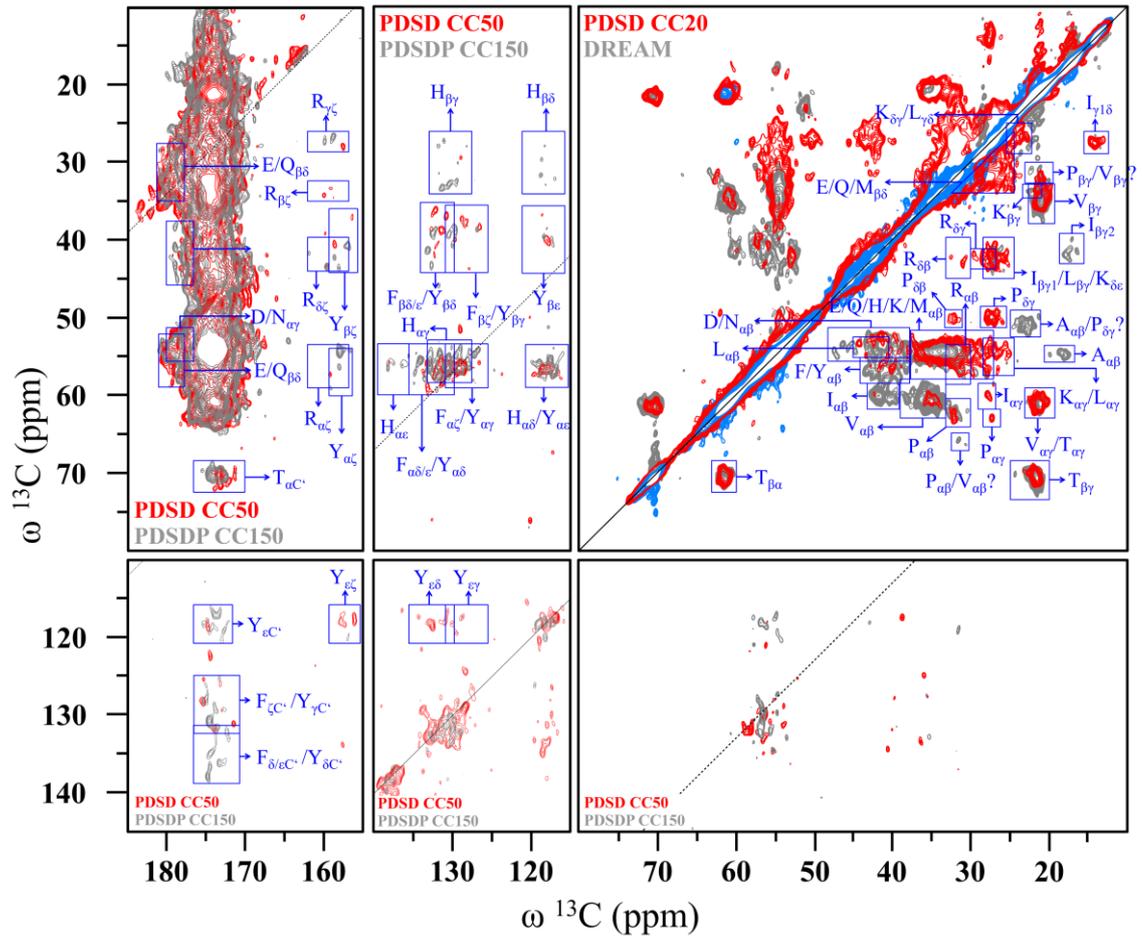


Abbildung 21: 2D- $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Korrelationspektren der *de novo* hergestellten ovrecPrP Fibrillen.

Rechts oben: PDS D Spektrum mit 50 ms Mischzeit (rot) und DREAM Spektrum (grau/blau). **Alle anderen:** PDS D Spektrum mit jeweils 50 ms (rot) und 150 ms (grau) Mischzeit. Aufgrund der schlechten Signaldispersion konnten nur Regionen der Aminosäuren identifiziert werden. PDS D Spektren wurden bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 11 kHz, DREAM Spektrum bei 22 kHz und einer Temperatur von jeweils $10\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ aufgenommen. Alle Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,25 prozessiert.

In Abbildung 22 sind die Spektren der in dieser Arbeit *de novo* generierten Fibrillen (rot) und die aus Müller et al. *de novo* generierten Fibrillen (schwarz) [111] vergleichend abgebildet. Die beiden Spektren ähneln sich zum größten Teil. So sind die Finger-Print Regionen von Alanin (β -Faltblatt), Threonin (α -Faltblatt), Serin (α), Isoleucin (β -Faltblatt), Tyrosin/Phenylalanin (β -Faltblatt), Valin (β -Faltblatt), Aspartat/Asparagin (β -Faltblatt), als auch der Proline fast identisch. Auch die Seitenkettenbereiche von Isoleucin, Leucin, Lysin, Argenin, Valin und Threonin sind fast identisch. Unterschiede sind in den Bereichen Serin (β -Faltblatt), Alanin (α) und Alanin (α -Helix). In den Spektren der *de novo* generierten Prion-Rods aus Müller et al. sind im Bereich der β -Faltblatt Serine mehr Signale zu sehen, jedoch fehlen Signale für die unstrukturierten Alanine. Auffällig sind die Unterschiede im Bereich der

Seitenketten C β /C γ Korrelationen der Proline, diese Signale fehlen vollständig in den Spektren der *de novo* generierten Prion-Rods von Müller et al.

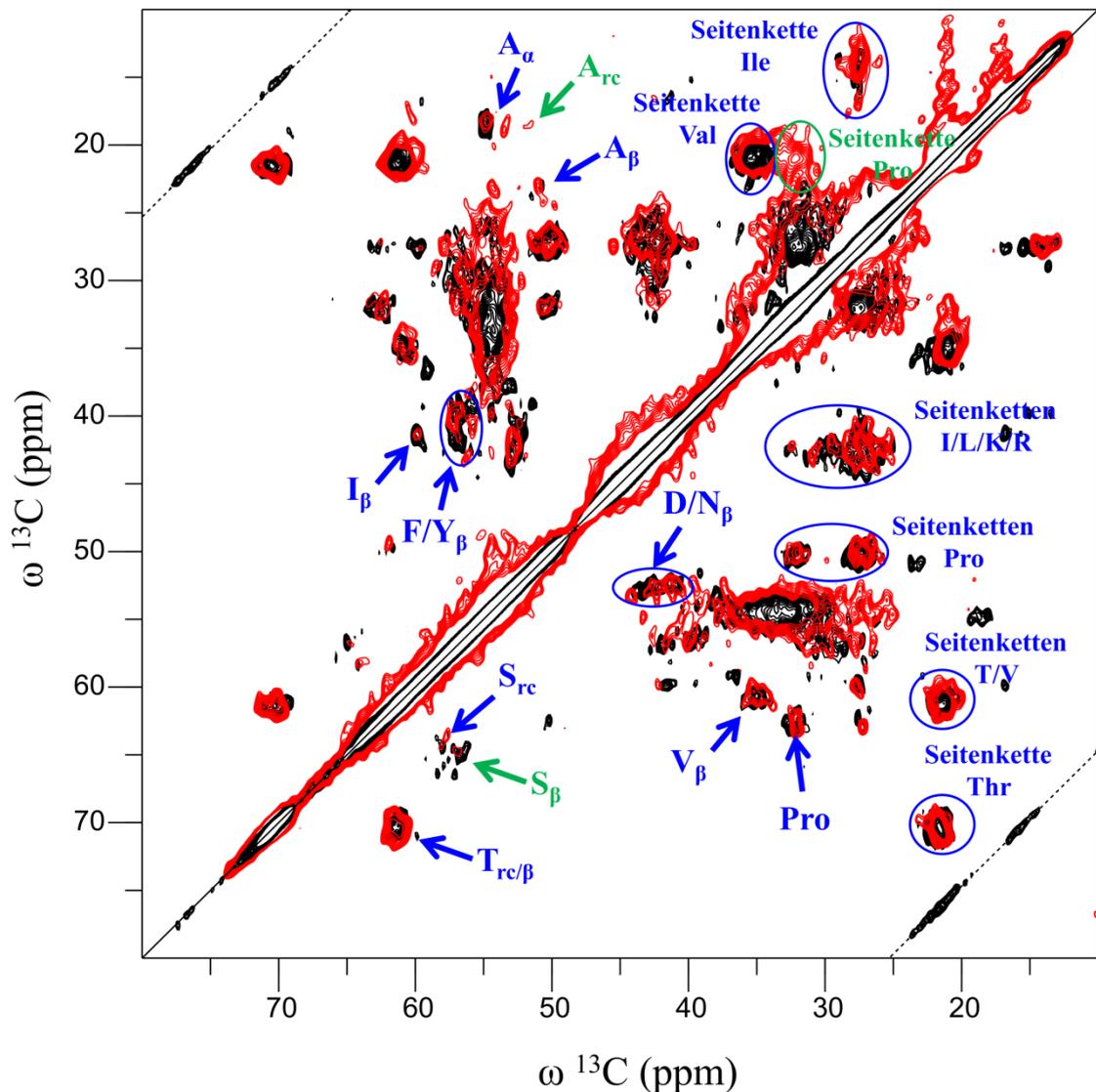


Abbildung 22: Vergleich der PDSD-Spektren zwischen den *de novo* hergestellten Prion-Fibrillen und den Prion-Rods (Müller et al.)

Rot: PDSD Spektrum mit 20 ms Mischzeit der Prion-Fibrillen (diese Arbeit), Schwarz: PDSD Spektrum mit 20 ms Mischzeit der Prion-Rods (aus Müller et al.). PDSD Spektren wurden an einem 600 MHz Spektrometer bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 11 kHz und einer Temperatur von jeweils $10\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen. Alle Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,25 prozessiert. Indizes: rc = Random Coil (Unstrukturiert), α = α -Helix, β = β -Faltblatt.

Des Weiteren sind die Intensitäten der Signalregionen der α -Helix Alanine im Vergleich zu den β -Faltblatt Alanine, abhängig von Art des Spektrums (hier: PDSD und DREAM), unterschiedlich. So zeigt sich ein Verhältnis zwischen α -Helix und β -Faltblatt von 0,94 zu 1 im PDSD Spektrum und ein Verhältnis von 0,7 zu 1 im DREAM Spektrum (siehe Abbildung 23). Aufgrund unterschiedliche Dynamiken und unterschiedlicher Hydratationsgrade kann die Effizienz der Magnetisierungsübertragung

und somit auch in der gemessenen Signalintensitäten zwischen den verschiedenen Experimenten variieren [147, 148].

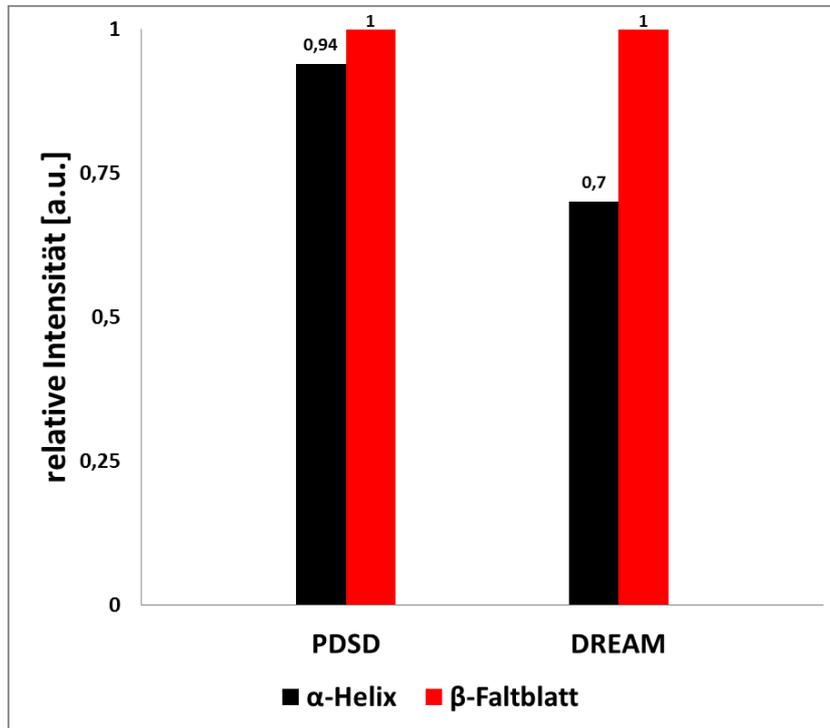


Abbildung 23: Vergleich der relativen Signalintensitäten zwischen α -Helix und β -Faltblatt Alanine.
Die relativen Intensitäten wurden auf die größte Intensität der jeweiligen Region im jeweiligen Spektrum referenziert. Schwarz: α -Helix Alanine. Rot: β -Faltblatt Alanine.

4.1.8. Die strukturellen Eigenschaften der *de novo* generierten ovrecPrP(MARQ) Prion-Fibrillen.

Im vorangegangenen Abschnitt konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit *de novo* hergestellten Prionen ein Fibrillen-ähnliches makromorphologisches Erscheinungsbild zeigen, die sich in ihrem Anteil von sekundären Strukturelementen zu den Prion-Rods nach Müller et al. unterscheiden. Die Untersuchungen mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie sollen im Folgenden die strukturellen Informationen über die Prion-Fibrillen erweitern und weitere detaillierte Unterschiede zu den Prion-Rods erbringen.

Im Vergleich zu anderen amyloiden Fibrillen, wie z.B. A β -Fibrillen [149] oder IAPP-Fibrillen [150], weisen die in dieser Arbeit hergestellten Prion-Fibrillen trotz vereinzelter gut aufgelöster Peaks, eine schlechte Signaldispersion und Regionen hoher Signalüberlappungen auf. Die hohe Anzahl an Aminosäuren führt dazu, dass einzelne Signale überlappen und nicht mehr als einzelnes Signal aufgelöst werden können. Aber auch eine strukturelle Heterogenität kann eine Rolle spielen. Dies führt zu einer homogenen Signalverbreiterung, die zusammen mit der hohen Signalüberlappung eine

Signaldiskriminierung zumindest in 2D-Spektren unmöglich macht. Anhand der vorhandenen Spektren war es daher nur möglich Regionen der einzelnen Aminosäuren teilweise zuzuordnen (siehe Abbildung 21). Durch die Berechnung der sekundär chemischen Verschiebung konnte für die zugeordneten Regionen eine Vorhersage ihrer strukturellen Umgebung gemacht werden. Die separierten C α /C β Regionen von Alanin, Asparagin/Aspartat, Isoleucin, Phenylalanin/Tyrosin, Serin, Threonin und Valin sind demnach zum überwiegenden Teil, in einer β -Faltblatt Konformation und nur zum geringen Teil in einer α -Helix Konformation oder strukturlos (siehe Abbildung 22).

Darüber hinaus konnten keine Hinweise auf Korrelationssignale für Tryptophan gefunden werden. Typisch für Tryptophan, was diese Aminosäure von allen anderen unterscheiden würde, wären Korrelationssignale von C β /C γ (rc: 29,6/111,2 ppm). Da jedoch in diesen Regionen, bei ~111 ppm, keine Korrelationssignale zu finden sind, wird davon ausgegangen, dass die Tryptophane nicht sichtbar sind. In Anbetracht dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass der N-Terminus nicht sichtbar für die Festkörper-NMR ist. Das kann zum einen daran liegen, dass die Dynamik des N-Terminus im Bereich der NMR-Zeitskala liegt und somit zu einer Austausch-Linienverbreiterung führt, oder dass die intrinsisch ungeordneten Elemente vollständig rigide sind, was zu einer beträchtlichen inhomogenen Linienverbreiterung führt. Beide Möglichkeiten sind jedoch die Folge eines unstrukturierten N-Terminus‘.

Aufgrund der unterschiedlichen Verhältnisse der Intensitäten von α -Helix und β -Faltblatt Alanine zwischen den PDS und DREAM Spektren ist zu vermuten, dass die Alanine zwar strukturiert sind, jedoch in einem flexiblen Bereich liegen müssen. Da 6 der 9 Alanine sich im Palindrom zwischen Aminosäure 115 und 124 befinden, kann folglich davon ausgegangen werden, dass zumindest der Bereich zwischen ~102 (letztes Tryptophan) und ~124 (Palindrom) zwar strukturiert, aber trotzdem flexibel ist.

Die eben besprochenen strukturellen Eigenschaften scheinen auch für die Prion-Rods zu gelten. Die Spektren der beiden Prionen sind überraschenderweise sehr ähnlich. Die vornehmlich ähnlichen Regionen beinhalten vor allem Regionen von Aminosäuren in β -Faltblatt Konformation, wie z.B. Threonin, Alanin oder auch Isoleucin (siehe Abbildung 22). Die auffälligsten Unterschiede beschränken sich auf Regionen der Alanine und den Serine. Im Vergleich zu den Prion-Fibrillen sind weniger Alanin Signale in den Spektren der Prion-Rods sichtbar, was darauf schließen lässt, dass die Mobilität unterschiedlich sein muss. Ein weiterer Hinweis auf eine unterschiedliche Mobilität geben die Serinsignale. In den Spektren der Prion-Rods sind zwar ähnlich

Signale wie für die Prion-Fibrillen zu erkennen, jedoch sind mehr Serinsignale für die Prion-Rods zu beobachten. Da 3 der 5 Serine im Bereich zwischen Aminosäure 105 und 139 zu finden sind unterstützt die Beobachtung die Vermutung, dass der Bereich von ~102 bis mindestens 124 der Prion-Rods unterschiedlich mobil im Vergleich zu den Prion-Fibrillen sein muss. Es bleibt jedoch die Frage, ob die unterschiedliche Mobilität aufgrund unterschiedlicher intrinsischer Flexibilität bzw. Dynamiken oder auch durch unterschiedliche Hydratationsgrade bedingt ist. Was jedoch wahrscheinlich ist, unabhängig ob die Mobilität durch Dynamiken und/oder den Hydratationsgrade bedingt ist, ist die höhere Mobilität der Prion-Fibrillen im Bereich zwischen Aminosäure ~102 und ~124 im Vergleich zu dem Bereich ab Aminosäure 125.

Aufgrund der schlechten Signaldispersion in den vorhandenen Spektren, kann keine detaillierte Aussage über die Faltung der Prion-Fibrillen oder über den detaillierten Unterschied zu den Prion-Rods gemacht werden. Dafür wären weitere NMR-Experimente und verschiedene Markierungsschemata zur Reduktion der Signalüberlappung und Verbesserung der Auflösung nötig. Jedoch war es möglich fest zu stellen, dass die Prion-Fibrillen:

1. Einen für die Festkörper-NMR-Spektroskopie sichtbaren C-Terminus haben
2. Einen unstrukturierten und für die Festkörper-NMR-Spektroskopie nicht sichtbaren N-Terminus haben
3. Einen strukturierten aber mobilen Bereich zwischen Aminosäure ~102 bis ~124 und einen strukturierten aber rigiden Bereich ab Aminosäure ~125 besitzen
4. Die zugeordneten Regionen vornehmlich in β -Faltblatt Konformationen involviert sind
5. Heterogene Strukturen aufweisen

Der Vergleich zu den Prion-Rods deutet auf eine sehr ähnliche Struktur hin, Unterschiede betreffen zumindest die Regionen zwischen Aminosäure ~102 und ~124.

4.1.9. Zusammenfassende Diskussion der biochemischen/-physikalischen und Festkörper-NMR spektroskopischen Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die *de novo* Herstellung von amyloiden Prion-Fibrillen aus den ursprünglich rekombinant hergestellten ovinen Prion Protein (ovrecPrP) Monomeren. Diese sollten sich zumindest in ihrem makromorphologischen Erscheinungsbild von den Prion-Rods nach Müller et al. in der Hinsicht unterscheiden, dass sie dem faserigen Erscheinungsbild der natürlich vorkommenden PrP^{Sc} Fibrillen ähneln. Durch die

Modifikation des autokatalytischen Konversionssystems, welches auch für die Herstellung der Prion-Rods verwendet wurde, konnten Prionen hergestellt werden die in ihrem Erscheinungsbild den natürlich vorkommenden, faserigen PrP^{Sc} Fibrillen ähneln. Allein durch den Verzicht auf GdnHCl im Puffersystem ist es möglich das Erscheinungsbild der Fibrillen zu verändern. Da GdnHCl ein chaotropes Denaturierungsmittel ist, beeinflusst es wahrscheinlich die Stabilität der Fibrillen. So fragmentieren die großen Aggregate früher, was dazu führt, dass die Länge der Fibrillen nur noch einige 100 Nanometer betragen kann. Ergänzend dazu spiegeln die NMR-Spektren den hohen Gehalt an β -Faltblatt Motiven in beiden Prionen wieder. In den Finger-Print Spektren sind vorwiegend Ca/C β -Korrelationssignale zu finden die in β -Faltblatt Konformation vorliegen. Diese Regionen sind auch fast identisch zwischen den beiden Prionen, die Unterschiede betreffen hauptsächlich die Regionen zwischen Aminosäuren ~102 und ~124. Der Unterschied in der Mobilität könnte hier durch einen höheren β -Faltblatt Anteil in diesem Bereich bedingt sein, weshalb in den Spektren der Prion-Rods mehr Serine in β -Faltblatt Konformation zu beobachten sind.

Zusammengefasst konnte das Ziel der Herstellung von Prion-Fibrillen, die makromorphologisch den natürlich vorkommenden PrP^{Sc} Fibrillen ähneln, erreicht werden. Die in dieser Arbeit hergestellten Prion-Fibrillen unterscheiden sich nur im geringem Maße zu den Prion-Rods nach Müller et al.. So ist zu vermuten, dass die Amyloid-Kerne sehr ähnlich sein müssen, die flexiblen Regionen (< 124) jedoch unterschiedlich in Struktur und Mobilität sind. Ob die Prion-Fibrillen infektiös sind kann hier nicht geklärt werden. Auch detaillierte Informationen über die Struktur können hier nicht erbracht werden. Das liegt zum einen an den vorhandenen Spektren, zum anderen aber auch an der Inhomogenität der Probe. Für weitere Untersuchung mit der Festkörper-NMR-Spektroskopie müssen Proben mit verschiedenen Markierungsschemata hergestellt werden. Vorrangig sollte ein Deuterierungsschema verwendet werden um die homogene Linienbreite, vor allem in der ¹⁵N-Dimension gering zu halten, zum anderen aber auch zur Detektion von ¹H. Dies würde den Vorteil mit sich bringen, dass die ¹H-Dimension detektiert werden könnte und somit eine weitere Möglichkeit zur Differenzierung von Spinsystemen verwendet werden könnte.

4.2. Charakterisierung von PrP^{Sc} induzierten, amyloiden ovrecPrP Fibrillen

Der Fokus dieser Arbeit lag in der strukturellen Charakterisierung des Schafs Prion. Die bisherigen Erkenntnisse aus früheren Studien [111] sollten in dieser Arbeit weitergeführt und vertieft werden. Als Ansatz wurden die PrP^{Sc} induzierten, amyloiden ovrecPrP Fibrillen verwendet, die eventuell ähnlicher den natürlich vorkommenden PrP^{Sc} Fibrillen sind, als die *de novo* generierten amyloiden ovrecPrP Fibrillen. Dazu sollte weiterhin festgestellt werden ob die Keim-induzierte Fibrillogenese nur die Aggregationskinetik erhöht oder, ob auch die Struktur des PrP^{Sc} weitervererbt wird. Für das Alzheimer assoziierte Amyloid β ist bekannt, dass durch dieses sog. „Repeated Seeding“ aus einem ursprünglich polymorphen Zustand eine einzelne intrinsische Struktur selektiv amplifiziert werden kann [113]. In dieser Arbeit wurden amyloide ovrecPrP Fibrillen generiert, die durch Einbringung von Keimen induziert worden waren. Zum einen wurden „echte“ Prionen Fibrillen verwendet, die wie nachfolgend beschrieben gewonnen wurden, zum anderen wurden die so generierten Fibrillen als Keime für nachfolgende Generationen verwendet. Für einen zukünftigen strukturellen Vergleich wurden Fibrillen der Polymorphen M₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ und T₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ hergestellt. Der Vergleich soll Einblick in die für eine Infektion notwendigen strukturellen Eigenschaften geben, da für den TARQ Polymorphen bekannt ist, dass dieser resistent gegen Prionerkrankungen ist. Für die Festkörper-NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden neben Standard isotopenmarkierte ovrecPrP Monomere (einheitlich markiert) auch Monomere verwendet die zusätzlich zu den ¹³C/¹⁵N Markierungen deuteriert wurden.

4.2.1. PTA-Fällung von PrP^{Sc} aus Hirnhomogenat

Für die Generierung von amyloiden ovrecPrP Fibrillen durch Induktion oder „Seeding“ wurden PrP^{Sc} Fibrillen aus Hirngewebe von Scrapie kranken Schafen gefällt. Dazu wurde die sog. Wolframphosphorsäure Natriumsalz oder auch PTA-Fällung verwendet. Die Fällung umfasste zwei Fällungsschritte unter der Verwendung von 2 % PTA sowie einen Waschschrift mit einer Sarkosyl Lösung (in 100 mM NaP_i pH 7,4). Um die Präzipitate zu pelletieren erfolgte zwischen den Fällungs- und Waschschriften eine 45-minütige Zentrifugation bei 14.000 g. Eine detaillierte Beschreibung der PTA-Fällung kann Kapitel 3.2 entnommen werden.

Für die Analyse der PTA-Fällung wurden während der Fällungsprozedur Aliquote des Hirngewebes nach jedem Fällungsschritt, dem Waschschrte, sowie vom finalen Pellet entnommen. Alle Proben wurden gelelektrophoretisch getrennt und nach einem

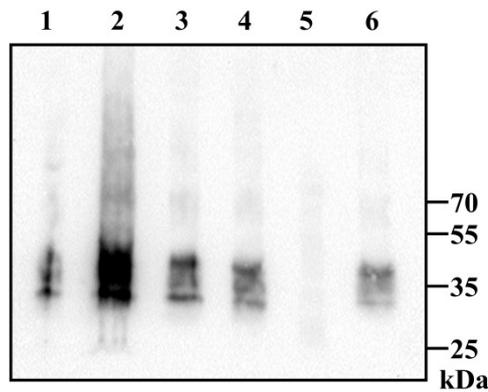


Abbildung 24: Western Blot der PTA-Fällung. Der Western-Blot zeigt die gelelektrophoretische Trennung der einzelnen Fällungs- und Waschschrte der PrP^{Sc} Fibrillen aus Hirnhomogenat. Spur 1 zeigt das Pellet des Hirnhomogenat nach Zentrifugation, Spur 2 den entsprechenden Überstand. Spur 3 und 4 zeigen den Überstand der Fällungsschrte. In Spur 5 ist der Überstand nach dem Waschrte aufgetragen und Spur 6 zeigt das Pellet welches auch für die Keim-Induktion verwendet wurde. Als erst-Antikörper wurde SAF32 verwendet.

Western-Blot immunologisch eingefärbt. Es sollte überprüft werden, ob durch den Fällungsprozess PrP^{Sc} Fibrillen gefällt werden konnten

In Abbildung 24 ist die SAF32 Immunfärbung zu sehen. In Spur 1 ist das Hirnhomogenat nach der ersten Zentrifugation aufgetragen und in Spur 2 der entsprechende Überstand. In den Spuren 3 und 4 sind die Überstände der zwei Fällungsschrte zu sehen, in Spur 5 der Überstand nach dem Waschrte und in Spur 6 das finale Pellet.

Im Pellet, sowie im Überstand des zentrifugierten Hirnhomogenat, konnte PrP nachgewiesen werden. Des Weiteren war es in den Überständen der beiden Fällungsschrte zu finden. Nach dem Waschrte konnte im Überstand kein PrP mehr detektiert werden, jedoch im finalen Pellet. Da kein PrP mehr im Überstand nachzuweisen ist, aber im Pellet, kann davon ausgegangen werden das die PTA-Fällung quantitativ die PrP^{Sc} Fibrillen präzipitiert hat und das monomere PrP entfernt wurde.

4.2.2. Aggregationskinetik Keim-induzierter Fibrillen

Die erfolgreiche Generierung von Keim induzierten amyloiden ovrecPrP Fibrillen sollte durch einen ThT-Assay nachgewiesen werden. Wie in Kapitel 3.3 beschrieben wurden die Fibrillogense Ansätze in einem 15 ml Reaktionsgefäß durchgeführt. Die ovrecPrP Konzentration betrug 1 µg/µl bzw. 2 µg/µl in 20 mM NaOAc pH 5,0; 167 mM NaCl; 2,4 M Urea. Als Keim für die induzierte Fibrillogense wurden für die erste Generation die oben beschriebenen gefällten PrP^{Sc} Fibrillen verwendet. Die zweite Generation wurde anschließend mit ~60 µg Fibrillen der ersten Generation induziert. Die dritte Generation der vollständig ¹³C/¹⁵N markierten Fibrillen wurde mit ~30 µg, die dreifach markierten mit ~25 µg der zweiten Generation induziert. Für die Ansätze mit den dreifach markierten Monomeren wurden alle Fibrillisationpuffer und Waschlösungen mit einem H/D-Verhältnis von 30:70 verwendet. Die Ansätze wurden bei 37 °C und

Schütteln mit 650 rpm inkubiert. Für die täglich durchgeführten ThT-Messungen wurden 15 µl entnommen und mit 135 µl des Fibrillogenesepuffers mit 5 µM ThT vermischt und in eine 96-Well Mikrotiterplatte (MTP) überführt. Die Messungen der relativen Fluoreszenzwerte wurden entsprechend Kapitel 3.4 durchgeführt. Der relative Fluoreszenzwert (RFU) entspricht dem Integral über die gemessene spektrale Weite.

Abbildung 25 zeigt die Aggregationskinetiken der Keim-induzierten ovrecPrP(MARQ) Fibrillen der 1. bis 3. Generation. Alle Aggregationskinetiken zeigen den typischen sigmoidalen Verlauf bestehend aus Lag-Phase, exponentieller Phase und Plateau-Phase. Im Vergleich zu den *de novo* generierten Fibrillen ist die Lag-Phase für die $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Ansätze mit etwa einen Tag deutlich kürzer (Abbildung 25A). Ausnahme bildet hier die $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierte 3. Generation, die eine Lag-Phase von ca. 2 Tagen hat, die jedoch im Vergleich zu der 1. und 2. Generation nur mit der halben Menge an Keimen induziert wurde. Die Plateau-Phase wurde allerdings schon nach 6 Tagen erreicht, wohingegen die Lag-Phase der *de novo* Fibrillen erst am 6. Tage endete. Ungleich länger dauerte die Fibrillierung der dreifach markierten Fibrillen, mit einer Lag-Phase von ca. 7 Tagen und einer stark verlängerten exponentiellen Wachstumsphase von weiteren 7 Tagen, trotz seedings.

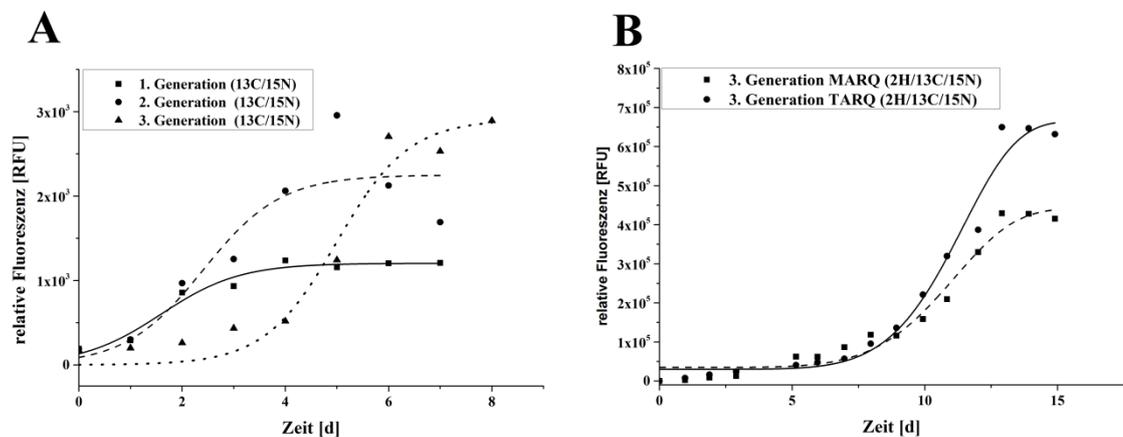


Abbildung 25: Verlauf der Fibrillogenese der verschiedenen Generationen der Keim-induzierten Fibrillogenese.

(A) Keim-induzierte Fibrillogenese der ersten bis dritten Generation der vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten ovrecPrP(MARQ) Prion-Fibrillen (B) Keim-induzierte Fibrillogenese der Generation der vollständig $^{2}\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten ovrecPrP(MARQ) und ovrecPrP(TARQ) Prion-Fibrillen. Die Fibrillogenese wurde mit Hilfe der ThT-spezifischen Fluoreszenz untersucht. Die Intensität der Fluoreszenz ist das Integral über die gemessene Wellenlänge und wurde in Abhängigkeit der Zeit aufgetragen. Die Fibrillogenese wurde mit dem modifizierten GdnHCl-freien autokatalytischen Konversionssystem durchgeführt. Die durchgezogene, gestrichelte und gepunktete Linie zeigen jeweils den Fit der Wachstumskurve der ersten, zweiten und dritten Generation (A). Die durchgezogene und gestrichelte Linien zeigen jeweils den Fit der Wachstumskurve der dritten Generation der ovrecPrP(TARQ) und ovrecPrP(MARQ) Prion-Fibrillen (B).

4.2.3. Proteinase K Verdau der Keim-induzierten amyloiden ovrecPrP Fibrillen

Um zu analysieren, ob die Keim-induzierten ovrecPrP Fibrillen partiell resistent gegen einen Proteinase K Verdau sind, wurden Proben der 1. und 3. Generation des ovrecPrP(MARQ) und der 3. Generation ovrecPrP(TARQ) verwendet. Zusätzlich wurden Proben einer Fibrillognese der 3. Generation verwendet, die ein molares Verhältnis zwischen ovrecPrP(MARQ) und ovrecPrP(TARQ) von 1:1 hatten. Diese drei Ansätze spiegeln die in der Natur anzutreffenden zygotischen Variationen wieder, mit Homozygot MARQ/MARQ und TARQ/TARQ sowie Heterozygot MARQ/TARQ.

Für den Proteinase K Verdau wurden 16 µl der Proben mit einer Konzentration von 1 µg/µl in 1 M Tris-HCl Puffer pH 7,5 und 1 % Triton X-100 für 1h bei 37 °C und Schütteln bei 650 rpm inkubiert. Die Proteinase K Konzentration betrug 20 ng/µl. Anschließend wurden die Ansätze mit Hilfe einer SDS-PAGE und Coomassie-Blau Färbung analysiert.

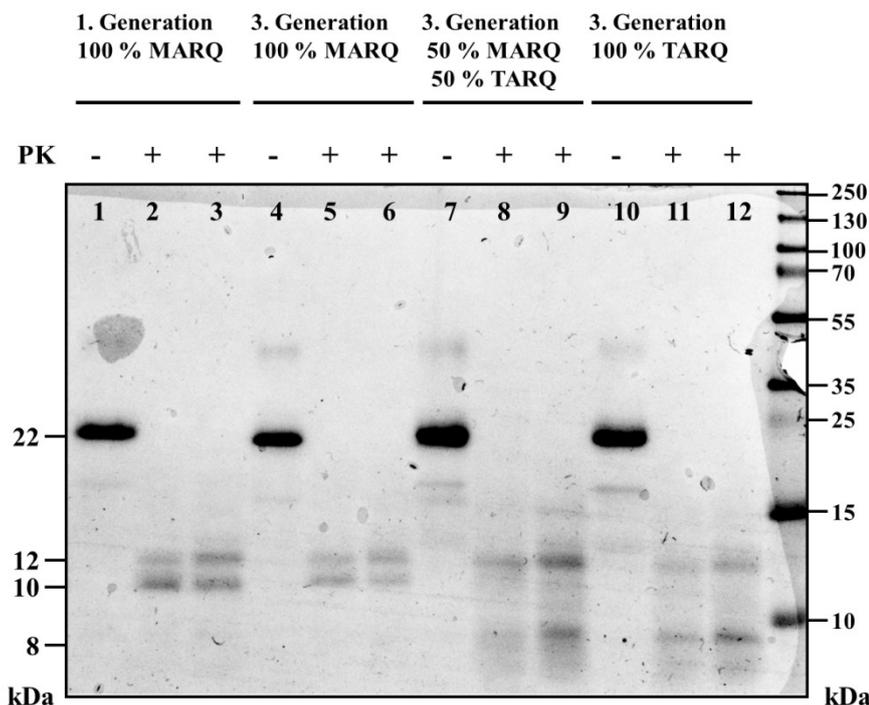


Abbildung 26: Überprüfung der partiellen PK-Resistenz der Keim-induzierten Prion-Fibrillen.

Die gelelektrophoretische Trennung zeigt die partiell PK-resistenten Fragmente der Prion-Fibrillen. Spuren 1-3 zeigen die erste Generation vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierter ovrecPrP(MARQ) Prion-Fibrillen. Spuren 4-6 zeigen die dritte Generation der dreifach markierten ovrecPrP(MARQ) Prion-Fibrillen. Spuren 7-9 zeigen die ovrecPrP(MARQ)/ovrecPrP(TARQ) Mischfibrillen. Spuren 10-12 zeigen die dritte Generation der dreifach markierten ovrecPrP(TARQ) Prion-Fibrillen. Rechts ist der Größenmarker aufgetragen

Abbildung 26 zeigt die Coomassie-Blau Färbung des SDS-Gels nach dem PK-Verdau Keim-induzierter Fibrillen. Spur 1-3 zeigen die erste Generation, Spur 4-6 die dritte Generation der ovrecPrP(MARQ) Fibrillen, Spur 7-9 die ovrecPrP(MARQ/TARQ)

Mischfibrillen und Spur 10-12 die ovrecPrP(TARQ) Fibrillen. Durch die Anwendung der PK auf die amyloiden ovrecPrP(MARQ) Fibrillen der ersten (Spur 1-3) sowie der dritten (Spur 4-6) Generation wurden zwei neue Fragmente bei ~12 kDa und ~11 kDa, respektive, sichtbar. Das ursprüngliche Protein mit einer Größe von ~25 kDa ist nach PK Behandlung nicht mehr vorhanden. Im Falle der ovrecPrP(TARQ) (Spur 10-12) hingegen wurden zwar auch zwei neue Fragmente sichtbar, eine ebenfalls bei ~12 kDa, die zweite jedoch bei ~8 kDa. Auch hier ist das ursprüngliche Protein nicht mehr vorhanden. Im Falle der Mischfibrillen (Spur 7-9) wurden ebenfalls zwei neue Fragmente sichtbar, die mit ~12 kDa und ~8 kDa den Fragmenten der ovrecPrP(TARQ) Fibrillen ähneln. Die Analyse mit ImageLab (Biorad) der Intensitätsverteilung zwischen den Fragmenten bei 12 und 11 kDa, sowie 12 und 8 kDa, zeigte in allen Fällen ein Verhältnis der beiden PK-Verdau Produkte von ~1:1 (Tabelle 13). Wird die Größe der einzelnen PK-Verdau Produkte mit den bekannten Größen und deren korrespondierenden Längen aus der Literatur verglichen, so korreliert die Größe von 12 kDa mit einem Fragment von ~140-233, 11 kDa einem Fragment von ~150-233, sowie 8 kDa von ~165-233 [48].

Tabelle 13: Relative Bandenintensitäten der gelelektrophoretischen Trennung nach PK-Verdau.

	Banden Nr.	Mol. Wt. (kDa)	Relative Front	Volume (Int)	Bande %
Spur 1	1	21,8	0,5	19753728	100,0
Spur 2	1	11,8	0,7	4444004	48,4
	2	11,0	0,8	4732800	51,6
Spur 3	1	12,2	0,7	2653972	48,8
	2	11,0	0,8	2785892	51,2
Spur 4	1	21,2	0,5	19292416	90,9
Spur 5	1	12,2	0,7	4103868	50,6
	2	11,2	0,8	4000372	49,4
Spur 6	1	12,3	0,7	3020696	51,8
	2	11,3	0,8	2810236	48,2
Spur 7	1	22,0	0,5	27813292	91,9
Spur 8	1	12,2	0,7	4904568	51,0
	2	~8	0,9	4712264	49,0
Spur 9	1	12,3	0,7	5427080	48,9
	2	~8	0,9	5677524	51,1
Spur 10	1	21,9	0,5	26789824	98,0
Spur 11	1	12,2	0,7	3627868	47,8
	2	~8	0,9	3969568	52,2
Spur 12	1	12,3	0,7	4211444	41,3
	2	~8	0,9	5977404	58,7

4.2.4. Die biophysikalischen Untersuchungen zeigen keine Hinweise auf eine Strukturvererbung aber heterogene Strukturen der Prion-Fibrillen

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Konversionen von den nativ gefalteten ovrecPrP Monomeren zu den β -Faltblatt reichen amyloiden ovrecPrP Fibrillen, diente in erster Linie zur Präparation von Festkörper-NMR Proben. Eine einführende Charakterisierung dieser *in vitro* generierten, Keim-induzierten Fibrillen wurde schon zuvor beschrieben [111].

Unter der Verwendung der in Kapitel 4.2.1 gewonnen PrP^{Sc} Fibrillen als Keime zur Konversionsinduktion, konnten *in vitro* amyloide ovrecPrP(MARQ) Fibrillen mehrerer Generationen generiert werden. Durch die Verwendung der Keime wurde die Lag-Phase verkürzt. Im Vergleich zu den *de novo* generierten Fibrillen, die eine Lag-Phase von ca. 6 Tagen aufweisen, war die Lag-Phase der Keim-induzierten Fibrillen 1 bzw. 2 Tage lang. Die etwas längere Lag-Phase der 3. Generation ist wahrscheinlich dadurch bedingt, dass im Vergleich zur Induktion der 2. Generation, die Hälfte der Menge an Keimen, ca. 30 μ g, verwendet wurde. Der Übergang in die stationäre Phase beginnt jedoch schon nach 6 Tagen. Eine Co-Fibrillisation, die zu einer ähnlichen Faltung wie der *de novo* generierten ovrecPrP Fibrillen führen, kann zwar nie gänzlich ausgeschlossen werden, doch sollte die Wahrscheinlichkeit sehr gering sein. Laut den Konversionsmodellen von Prusiner [49] und Lansbury [47, 50], sollten die PrP Monomere die thermodynamische begünstigte Isoform sein. Erst ab dem Punkt an dem sich genügend Intermediate gebildet haben, kann sich ein stabiler PrP^{Sc} Nukleus bilden. Da jedoch mit fortschreitender Zeit die ovrecPrP Monomere durch die schon laufende Fibrillisation entzogen werden, sollte die Wahrscheinlichkeit, dass sich genügend Intermediate aus der spontanen Konversion bilden können, mit der Zeit auch immer geringer werden. Im Vergleich zu den vollständig markierten Fibrillen der dritten Generation zeigen die erste und zweite Generation eine kürzere Lag-Phase. Aufgrund der bisher ungenügenden Kenntnisse über den genauen Mechanismus und den Einfluss von anderen Faktoren, wie z.B. anderer Proteine, auf diesen Faltungsmechanismus kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch das repetitive Seeding die Faktoren ausgedünnt werden und dadurch die Kinetik beeinflusst wurde. Die dreifach markierten ovrecPrP Fibrillen hatten jeweils eine stark verlängerte Lag- (6 Tage) und Wachstumsphase (6 Tage). In erster Linie könnte der sog. „Isotopeneffekt“ des Deuteriums (DIE, Deuterium Isotopeneffekt) für die verlangsamte Fibrillierungskinetik sein. Wade berichtete über den DIE auf nicht-kovalente Bindungen [151], dass dieser

einen Einfluss auf z.B. die Polarität oder auch auf die Hydrophobizität eines Moleküls nehmen kann. Als weiteres Beispiel führte er auch die Wirkung des DIE auf die Aktivität eines Inhibitors auf, welcher in vollständig deuteriertem Zustand eine geringere Aktivität aufweist. Es liegt also nahe, dass auch die Wachstumskinetik der Prion-Fibrillen durch den DIE beeinflusst wird.

Die unterschiedlichen Größen der PK-Produkte deuten auf unterschiedliche Faltungen des Amyloid-Kerns von ovrecPrP(MARQ) und ovrecPrP(TARQ) Fibrillen hin. Anhand des unterschiedlichen Infektionsverlauf bei Schafen die Homozygot für MARQ bzw. TARQ sind, war zu erwarten, dass die Fibrillen des jeweiligen Genotyps unterschiedliche partielle PK-Resistenzen zeigen sollten. Überraschenderweise entsprechen die PK-Produkte der MARQ/TARQ-Mischfibrillen den Fragmenten des TARQ, mit ebenfalls ~12 und ~8 kDa Größe. Aus diesen Ergebnissen kann in erster Linie die Frage beantwortet werden, ob die Prion-Fibrillen ihre Struktur weitervererben. Die erste sowie die dritte Generation des ovrecPrP(MARQ) zeigen identische Größen von partiell PK-resistenten Fragmenten, das ovrecPrP(TARQ) jedoch nicht. Das legt den Schluss nahe, dass die Struktur der ovrecPrP(MARQ) Keime nicht auf die ovrecPrP(TARQ) Monomere übertragen werden kann. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Struktur vererbt werden kann bzw. kein „Templating“ stattfindet. Da aber die Mischfibrillen identische partiell PK-resistente Fragmente zeigen, spricht dies für ein dominantes Verhalten der TARQ Struktur. Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Beobachtungen von Laegreid et al. [31], nach dem heterozygote Schafe eben so wenig anfällig für Scrapie, wie die TARQ homozygoten Schafe sind. Dies ist schlussendlich auf die Konformation des PrP in den Fibrillen zurück zu führen. Es bleibt jedoch die Frage, warum zwei Fragmente durch den PK-Verdau entstehen und in wie weit sich die Strukturen zwischen ovrecPrP(MARQ) und ovrecPrP(TARQ) bzw. die des ovrecPrP(MARQ) in den Mischfibrillen unterscheiden. Da die PK eine unspezifische Endo- und Exoproteinase ist, können spezifischen Schnittstellen innerhalb der PrP Sequenz nicht in Frage kommen. Viel mehr sind die Fragmente durch ihre Faltung vor der Hydrolyse durch die PK partiell geschützt. Anhand der Mengenverteilung der Fragmente von nahezu 1:1 in allen untersuchten Ansätzen ist zu vermuten, dass zwei (partiell) verschiedene Strukturen vorhanden sein müssen. Es wäre aber auch ein mehrstufiger Vorgang möglich, bei welchem die PK zuerst alle zugänglichen Aminosäuren hydrolysiert. Als Produkt dieser ersten Stufe würde das größere der beiden Fragmente entstehen. Gefolgt davon wäre eine partielle Entfaltung

des Amyloid-Kerns, so dass ein 1 kDa bzw. ein 4 kDa großes Fragment für die PK zugänglich würde. Das Produkt wäre dann ein Fragment der Größe 11 kDa bzw. 8 kDa. In einer zweiten Stufe würde dann das restliche Protein entfaltet und hydrolysiert werden. Im Unterschied zu der Hypothese der zwei Konformationen dürfte hier das Fragment-Verhältnis nicht 1:1 sein. Aufgrund der Länge der beiden Fragmente müsste das kleinere Fragment überwiegen, da die Entfaltung eines 11 bzw. 8 kDa großen Fragments mehr Energie kosten würde, als die eines 1 bzw. 4 kDa großen Teilstücks. Zur Bestätigung dieser Hypothese sollte eine PK-Verdaukinetik durchgeführt werden. Im Falle von zwei (partiell) unterschiedlichen Konformationen bzw. Strukturen stellt sich die Frage nach der Fibrillenarchitektur. So ist es zum einen möglich, dass die Prion-Fibrillen aus einem Heterodimer aufgebaut sind oder, wie Wille und Mitarbeiter für das PrP²⁷⁻³⁰ zeigen konnten, aus zwei distinkten Protofibrillen [76]. Zum anderen wäre auch es möglich, dass zwei distinkte Fibrillenspezies existieren, wie Makarava et al. schon für Prion-Fibrillen zeigen konnten die unter Schütteln bzw. Rühren hergestellt wurden [152]. Welche dieser beiden Hypothesen korrekt ist, kann hier nicht eindeutig geklärt werden.

Unabhängig von der genauen Architektur der hier untersuchten Fibrillen war die offenstehende Frage, in wie weit sich die Faltungen der verschiedenen ovrecPrP Fibrillen unterscheiden. Eindeutig ist, dass zumindest ein Teil aller verwendeten ovrecPrP Fibrillen eine ähnliche Faltung haben müssen, da sie dasselbe partiell PK-resistente Fragment mit einer Größe von ~12 kDa zeigen. Ein zweiter Teil zeigt, wie oben besprochen, unterschiedliche partiell PK-resistente Fragmente. Die ovrecPrP(MARQ) besitzen mit einer Fragment Größe von ~11 kDa einen größeren Amyloid-Kern als die ovrecPrP(TARQ) mit einer Fragment Größe von ~8 kDa. Dementsprechend muss die Faltung zumindest in dem 3 kDa großen Bereich unterschiedlich sein. Das dominante Verhalten der Struktur des ovrecPrP(TARQ) gegenüber dem ovrecPrP(MARQ) lässt darauf schließen, dass die Faltung einen erheblichen Einfluss auf das Interface zwischen zwei Monomeren haben muss. So ist zu vermuten, dass der Bereich der unterschiedlichen Faltung des ovrecPrP(TARQ) die Faltung des ovrecPrP(MARQ) sterisch so beeinflusst, dass nur der 8 kDa große Bereich in eine Faltung übergehen kann die partiell PK-resistent ist.

Der Vergleich der Fragmente mit den bekannten Amyloid-Kern Größen aus der Literatur, so korrespondieren die partiell PK-resistenten Fragmente mit den Amyloid-Kernen der Größe ~140-233 (12 kDa), ~150-233 (11 kDa), sowie ~165-233 (kDa). Eine

genaue Aussage über den Bereich des Amyloid-Kerns der in dieser Arbeit hergestellten Prion-Fibrillen kann alleine mit diesen Ergebnissen nicht getroffen werden. Zur weiteren strukturellen Untersuchung wurden, die in den nachfolgenden Kapiteln dargestellten, Festkörper-NMR-Spektroskopie Untersuchungen durchgeführt.

4.3. Festkörper-NMR Untersuchung PrP^{Sc} induzierter, amyloider ovrecPrP Fibrillen

Für die strukturelle Analyse der ersten ovrecPrP(MARQ) Fibrillen Generation wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten Experimente verwendet. Wie in Kapitel 4.1.7 schon erwähnt kann durch die Verwendung von 2D-¹³C-¹³C-Korrelationsexperimenten Rückschlüsse auf die strukturelle Ordnung gezogen werden. Des Weiteren wurden 2D/3D-¹³C-¹⁵N-Korrelationsspektren für diese Fibrillen aufgenommen. Mit dieser Art von Experimenten ist es möglich, die in 2D-¹³C-¹³C-Korrelationsspektren überlappenden Signale voneinander zu differenzieren. Durch die Verwendung der N-Korrelationen ist es im weiteren Verlauf möglich, sequentielle Verbindungen unter den Aminosäuren zu identifizieren.

4.3.1. Die erste Generation PrP^{Sc} induzierter amyloider ovrecPrP(MARQ) Fibrillen

Die für die vorläufige Zuordnung von Spinsystemen verwendeten Spektren sind in Tabelle 9 aufgelistet. Aufgrund der schlechten Signaldispersion war es nicht möglich anhand von 2D-Korrelationsspektren alle Spinsysteme eindeutig zu identifizieren. Jedoch konnte diese für die Zuordnung der Regionen der jeweiligen Aminosäuren verwendet werden. Ausgehend von den zugeordneten Regionen war es mit 3D-Spektren möglich die überlappenden Spinsysteme voneinander zu differenzieren. In Abbildung 27 sind Beispiele der, über die ¹⁵N-Dimension getrennten, Zuordnungen der Alanine abgebildet. Die vormals stark überlappenden Alanin Signale konnten eindeutig identifiziert werden. Für die Zuordnung in stark überlappenden Regionen konnten so nur die Spinsysteme identifiziert werden, die durch die ¹⁵N-Dimension getrennt wurden. Da Glycine keine weiteren Seitenketten-Kohlenstoffe besitzen wurden nur Glycin-Spinsysteme identifiziert, die auch eindeutig eine CO'-Kreuzkorrelation zeigen. Da ausschließlich Glycine im Bereich der ¹⁵N-Verschiebung von ~110 ppm auftreten, war es möglich für diese auch die CO'-Kreuzkorrelationen zuzuordnen. So war es möglich für die meisten Aminosäuren einzelne Spinsysteme zu ermitteln (Tabelle S 1). Einzig die Serine konnten ohne die 3D-Spektren, aufgrund ihrer guten Signaldispersion,

zugeordnet werden. Prolin bildete eine weitere Ausnahme, da diese keine Korrelationssignale in den N_{Ca}C_x/N_{Ca}C_b Spektren zeigen. Somit war es nicht möglich einzelne Prolin Spinsysteme zu identifizieren. Für Cystein und Tryptophan konnten keine Spinsysteme identifiziert werden. Bei den Cysteinen, die als Seitenkette nur ein C_β besitzen, fallen die Korrelationssignale entweder in dieselbe Region wie z.B. Gln und Glu, wenn sie reduziert sind, oder aber in die Region von Asn/Asp und Leu, wenn sie oxidiert sind. Ähnlich der in Kapitel 4.1.7 beschriebenen Fibrillen, konnten auch hier keine Tryptophan Korrelationssignale zwischen C_α/C_γ sowie C_β/C_γ, die spezifisch für diese Aminosäure sind, identifiziert werden.

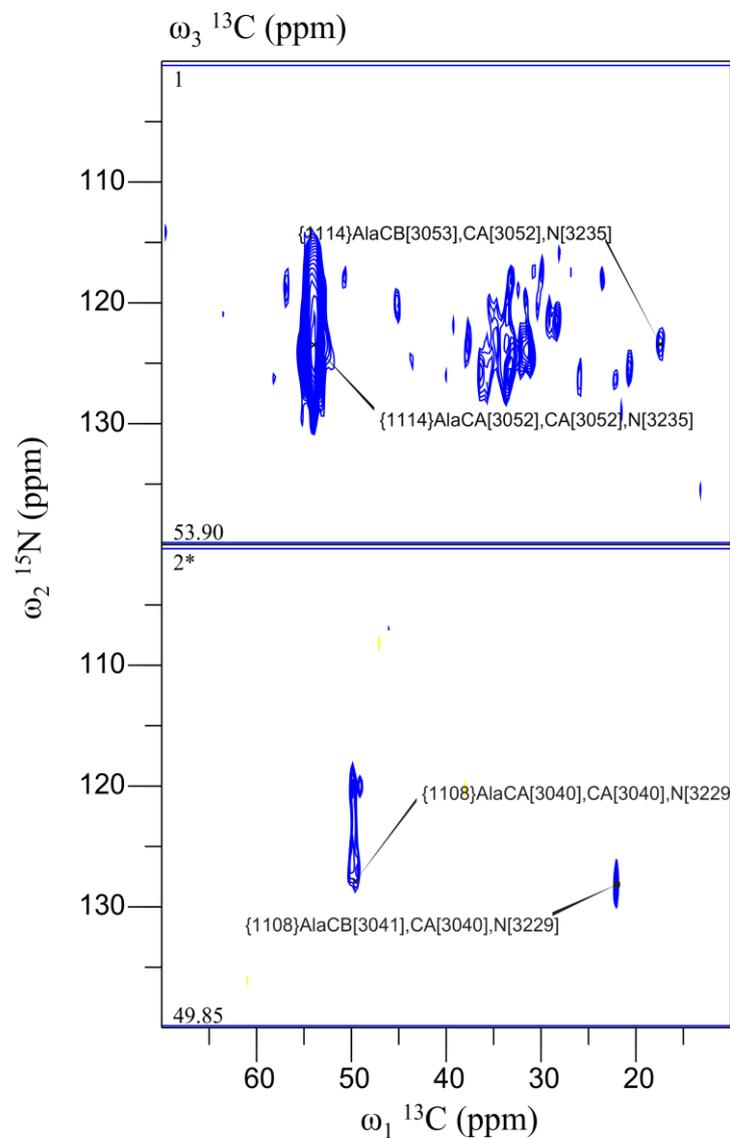


Abbildung 27: Streifen Darstellung der spezifischen Zuordnung der Alanine der ersten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen.

3D-N_{Ca}C_x (DARR) 80 ms Spektren zeigen die ^{15}N - ^{13}C -Dimensionen in den jeweiligen ^{13}C -Ebenen der vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Fibrillen der ersten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen. Das Spektrum wurde bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 11 kHz und einer Temperatur von $10 \text{ } ^\circ\text{C} \pm 5 \text{ } ^\circ\text{C}$ aufgenommen. Das Spektrum wurde in allen drei Dimensionen mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,5 prozessiert.

Die so zugeordneten Spinsysteme umfassen 9 Alanine, 2 Arginine, 8 Asparagine/Aspartate, 7 Glutamine/Glutamate, 20 Glycine, 5 Histidine, 4 Isoleucin, 3 Leucine, 2 Lysine, 4 Methionine, 7 Serine, 7 Threonine, 7 Phenylalanine/Tyrosine und 14 Valine (Tabelle S 1). Eine Differenzierung zwischen Asparagin und Aspartat, Glutamin und Glutamat sowie Phenylalanin und Tyrosin konnte aufgrund der ähnlichen chemischen Verschiebungen, nicht getroffen werden. Da sowohl Asparagin/Aspartat als auch Phenylalanin/Tyrosin und Leucin ähnliche $C\alpha$ und $C\beta$ Verschiebungen aufweisen, ist aufgrund der vorhandenen Informationen nicht auszuschließen, dass einige Resonanzen vertauscht sein könnten. In Abbildung 28 sind für jede Aminosäure die über die 2D- und 3D-Spektren identifiziert werden konnte, je eine Zuordnung der Seitenketten beispielhaft dargestellt

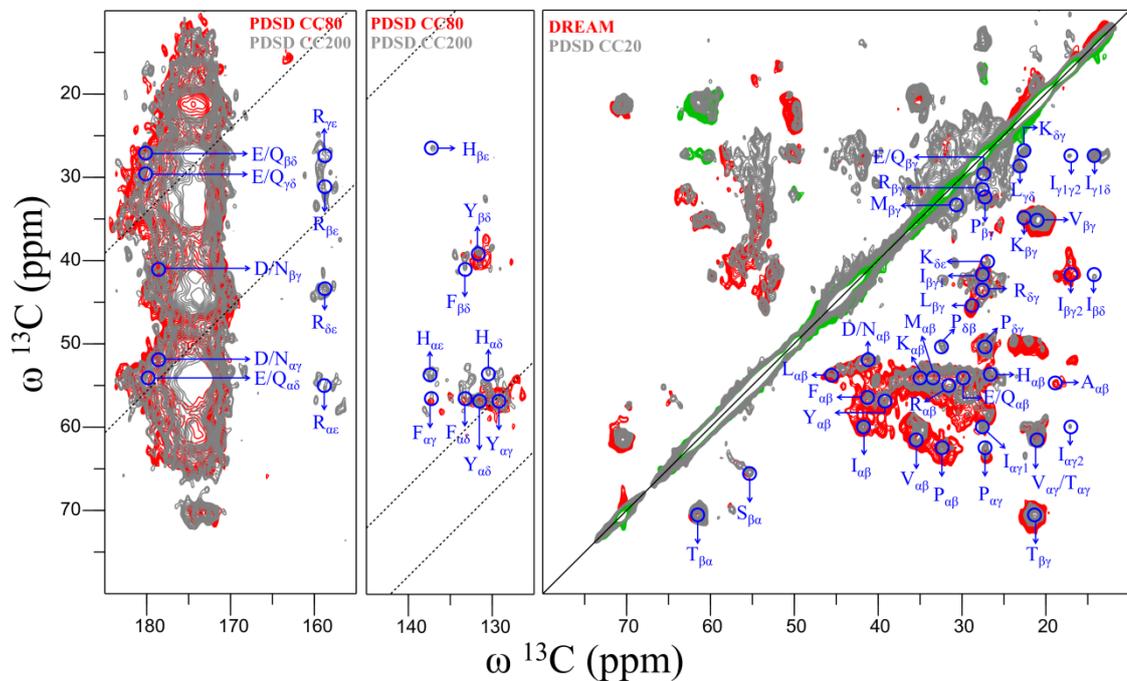


Abbildung 28: 2D- $^{13}\text{C}/^{13}\text{C}$ -Korrelationspektren der ersten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen.

Rechts: PDS-D Spektrum mit 50 ms Mischzeit (grau) und DREAM Spektrum (rot/grün). **Alle anderen:** PDS-D Spektrum mit jeweils 80 ms (rot) und 200 ms (grau) Mischzeit. Beispiel Darstellung der aufgrund von 2D- und 3D-Spektren identifizierten Spinsysteme. PDS-D Spektren wurden bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 11 kHz, DREAM Spektrum bei 22 kHz und einer Temperatur von jeweils $10\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen. Alle Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,25prozessiert.

Anhand der chemischen Verschiebung der $C\alpha$ und $C\beta$ ist es möglich, die sekundäre chemische Verschiebung, wie in Kapitel 3.17 beschrieben, zu berechnen. Die sekundäre chemische Verschiebung beschreibt, in welcher sekundär strukturellen Lage sich die jeweilige Aminosäure befindet. Anhand der zugeordneten Spinsysteme war es möglich, die in Abbildung 29 dargestellten sekundär chemischen Verschiebungen zu berechnen. Da, wie oben beschrieben die Aminosäuren Asparagin/Aspartat, Glutamin/Glutamat

und Phenylalanin/Tyrosin (jeweils schwarz/rot) nicht voneinander unterschieden werden können, sind für jeweils beide die sekundär chemischen Verschiebungen aufgetragen.

Anhand des Wertes der sekundären chemischen Verschiebung kann auf die Tendenz der strukturellen Umgebung der jeweiligen Aminosäure geschlossen werden. Positive sekundäre chemische Verschiebungen ($\Delta\delta$) deuten in Richtung α -Helix, negative in Richtung β -Faltblatt. Jedoch können diese Werte nur als Anhaltspunkt dienen, da die tatsächliche Sekundärstruktur nur anhand ganzer Elemente eines Proteins bestimmt werden kann. Die überwiegende Anzahl der vorläufig zugeordneten Aminosäuren tendiert in Richtung β -Faltblatt Konformation, ein nur geringer Teil der Aminosäuren in Richtung α -helikale Konformationen.

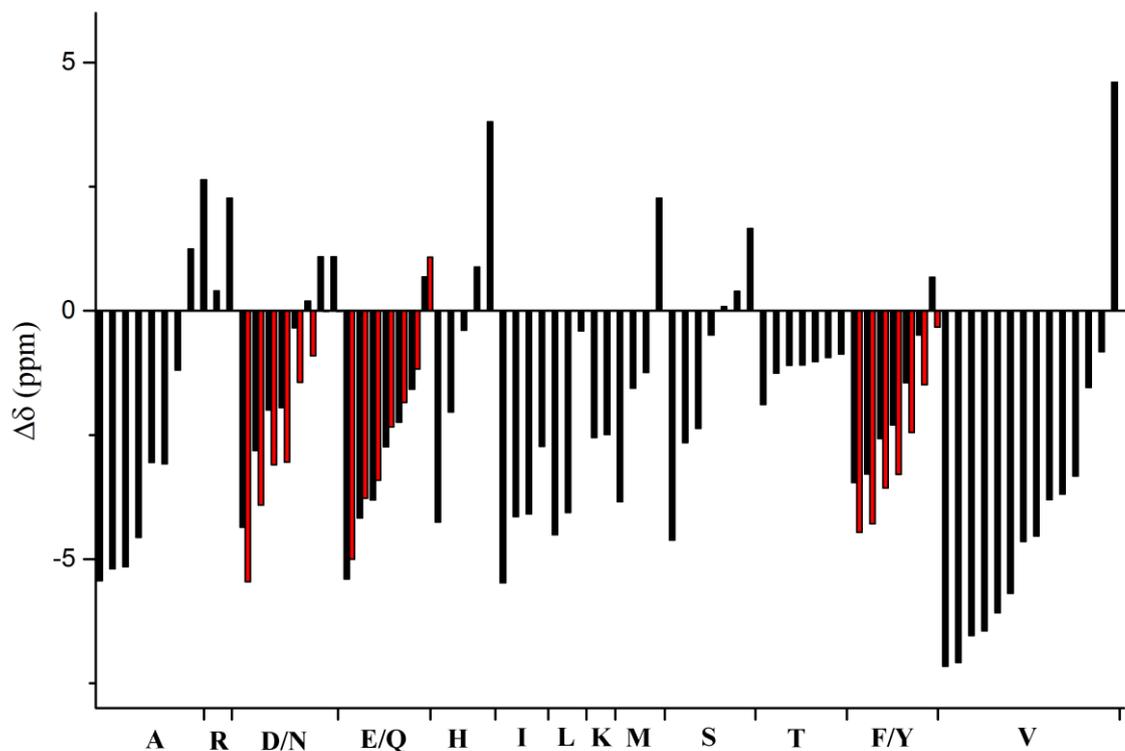


Abbildung 29: Sekundär chemische Verschiebungen der identifizierten Spinsysteme der ersten Generation Keim-induzierte Prion-Fibrillen

Die sekundär chemischen Verschiebungen wurden durch $\Delta\delta = \delta^{13}\text{C}\alpha - \delta^{13}\text{C}\beta$ mit $\delta^{13}\text{C}\alpha = {}^{13}\text{C}\alpha_{(\text{exp})} - {}^{13}\text{C}\alpha_{(\text{rc})}$ und $\delta^{13}\text{C}\beta = {}^{13}\text{C}\beta_{(\text{exp})} - {}^{13}\text{C}\beta_{(\text{rc})}$ berechnet. Random Coil Werte wurden aus Wishart et al. [133] entnommen. Rote/Schwarze Balken zeigen jeweils die sekundär chemischen Verschiebungen von D/N, E/Q bzw. F/Y, da anhand der chemischen Verschiebungen nicht zwischen den jeweiligen Aminosäuren differenziert werden konnte

In Abbildung 31 sind die PDS (20 ms) Spektren der *de novo* generierten Prion-Fibrillen (rot) und die Prion-Fibrillen der ersten Generation (schwarz) vergleichend abgebildet. Die beiden Spektren ähneln sich zum größten Teil. So sind die Finger-Print Regionen von Threonin (rc/ β -Faltblatt), Serin (rc), Isoleucin (β -Faltblatt), Tyrosin/Phenylalanin (β -Faltblatt), Valin (β -Faltblatt), Aspartat/Asparagin (β -Faltblatt)

als auch der Proline ähnlich. Auch die Seitenkettenbereiche von Isoleucin, Leucin, Lysin, Argenin, Valin und Threonin sind ähnlich. Unterschiede sind in den Bereichen Serin (β -Faltblatt), Alanin (β -Faltblatt), Alanin (α -Helix) und Alanin (α -Helix), sowie einem separierten Threonin (β -Faltblatt) zu sehen. Der Bereich der Alanine unterscheidet sich zwischen den beiden Prion-Fibrillen am stärksten. So sind die β -Faltblatt und Random Coil Alanine zum Teil sehr weit verschoben, die α -Helix Alanine der ersten Generation zeigen nur ein sehr geringes S/N-Verhältnis. Des Weiteren zeigt die erste Generation, wie auch schon die de novo generierten Prion-Fibrillen, Unterschiedliche Signalintensitäten zwischen den α -Helix und β -Faltblatt Alanine, abhängig vom verwendeten Spektrum. So sind keine Alanine in dem PDS D Spektrum zu sehen, im DREAM Spektrum ist jedoch das Verhältnis zwischen α -Helix und β -Faltblatt Alanine 1:2 (siehe Abbildung 30). Die erste Generation zeigt darüber hinaus mehr Signale im Bereich der β -Faltblatt Serine und ein prominentes β -Faltblatt Threonin. Im Bereich der Seitenketten unterscheiden sich die beiden Prion Proben vornehmlich in der Region der $C\beta/C\gamma$ Korrelationen der Proline. Diese Signale der Prion-Fibrillen der ersten Generation zeigen ein sehr schwaches S/N-Verhältnis. Des Weiteren sind nur geringe Unterschiede in der chemischen Verschiebung einzelner Peaks bzw. Bereiche zu erkennen.

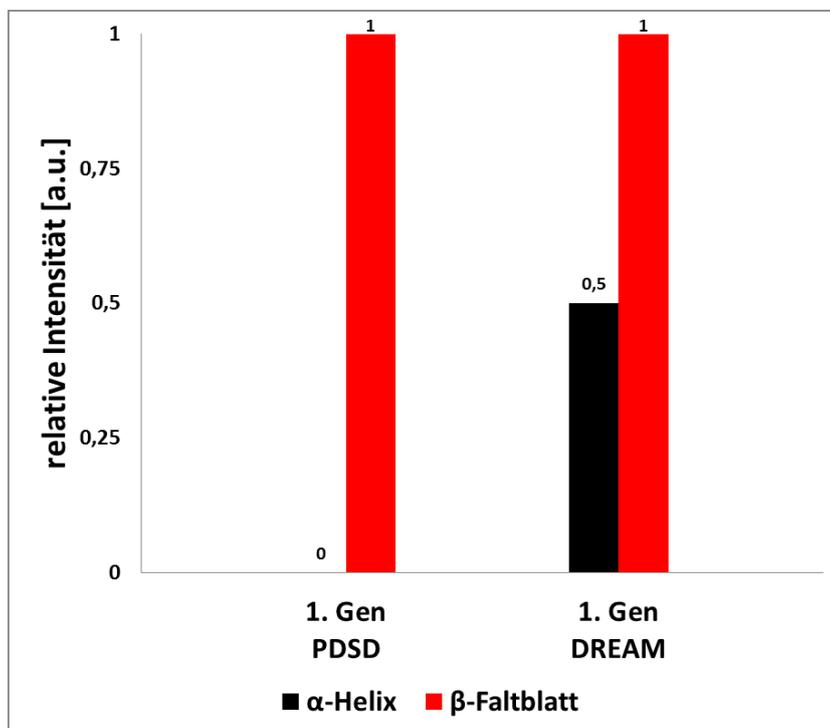


Abbildung 30: Vergleich der relativen Signalintensitäten zwischen α -Helix und β -Faltblatt Alanine. Die relativen Intensitäten wurden auf die größte Intensität der jeweiligen Region im jeweiligen Spektrum referenziert. Schwarz: α -Helix Alanine. Rot: β -Faltblatt Alanine.

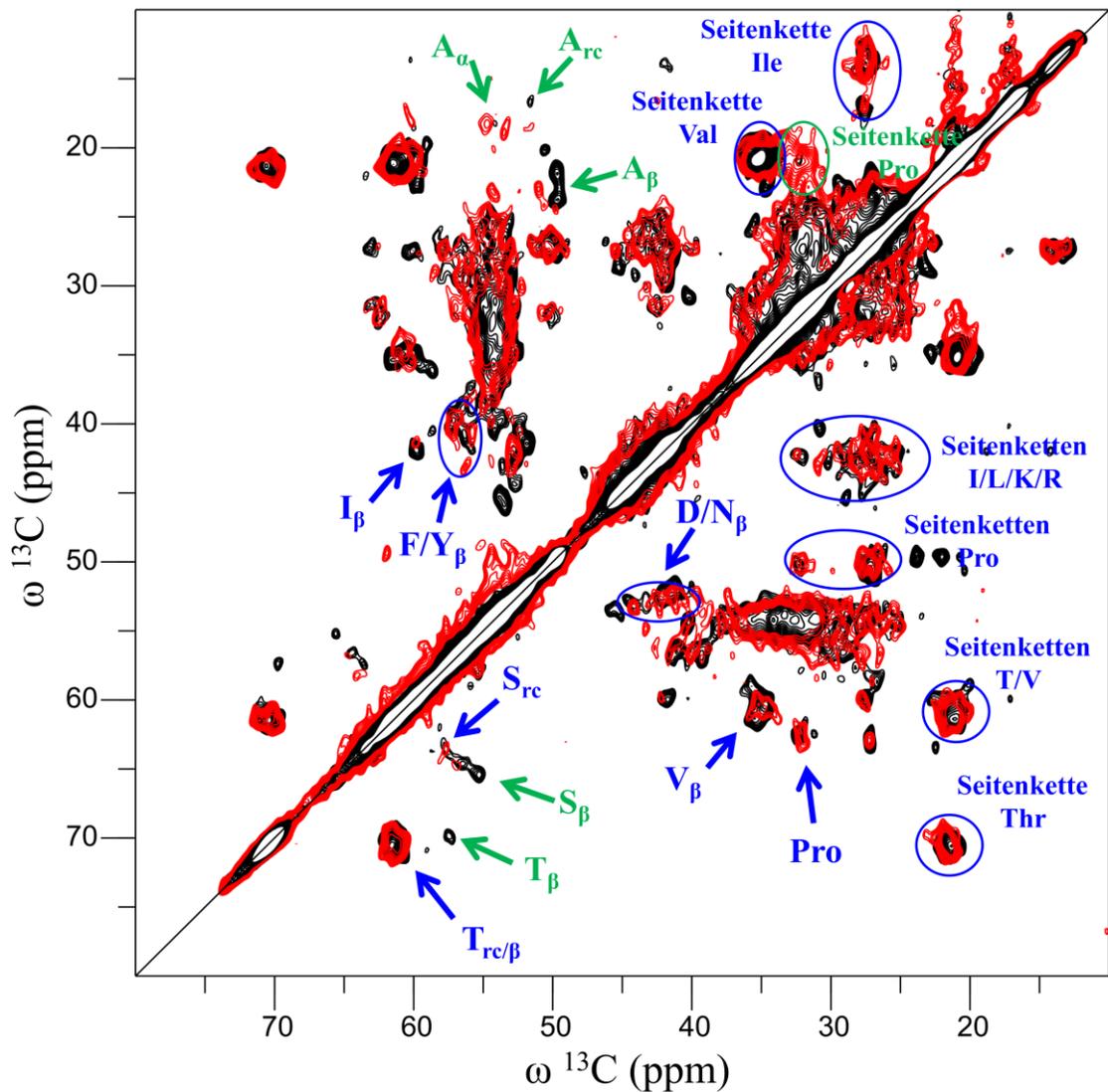


Abbildung 31: Vergleich der PDS-Spektren zwischen den *de novo* hergestellten Prion-Fibrillen und der ersten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen

Rot: PDS Spektrum mit 20 ms Mischzeit der *de novo* generierten Prion-Fibrillen, Schwarz: PDS Spektrum mit 20 ms Mischzeit der ersten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen. PDS Spektren wurden bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 11 kHz und einer Temperatur von jeweils $10\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen. Alle Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,25 prozessiert. Indizes: rc = Random Coil (Unstrukturiert), α = α -Helix, β = β -Faltblatt.

4.3.2. Die erste Generation Keim-induzierter (seeded) Prion-Fibrillen zeigt strukturelle Heterogenität mit Ähnlichkeiten zu den *de novo* generierten Prion-Fibrillen

Die untersuchte erste Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen konnten durch die Verwendung verschiedener 2D- und 3D-Spektren nur zum Teil analysiert werden. Dies lag in erster Linie daran, dass aufgrund der schlechten Signaldispersion kaum aufgelöste Peaks in den 2D-Spektren zu sehen waren. Im weiteren Verlauf war es durch 3D-Spektren möglich einige dieser hoch populierte Regionen aufzulösen. Dieses war aber nur begrenzt möglich, vornehmlich in den separierten Regionen einzelner Aminosäuren wie z.B. Alanin, Isoleucin, Valin oder Threonin. Da der N-Terminus, wie oben besprochen, aufgrund fehlender Tryptophan Korrelationssignale nicht sichtbar für die Festkörper-NMR-Spektroskopie ist, wird hier davon ausgegangen das alle sichtbaren Signale von dem C-Terminus ~103-233 stammen (letztes Tryptophan an Position 102). Die Anzahl der meisten zugeordneten Aminosäuren beläuft sich auf nicht mehr als den einfachen Datensatz möglicher Zuordnungen für den C-Terminus ab Aminosäure 103. Jedoch konnten für die separierten Aminosäuren Glycin, Serin und Valin mehr als der einfache aber weniger als der zweifache Datensatz vorläufig zugeordnet werden. Es ist auch nicht auszuschließen, dass für weitere Aminosäuren mehr Spinsysteme zugeordnet werden könnten. Aufgrund der Linienbreiten von teilweise 3 ppm in der ^{15}N -Dimension können viele hoch populierte Regionen jedoch nicht vollständig aufgelöst werden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Struktur der ersten Generation der Prion-Fibrillen zumindest partiell heterogen ist. Auch die oben besprochenen Ergebnisse des PK-Verdau, der zu zwei partiellen PK-resistente Fragmenten führt, deuten auf eine strukturelle Heterogenität hin. Jedoch kann daraus nicht eindeutig geschlossen werden, im welchen Bereich sich diese beiden Fragmente unterscheiden. Möglich ist, dass der C-Terminus zwischen ~103 und ~140-150 unterschiedlich strukturiert sein könnte. Zum einen definieren die nicht vorhandenen Tryptophane den Anfang des sichtbaren N-Terminus, zum anderen deuten die Fragmentgrößen nach PK-Verdau auf ähnliche PK-resistente Bereiche im Bereich ab Aminosäure ~150. Betrachtet man weiterhin die Aminosäuren für die es möglich war, mehr als den einfachen Datensatz vorläufig zu identifizieren, so fällt auf, dass im Bereich zwischen 103-233 3 von 5 Serine zwischen 103-140 liegen. Daher ist zumindest davon auszugehen, dass der Bereich zwischen ~103 und ~140-150 eine strukturelle Heterogenität aufweist. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass dieser Bereich

eine höhere Mobilität aufweist, als der restliche C-Terminus, da das Verhältnis der α -Helix zu β -Faltblatt Alanine, abhängig vom Spektrum, unterschiedlich ist.

Der Vergleich zwischen den *de novo* generierten und Keim-induzierten Prion-Fibrillen zeigt eine hohe Ähnlichkeit zwischen den Strukturen. So zeigen NMR-Spektren beider Prion-Fibrillen eine hohe Anzahl von Aminosäuren in β -Faltblatt Konformation. Diese Aminosäureregionen sind sehr ähnlich zwischen den beiden Prion-Fibrillen, Unterschiede sind im Wesentlichen in den Regionen der Alanine, Serine und des einzelnen Threonins zu beobachten. Da die Alanine und Serine vornehmlich im Bereich unter 140 vorkommen, ist zu vermuten, dass auch der Unterschied zwischen den beiden Prion-Fibrillen zumindest in diesem Bereich vorliegt. Des Weiteren zeigen auch die Ergebnisse des PK-Verdaus unterschiedliche PK-resistente Fragmente zwischen den Prion-Fibrillen. Da die *de novo* generierten Prion-Fibrillen ein einzelnes ~ 17 kDa großes PK-resistentes Fragment besitzen, welches vermutlich den Bereich zwischen Aminosäuren ~ 90 -233 umfasst, muss es einen Unterschied zu den 12 kDa (~ 140 -233) und 11 kDa (~ 150 -233) großen Fragmenten der Keim-induzierten Fibrillen, zumindest im Bereich zwischen ~ 90 -140, geben.

Aufgrund der teilweisen schlechten Signaldispersion und den Linienbreiten von bis zu ~ 3 ppm in der ^{15}N -Dimension, konnten nur wenige Spinsysteme vorläufig identifiziert werden. In Folge dessen war es auch nicht möglich sequentielle Informationen zu erhalten. Jedoch war es zumindest möglich fest zu stellen, dass die erste Generation der Keim-induzierten Prion-Fibrillen:

1. strukturelle Heterogenität zeigen und
2. diese Heterogenität zumindest den Bereich N-terminal von Aminosäure 140 betrifft

Aber auch der Vergleich zu den *de novo* generierten Prion-Fibrillen deutet auf eine sehr ähnliche Struktur hin, mit Unterschieden ebenfalls mindestens im Bereich N-terminal von Aminosäure 140.

Für eine weitere detaillierte Analyse ist die Probenbeschaffenheit nicht ausreichend. Sowohl die schlechte Signaldispersion als auch die hohe Anzahl an Aminosäuren in der Prion Sequenz bzw. der (partiellen) Heterogenität der Strukturen führt zu schlecht aufgelösten Peaks und Linienbreiten von bis zu ~ 3 ppm Breite in der ^{15}N -Dimension. Ohne eine Verbesserung der Probenbeschaffenheit, ist eine weitere Analyse der Prion-

Fibrillen nahezu unmöglich. Als mögliche Verbesserungen würden mehrere Aspekte in Betracht kommen. Zum einen könnte die strukturelle Heterogenität durch das sog. „Repeated Seeding“, wie schon zuvor für A β -Fibrillen gezeigt wurde [113], verringert werden, zum anderen könnten verschiedene Markierungsschemata in Frage kommen. Diese Markierungsschemata könnten die spezifische Markierung von einzelnen Aminosäuretypen umfassen, aber auch fraktionelle Anreicherung von ^{13}C durch Verwendung von z.B. 1- ^{13}C -Glukose, 1,3- ^{13}C -Glycerin oder 2- ^{13}C -Glycerin als Nahrungsquelle der Bakterien zur Expression. Des Weiteren könnte durch eine Deuterierung des Proteins zum einen die ^1H -Dimension zur Detektion zugänglich gemacht werden, zum anderen würde auch die Linienbreite in der ^{15}N -Dimension verringert werden [153].

4.4. Die dritte Generation PrP^{Sc} induzierter amyloider ovrecPrP(MARQ) Fibrillen

Mit Hilfe des Repeated Seeding Protokolls wurden in dieser Arbeit amyloide ovrecPrP Fibrillen bis zur dritten Generation hergestellt. Die erste Generation beinhaltete nur eine Probe die einheitlich $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markiert wurde. Für die dritte Generation wurden weitere Markierungsschemata verwendet. Zum einem wurde die Standardprobe mit einheitlich $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markiertem Protein hergestellt, zum anderen mit Protein das $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markiert wurde.

4.4.1. Festkörper-NMR-spektroskopischer Vergleich zwischen der ersten und dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen

Für den Vergleich wurden unter ähnlichen Bedingungen aufgenommen Spektren verwendet. In Abbildung 33 sind 2D- ^{13}C - ^{13}C -DREAM Spektren der ersten und dritten Generation vergleichend dargestellt. Das Spektrum der dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen zeigt, ähnlich zu der ersten Generation eine schlechte

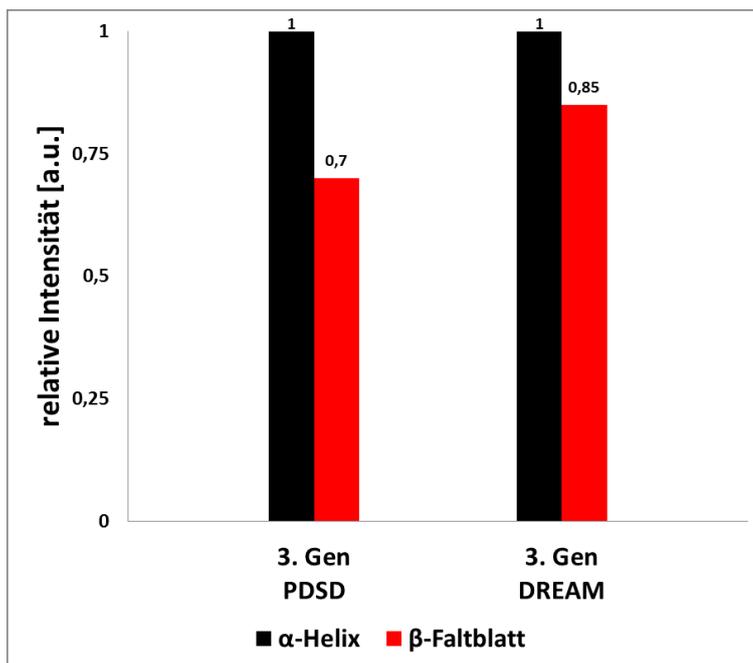


Abbildung 32: Vergleich der relativen Signalintensitäten zwischen α -Helix und β -Faltblatt Alanine.

Die relativen Intensitäten wurden auf die größte Intensität der jeweiligen Region im jeweiligen Spektrum referenziert. Schwarz: α -Helix Alanine. Rot: β -Faltblatt Alanine.

Signaldispersion. Die Regionen hoher Ähnlichkeit betrifft hauptsächlich Asparagin/Aspartat, Phenylalanin/Tyrosin, Isoleucin, Valin, Threonin, sowie die der β -Faltblatt Alanine. Abweichungen finden sich im Bereich der Proline, des einzelnen Threonin, sowie in der Region der α -Helix und Random Coil Alanine.

Die Random Coil Alanine können in den Spektren der

ersten Generation beobachtet werden. Auch bei der dritten Generation zeigen sich unterschiedliche Verhältnisse in den Signalintensitäten zwischen den α -Helix und β -Faltblatt Alanine abhängig vom Spektrum. Wie in Abbildung 32 zu sehen ist, ist das Verhältnis der Signalintensitäten im PSDS Spektrum zwischen α -Helix und β -Faltblatt

1:0,7, wohingegen im DREAM Spektrum das Verhältnis 1:0,85 beträgt. Das legt auch hier den Schluss nahe, dass der Bereich zwischen ~ 103 und ~ 140 bzw. ~ 150 hier ebenfalls eine höhere Mobilität aufweist als der restliche C-Terminus.

Anhand der vorliegenden Spektren ist ein erster grober Vergleich zwischen den beiden Generationen der Prion-Fibrillen möglich. Aufgrund der Analyse der PK-resistenten Fragmente in Kapitel 4.2.3 konnte schon festgestellt werden, dass die Struktur zwischen den Generationen nicht weiter vererbt wird. Jedoch zeigen die NMR-Spektren viele Ähnlichkeiten zwischen der ersten und dritten Generation. So sind die meisten Bereiche von Aminosäuren, die tendenziell in β -Faltblatt Konformation vorliegen, wie z.B. Isoleucin, Threonin oder Valin, ähnlich bzw. identisch. Diese β -Faltblatt Regionen bilden wahrscheinlich den Amyloid-Kern. Die Unterschiede zwischen den beiden Generationen betrifft hauptsächlich die Aminosäuren, die nicht in dem vermuteten Amyloid-Kern zwischen $\sim 140/150$ -233 liegen. So liegen die Unterschiede vornehmlich in den beobachtbaren Korrelationssignalen der β -Faltblatt Serine, der Random Coil und der α -helikalen Alanine.

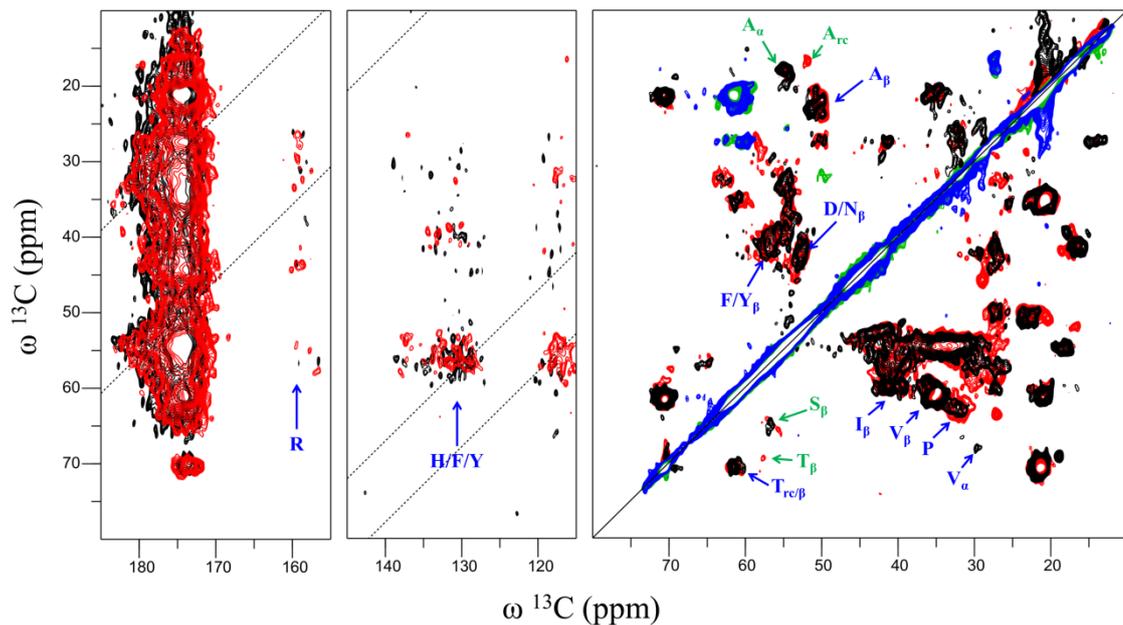


Abbildung 33: Vergleich der Spektren zwischen den vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Prion-Fibrillen der ersten und dritten Generation.

Rechts: DREAM Spektrum der erste Generation vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierter Keim-induzierter Prion-Fibrillen (rot), DREAM Spektrum der dritten Generation vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierter Keim-induzierter Prion-Fibrillen (schwarz). **Alle anderen:** PDS Spektrum mit 200 ms Mischzeit der vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Fibrillen der ersten Generation (rot). PDS Spektrum mit 200 ms Mischzeit der vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Fibrillen der dritten Generation (schwarz). PDS Spektren wurden bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 11 kHz und einer Temperatur von jeweils $10\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen. DREAM Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,25 prozessiert, PDS Spektren mit einem Offset von 0,5. Indizes: rc = Random Coil (Unstrukturiert), α = α -Helix, β = β -Faltblatt.

Des Weiteren unterscheiden sich die beiden Generationen teilweise in den beobachtbaren Seitenkettenkorrelationen. So sind mehr Signale in der ersten Generation zu beobachten als in der dritten.

Der Unterschied von beobachtbaren Korrelationssignalen muss nicht unbedingt durch verschiedene Strukturen bedingt sein, auch ist hier ein unterschiedlicher Wassergehalt der Probe möglich. Während in einer trockenen Probe die mobilen Anteile gering sind, können in einer nassen Probe mehr mobile Anteile vorhanden sein. Das führt dazu, dass in nassen Proben die Dynamik dieser Anteile in einen Bereich fallen können der außerhalb der NMR-Zeitskala liegt und somit zu einer Austausch-Linienverbreiterung führt. Ergänzend zu den Analysen der partiellen PK-Resistenz konnte mit Hilfe der Festkörper-NMR-Spektroskopie gezeigt werden, dass die beiden Generationen der Prion-Fibrillen strukturell ähnlich bzw. identisch sein müssen und die Unterschiede in den flexibleren Bereichen außerhalb des Amyloid-Kerns liegen müssen.

4.4.2. Zusammenfassung der deuterierten und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Expression des ovrecPrP

Die hier beschriebenen Ergebnisse der deuterierten und $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Expression des ovrecPrP ist eine Zusammenfassung aus dem Manuskript „High yield Expression and Purification of fully labelled and deuterated Ovine Recombinant Prion Protein“ (siehe Anhang).

In den voran gegangenen Kapiteln wurde schon herausgestellt, dass die Analyse der Festkörper-NMR-Spektren aufgrund der Linienbreiten, vor allem in der ^{15}N -Dimension, erschwert bzw. unmöglich ist. Eine Herangehensweise um die Linienbreiten zu verringern, ist die Deuterierung der jeweiligen Proteine. Dies bringt den Vorteil, dass die ^1H -Dimension als weitere messbare Dimension zugänglich wird. Im Zuge dieser Arbeit wurde ein Expressions- und Aufreinigungsprotokoll etabliert mit welchem es möglich ist, $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markiertes ovrecPrP mit einem Anreicherungsgrad der verwendeten Isotope von >99 % und einer Reinheit von >95 % herzustellen. Im Vergleich zu dem zuvor verwendeten Protokoll, mit welchem es möglich war $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markiertes ovrecPrP in Mengen von ~5 mg pro Liter Kulturmedium herzustellen, kann mit diesem Protokoll dreifach markiertes Protein in Mengen von ~40 mg pro Liter Kulturmedium hergestellt werden.

Mit Hilfe von Massenspektroskopie konnte gezeigt werden, dass es sich um das ovrecPrP Protein handelt und das es ein Anreicherungsgrad der verwendeten Isotope von >99 % hat. Mit Hilfe von Flüssig-NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass

eine spezifische Rückfaltung des ovrecPrP nicht nötig ist, da das getrocknete ovrecPrP durch Lösung in 10 mM NaOAc Puffer mit einem pH-Wert von 5,0 spontan in seine native Konformation übergeht. Dadurch ist es auch möglich, dass ovrecPrP in dem Puffer mit der gewünschten H/D-Zusammensetzung zu lösen. Die Flüssig-NMR-Spektroskopie Ergebnisse konnte auch zeigen, dass der H/D-Austausch schneller als die Rückfaltung sein muss. T_2 -Relaxationszeit Messungen der entsprechenden Fibrillen konnten eine Verbesserung der Relaxationszeit der ^{15}N -Kerne um bis zu 50 % und die der ^{13}C -Kerne um bis zu 70 % zeigen. Schlussendlich konnten erste Festkörper-NMR-Spektroskopie Untersuchungen zeigen, dass ein H/D-Verhältnis von 30:70 ausreichend ist, um bei einer MAS Geschwindigkeit von 24 kHz die Protonen nicht mehr entkoppeln zu müssen.

4.4.3. Festkörper-NMR-spektroskopischer Vergleich zwischen den $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ und $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation

Die vergleichende Überlagerung der einheitlich und dreifach markierten Fibrillen der dritten Generation ist in Abbildung 34 (^{13}C - ^{13}C -Korrelation) und Abbildung 35 (^{13}C - ^{15}N -Korrelation) dargestellt. Die Spektren der ^{13}C - ^{13}C -Korrelationsexperimente sind sehr ähnlich zueinander, mit der Ausnahme dass die Signale der dreifach markierten Fibrillen zu niedrigeren Verschiebungen verschoben sind. Die $\text{C}\alpha$ -Signale sind durchschnittlich um -1 ppm, die $\text{C}\beta$ -Signale um -0,5 ppm verschoben. Für diese Verschiebung ist der Deuterium Isotopen Effekt (DIE) verantwortlich. Bax und Mitarbeiter konnten für das intrinsisch unstrukturierte α -Synuclein bereits zeigen, in wie weit sich die ^{13}C und ^{15}N Verschiebungen durch den DIE verändern [154]. So variiert die $^{13}\text{C}^\alpha$ Verschiebung zwischen -390 ppt für Asparagin und Aspartat, und -510 ppt für Val. Die $^{13}\text{C}^\beta$ Veränderung kann sogar noch größer sein mit -510 ppt für Thr, bis hin zu 1,1 ppm, für Leucin. Die ^{13}C Linienbreiten sind durchgehend gleich oder schmalere als für die einheitlich markierten Fibrillen. Anders für die Linienbreite in der ^{15}N -Dimension. Wie in Kapitel 4.4.2 beschrieben ist die T_2 -Relaxation der ^{15}N -Kerne der dreifach markierten Fibrillen wesentlich länger als bei den einheitlich markierten Fibrillen. Das spiegelt sich auch in den ^{13}C - ^{15}N -Korrelationspektren wieder. Wie in den 2D- ^{13}C - ^{15}N Spektren in Abbildung 35 zu sehen ist, ist die Auflösung wesentlich besser mit Linienbreiten von $\sim 1,5$ ppm oder geringer. Wie schon für den Vergleich der ersten und dritten Generation besprochen kann davon ausgegangen werden, dass auch hier die beiden Prion-Fibrillen der dritten Generation eine ähnliche Struktur des Amyloid-Kerns aufweisen und sich die Unterschiede auf den Bereich außerhalb des Amyloid-Kerns

beschränken. Da die dreifach markierten Prion-Fibrillen bessere Auflösung der Peaks, vor allem in der ^{15}N -Dimension, bieten wurde im weiteren Verlauf der Arbeit diese verwendet.

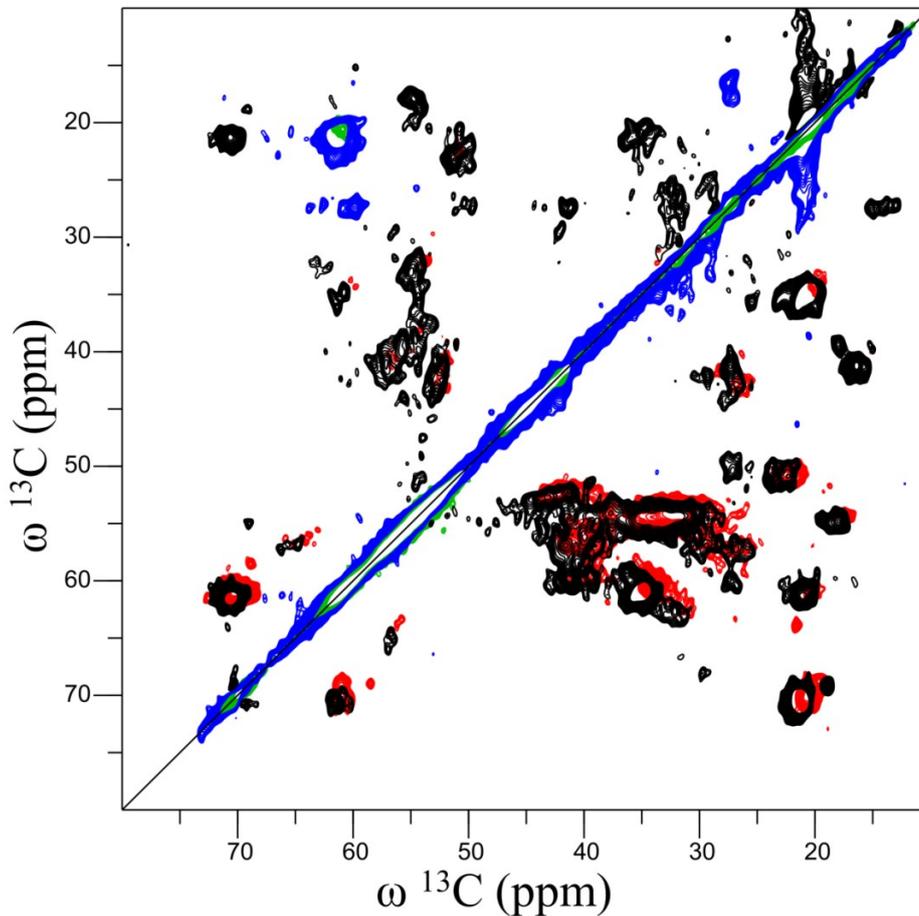


Abbildung 34: Vergleich der DREAM-Spektren zwischen den vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten und dreifach markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen.

Rot/Grün: DREAM Spektrum der vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation, Schwarz/Blau: DREAM Spektrum der dreifach markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation. DREAM Spektren der vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Prion-Fibrillen wurden bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 22 kHz, DREAM Spektrum der dreifach markierten Prion-Fibrillen bei 24 kHz und einer Temperatur von jeweils $10\text{ }^\circ\text{C} \pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ aufgenommen. Alle Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,25 prozessiert.

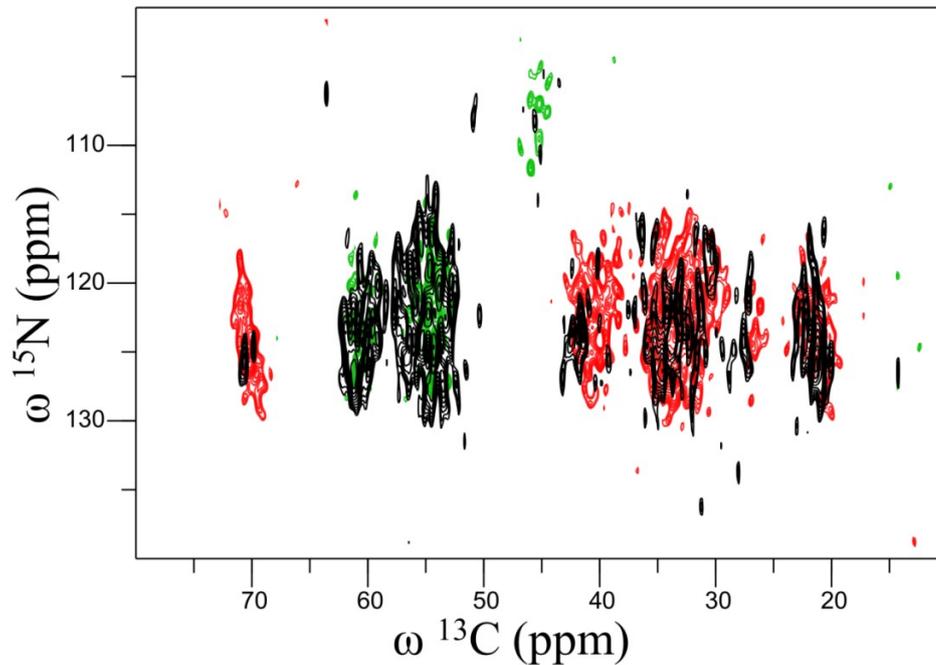


Abbildung 35: Vergleich der 2D-NCaCx-NCaCb-Spektren zwischen den vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten und dreifach markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen.

Schwarz: 2D-NCaCx (PDS) 50 ms Spektrum der vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation, Rot/Grün: DREAM Spektrum der dreifach markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation. 2D-NCaCx Spektren wurden bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 11 kHz, NCaCb-Spektren bei 24 kHz und einer Temperatur von jeweils $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen. Alle Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,25 in der ^{13}C - und 0,35 in der ^{15}N -Dimension prozessiert.

4.4.4. Identifikation aminosäurespezifischer Spinsysteme

Aufgrund der schlechten Signaldispersion war es nicht möglich, anhand von 2D-Korrelationsspektren, Spinsysteme eindeutig zu identifizieren. Jedoch konnte diese für die Zuordnung der Regionen der jeweiligen Aminosäuren verwendet werden. Ausgehend von den zugeordneten Regionen war es mit 3D-Spektren möglich die überlappenden Spinsysteme teilweise voneinander zu differenzieren. Für die Zuordnung in stark überlappenden Regionen konnten so nur die Spinsysteme identifiziert werden, die durch die ^{15}N -Dimension getrennt wurden. So war es möglich für die meisten Aminosäuren einzelne Spinsysteme zuzuordnen. Einzig die Serine und zwei separierte und stark α -helikale Valine konnten ohne die 3D-Spektren, aufgrund ihrer guten Signaldispersion, zugeordnet werden. Prolin bildete eine weitere Ausnahme, da diese keine Korrelationssignale in den verwendeten NCaCb Spektren zeigen. Somit war es nicht möglich einzelne Prolin Spinsysteme zu identifizieren. Die so vorläufig zugeordneten Spinsysteme sind in Tabelle S 2 aufgeführt. Eine Differenzierung zwischen Asparagin und Aspartat, Glutamin und Glutamat, sowie Phenylalanin und Tyrosin konnte aufgrund der ähnlichen chemischen Verschiebungen, nicht getroffen

werden. Ausnahmen bilden die über die sequentielle Zuordnung identifizierten Aminosäuren (siehe Kapitel 4.4.5). Da sowohl Asparagin/Aspartat als auch Tyrosin/Phenylalanin und Leucin ähnliche $C\alpha$ und $C\beta$ Verschiebungen aufweisen ist aufgrund der vorhandenen Informationen nicht auszuschließen, dass einige Resonanzen vertauscht sein könnten. Ähnlich der in Kapitel 4.1.7 und 4.3.1 beschriebenen Fibrillen, konnten auch hier keine Tryptophan Korrelationssignale zwischen $C\alpha/C\gamma$ identifiziert werden. Zur Verifizierung der Hypothese, dass nur der C-terminale Bereich ab Aminosäure ~103 für die Festkörper-NMR-Spektroskopie sichtbar ist, wurden die dreifach markierten Fibrillen der dritten Generation in zwei Proben geteilt. Die eine wurde mit einem H/D-Verhältnis von 30:70 gewaschen, die andere mit 100 % Deuterium. Ausgehend von der Annahme, dass der N-Terminus flexibel bzw. unstrukturiert ist, sollte ein H/D-Austausch in dieser Region stattfinden können, jedoch nicht in der strukturierten Region. Dementsprechend, wenn ursprünglich das ganze Protein zu sehen ist, sollte im Falle der Fibrillen die mit 100 % D_2O gewaschen wurden, weniger Signale zu sehen sein. In Abbildung 36 sind 2D-DREAM Spektren (rot: H/D 30:70, schwarz: H/D 0:100) der beiden Proben, die unter identischen Bedingungen aufgenommen wurden, dargestellt. Beide Spektren sind bis auf einige Ausnahmen identisch. Überraschenderweise sind mehr Signale im Spektrum der Fibrillen zu sehen die mit 100 % Deuterium gewaschen wurden. Im Einzelnen sind es die Signale von α -helikalen Ala ($C\alpha/C\beta$) und Val ($C\alpha/C\beta$), der nicht eindeutigen Region von α -helikalen Arg/Gln/Glu/His ($C\alpha/C\beta$), sowie die Random Coil Ile ($C\alpha/C\beta$), Ser ($C\alpha/C\beta$), Pro ($C\alpha/C\beta$) und Pro_{trans} ($C\delta/C\gamma$). Zwar bestehen Unterschiede zwischen den beiden Prion-Fibrillen Proben, jedoch beschränken sich diese auf beobachtbare Signale und nicht auf verschobene Peaks. Wie für die anderen Prion-Fibrillen schon besprochen, kann die Anzahl der beobachtbaren Peaks abhängig vom Wassergehalt einer Probe stark variieren. Da beide Proben ursprünglich aus derselben Fibrillogenese stammen und nur mit unterschiedlichen H/D-Zusammensetzungen gewaschen wurden kann davon ausgegangen werden, dass beide Prion-Fibrillen von identischer Struktur sind.

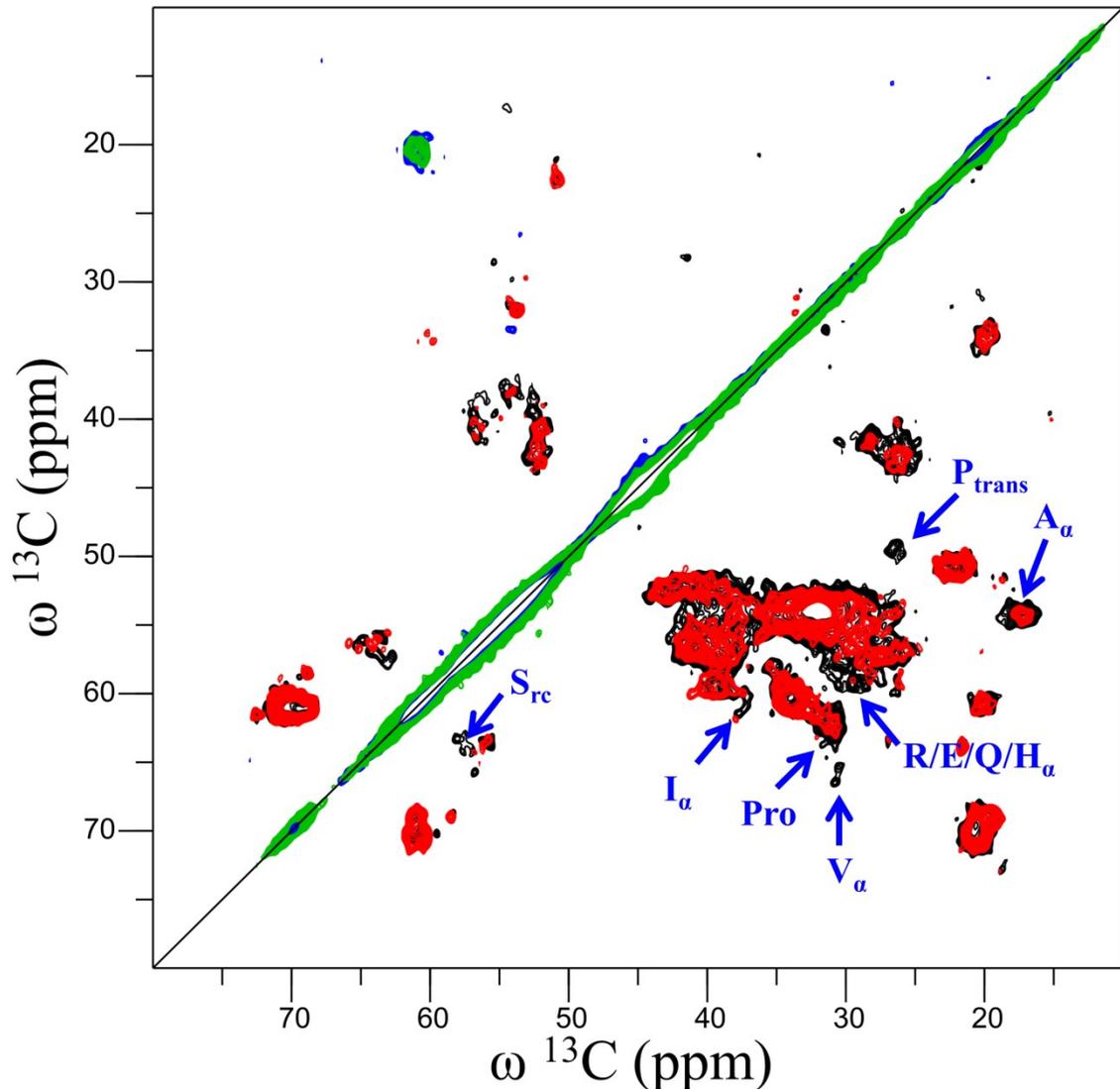


Abbildung 36: Vergleich der DREAM-Spektren zwischen den dreifach markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen.

Rot/Grün: DREAM Spektrum der dreifach markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation die mit Wasser mit einem H/D-Verhältnis von 30:70 gewaschen wurden, Schwarz/Blau: DREAM Spektrum der dreifach markierten Prion-Fibrillen der dritten Generation die mit 100 % D₂O gewaschen wurden. DREAM Spektren wurden bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 24 kHz und einer Temperatur von jeweils 10 °C ± 5 °C aufgenommen. Alle Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,25 prozessiert. Indizes: rc = Random Coil (Unstrukturiert), α = α-Helix, β = β-Faltblatt.

4.4.5. Sequentielle Zuordnungen der dritten Fibrillen Generation

Eine sequentielle Zuordnung der Spinsysteme ist ein essentieller Schritt zur Erlangung struktureller Informationen. Aufbauend auf der Identifizierung der Spinsysteme einzelner Aminosäuren war es möglich sequentielle Informationen zu erhalten. Wie im vorherigen Kapitel festgestellt wurde, wird davon ausgegangen, dass die Struktur der beiden Prion-Fibrillen identisch ist. Aufgrund der Linienbreiten von ~1 ppm in den ¹³C-Dimensionen und ~1,5 ppm in der ¹⁵N-Dimension werden Abweichungen von 0,5 ppm für ¹³C-Signale bzw. 0,75 ppm für ¹⁵N-Signale zwischen den verschiedenen Spektren toleriert. Für den Beginn der sequentiellen Zuordnung wurde nachfolgendes bedacht.

Durch die bisherigen Erkenntnisse über die Heterogenität der Prion-Fibrillen, welche zumindest bis ~140 von unterschiedlicher Struktur sein können, ist dieser Bereich durch seine Heterogenität nachteilig für die sequentielle Zuordnung. Des Weiteren sollten vornehmlich alle Aminosäuren zuerst vernachlässigt werden, die nicht im NCaCb-Spektren beobachtet werden konnte. Dies ist, aufgrund ihrer Mobilität, bei allen Serinen und Prolinen der Fall. Des Weiteren sollten auch alle Aminosäuren zuerst vernachlässigt werden die stark überlappend sind bzw. bei denen nur wenige Spinsysteme identifiziert werden konnten. Diese umfassen Arg, Glu/Gln, His, Lys, Met und Leu. Für den Beginn der sequentiellen Zuordnung werden Regionen in der ovrecPrP Sequenz verwendet, die die oben genannten Voraussetzungen mitbringen und die mindestens vier unterschiedliche aufeinanderfolgende Aminosäuren besitzen. Diese Voraussetzungen erfüllen folgende Sequenzbereiche des ovrecPrPs:

- 144-FGNDY-148
- 183-VNITV-187

Die sequentielle Zuordnung wurde an den jeweiligen letzten Aminosäuren begonnen. Jedes der zu der jeweiligen Aminosäure passendes Spinsystem wurde auf eine Verbindung zu der vorangehenden Aminosäure überprüft. Folgend wurde für jedes so gefundene Spinsystem wieder jedes mögliche Spinsystem überprüft, welches als möglicher Vorgänger in Frage kommen könnte. Wurden so mindestens vier aufeinander folgende Spinsysteme identifiziert, wurden diese als mögliche sequentielle Zuordnung gewertet. In Abbildung 37 und Abbildung 38 sind die wahrscheinlichsten sequentiellen Zuordnungen dargestellt, in Tabelle 14 und Tabelle 15 die dazugehörigen chemischen Verschiebungen.

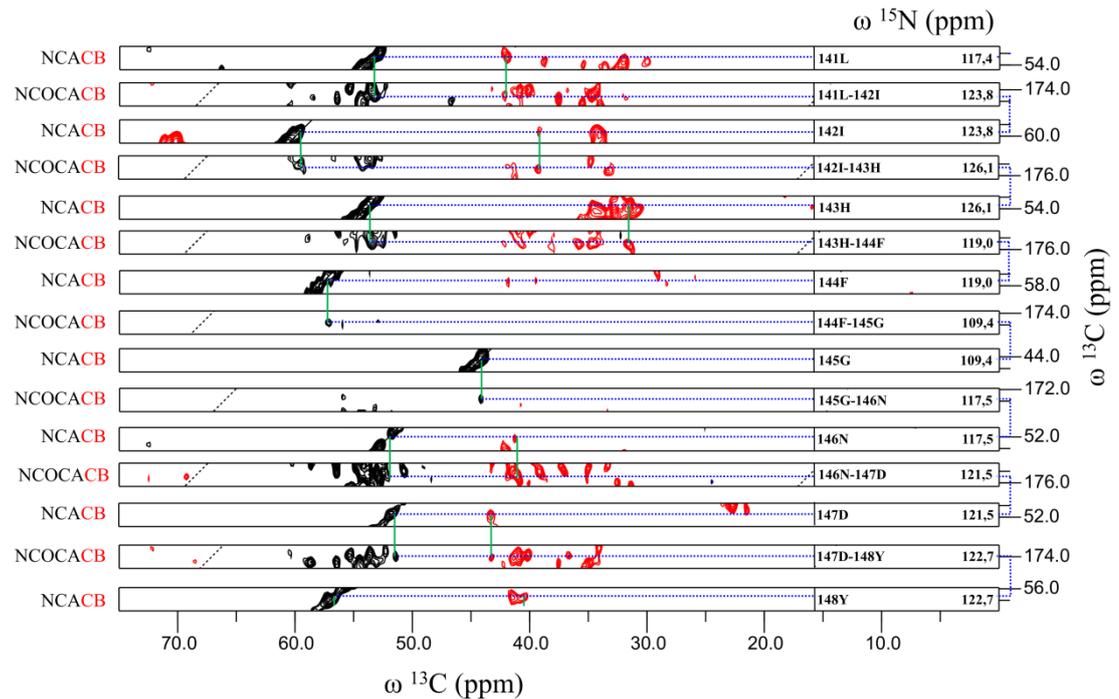


Abbildung 37: Streifen Darstellung der sequentiellen Zuordnung der dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen der Struktur A.

Die Spektren zeigen die sequentiellen Zuordnungen von L141 bis Y148 der Struktur A. Die blaue gestrichelte Linie zeigt die interresiduellen, die grüne Linie die intraresiduellen Zuordnungen. Die Spektren wurden bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 24 kHz und einer Temperatur von jeweils $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen. Die Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,5 prozessiert.

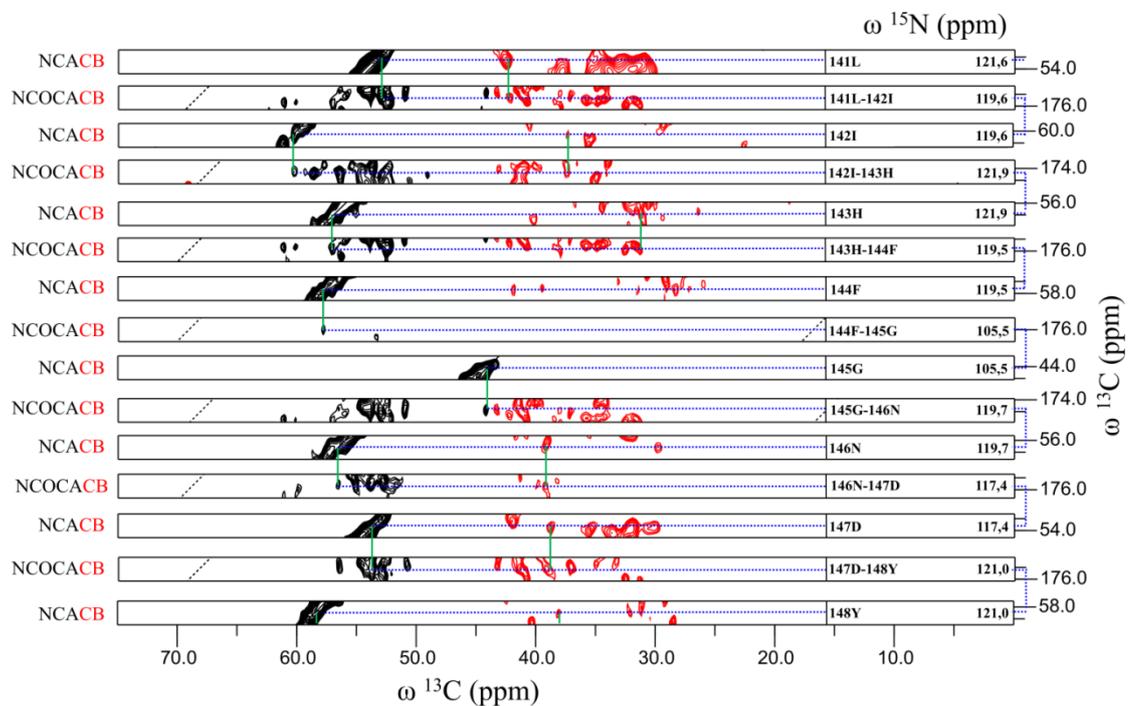


Abbildung 38: Streifen Darstellung der sequentiellen Zuordnung der dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen der Struktur B.

Die Spektren zeigen die sequentiellen Zuordnungen von L141 bis Y148 der Struktur B. Die blaue gestrichelte Linie zeigt die interresiduellen, die grüne Linie die intraresiduellen Zuordnungen. Die Spektren wurden bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 24 kHz und einer Temperatur von jeweils $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgenommen. Die Spektren wurden mit einer quadratischen Sinusfunktion mit einem Offset von 0,5 prozessiert.

Alle interresiduellen Verbindungen zeigen eine Abweichung der chemischen Verschiebungen zwischen NCACB, NCOCA und NCOcaCB von unter 0,5 ppm in den ^{13}C -Dimensionen, sowie weniger als 0,75 ppm in der ^{15}N -Dimension. Die gefundenen sequentiellen Zuordnungen sind jeweils doppelte Zuordnungen für die Region 141-LIHFGNDY-148 (Abbildung 37 und Abbildung 38). Im Folgenden werden diese Strukturen als Struktur A und Struktur B bezeichnet. Aufgrund der guten Signal Dispersion und Auflösung, konnten gut separierte interresiduale, als auch intraresiduale Korrelationssignale zwischen $\text{N}_i\text{-C}\alpha_i\text{-C}\beta_i$, respektive $\text{N}_i\text{-CO}_{i-1}\text{-C}\alpha_{i-1}\text{-C}\beta_{i-1}$ zugeordnet werden. Ausnahmen bildeten die His Ca/C β Korrelationssignale, die trotz der guten Auflösung in Regionen hoher Signalüberlappungen liegen. Überraschenderweise zeigen NCOcaCB-Experimenten keine möglichen Korrelationssignale zwischen $\text{CO}_{i-1}\text{-C}\beta_{i-1}$, wenn die Magnetisierung von einem nachfolgenden Glycin übertragen wurde. Dies betrifft auch die in der sequentiellen Zuordnung gefundenen 144Phe.

Eine erste genaue strukturelle Aussage kann über die sekundäre chemische Verschiebung getroffen werden. In Abbildung 39 sind die sekundären chemischen Verschiebungen der Region 140-PLIHFGNDY-148 grafisch dargestellt. Ausgehend von der sekundären chemischen Verschiebung kann davon ausgegangen werden das Struktur A ab 142Ile bis mindestens 148Tyr in einer β -Faltblatt Konformation vorliegt. Struktur B hingegen zeigt eine α -helikale Konformation ab \sim 146Asn. Es besteht die Möglichkeit, dass auch 145Gly involviert ist, jedoch ist keine Berechnung der sekundären chemischen Verschiebung generell über die Kohlenstoffseitenketten möglich, da Gly kein C β besitzt.

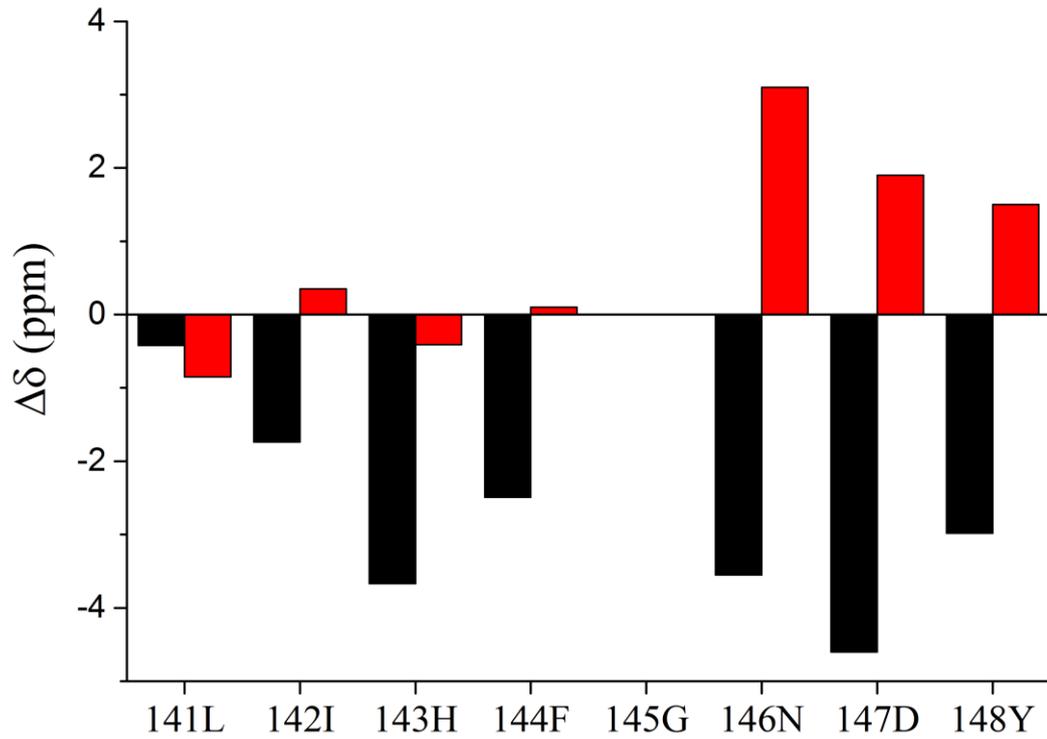


Abbildung 39: Sekundär chemische Verschiebungen der sequentiellen Zuordnungen.

Schwarz: Sekundär chemische Verschiebung der sequentiellen Zuordnung der Struktur A. Schwarz: Sekundär chemische Verschiebung der sequentiellen Zuordnung der Struktur B.

Tabelle 14: Chemische Verschiebungen der sequentiellen Zuordnung der Struktur A.

Position	Residue	Spin System #	N (ppm)	SD (ppm)	CO (ppm)	SD (ppm)	C α (ppm)	SD (ppm)	C β (ppm)	SD (ppm)	$\delta\Delta$ (ppm)
141	L	1364	117,41	0,26	174,34	0,12	53,08	0,27	42,1	0,8	-0,4
142	I	1269	123,78	0,12	175,23	0,20	59,73	0,14	39,17	0,13	-1,72
143	H	1385	126,06	0,17	175,44	0,03	53,86	0,16	31,53	0,24	-3,65
144	F	1322	119,04	0,36	174,78	X	57,32	0,21	41,71	0,17	-2,47
145	G	1292	109,43	0,19	172,83	X	44,27	0,04	X	X	X
146	N	1339	117,47	0,04	175,05	0,01	52,11	0,10	41,46	0,14	-3,53
147	D	1341	121,51	0,41	174,01	0,08	51,83	0,26	43,33	0,10	-4,58
148	Y	1315	122,76	0,06	X	X	56,86	0,01	40,74	0,01	-2,96

Tabelle 15: Chemische Verschiebungen der sequentiellen Zuordnung der Struktur B.

Position	Residue	Spin System #	N (ppm)	SD (ppm)	CO (ppm)	SD (ppm)	C α (ppm)	SD (ppm)	C β (ppm)	SD (ppm)	$\delta\Delta$ (ppm)
141	L	1345	121,55	X	175,18	0,11	53,15	0,13	42,60	0,21	-0,85
142	I	797	119,58	0,20	174,34	0,01	60,02	0,20	37,37	0,15	0,35
143	H	793	121,86	0,15	175,89	0,06	56,77	0,24	31,18	0,21	-0,41
144	F	709	119,50	0,18	175,90	X	57,54	0,34	39,34	0,18	0,10
145	G	1294	105,53	0,03	174,86	X	44,16	0,06	X	X	X
146	N	1308	119,74	0,01	175,64	0,01	56,50	0,04	39,20	0,02	3,10
147	D	1332	117,41	0,24	175,25	0,11	53,80	0,14	38,80	0,21	1,90
148	Y	1384	120,98	0,10	X	X	58,40	0,20	37,80	0,31	1,50

4.4.6. Festkörper-NMR-Spektroskopie der PrP^{Sc} induzierten Fibrillen gibt Hinweis auf zwei heterogene Strukturen

Diese Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, strukturelle Informationen über die Fehlfaltung der PrP Fibrillen zu erhalten. Die bisherigen Ergebnisse der Untersuchungen zu den Keim-induzierten Prion-Fibrillen nach Müller et al. lieferten schon strukturelle Informationen über die generelle Faltung und Hinweise auf den Mechanismus [111]. Jedoch konnten bisher keine genauen strukturellen Informationen, aufgrund fehlender sequentieller Zuordnungen, gesammelt werden. Das sollte hier mit den dreifach markierten Fibrillen geändert werden. Durch die Etablierung eines neuen Expressions- und Aufreinigungsprotokolls konnte das dreifach markierte ovrecPrP in Mengen hergestellt werden, die es erlaubten Festkörper-NMR-Proben herzustellen (siehe Kapitel 4.4.2). Für die Spinsystem-Identifikation wurden ausschließlich die dritte Generation verwendet, speziell die dreifach markierten Prion-Fibrillen. Durch die wiederholende Induktion von neuen Generationen mit einem Keim aus einer vorherigen Generation, konnte die Heterogenität nicht verbessert werden. Dies zeigt sich dadurch, dass die Anzahl der beobachtbaren Signale mit folgenden Generationen nicht weniger geworden sind. Somit kann vermutet werden, dass, im Vergleich zu A β -Fibrillen, keine homogene Strukturen durch das „Repeated Seeding“ herausamplifiziert werden können. Des Weiteren sind durch den Isotopen-Effekt des Deuteriums die Signale, im Vergleich zu einheitlich markierten Fibrillen, zu niedrigeren Verschiebungen hin verschoben. Im Durchschnitt sind es 1 ppm für das C α und 0,5 ppm für das C β . Aufgrund der schwachen und zum Großteil nicht vorhandenen Korrelationssignale zwischen den Seitenketten Kohlenstoffe ab C β /C γ , konnten bisher keine Informationen über den Isotopen-Effekt dieser Seitenketten Kohlenstoffe gesammelt werden. Abgesehen von den Verschiebungen durch den Isotopen-Effekt sind die Spektren der einheitlich markierten und dreifach markierten Fibrillen identisch. Variationen in den Spektren sind, wie auch schon bei den vorangegangenen Vergleichen, durch die weniger gut strukturierten Bereiche der Fibrillen zu erklären. Die überraschenden Ergebnisse des Vergleichs zwischen den beiden dreifach markierten Proben bestätigen zusätzlich, dass die Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben hauptsächlich durch die weniger gut strukturierten Proteinbereiche verursacht werden. Als Ergebnis wurde erwartet, dass die dreifach markierten Fibrillen, die mit 70 % D₂O gewaschen wurden mehr Korrelationssignale aufweisen, als die Fibrillen die mit 100 % D₂O gewaschen wurden. Die Idee war, durch

das Waschen mit 100 % D₂O, die Amid-Protonen im N-terminalen Bereich durch Deuterium auszutauschen. Der Amyloid-Kern ist durch seine Faltung vor einem H/D-Austausch geschützt. Im Endeffekt sollten nur noch die zu 30 % deuterierten Aminosäuren des Amyloid-Kerns Korrelationssignale ergeben. Jedoch zeigen die Ergebnisse das genaue Gegenteil, da mehr Korrelationssignale in den Spektren der dreifach markierten Fibrillen vorhanden sind. Die betroffenen Bereiche umfassen hauptsächlich weniger gut strukturierte oder α -helikale Aminosäuren. Im Einzelnen sind das α -helikale Ala (C α /C β), Arg/Glu/Gln/His (C α /C β) und Val (C α /C β), und Random Coil Ile (C α /C β) und Ser (C α /C β), Pro (C α /C β) und Pro_{trans} (C δ /C γ). Eine Erklärung dafür wäre ein unterschiedlicher Wassergehalt in den Proben, welche in nassen Proben dazu führen, dass die Dynamik flexibler Anteile in einem Bereich fallen könnte der außerhalb der NMR-Zeitskala liegt. Da, wie beschrieben, keine Korrelationssignale durch das Waschen mit 100 % D₂O eliminiert wurden und auch keine Tryptophan Signale beobachtet wurden, kann davon ausgegangen werden, dass ausschließlich der Bereich ab Aminosäure ~103 sichtbar ist. Wie schon zuvor besprochen ist davon auszugehen, dass diese Heterogenität sich zumindest auf den Bereich bis Aminosäuren ~140-150 beschränkt. Hinweise auf eine Heterogenität im Bereich des PK-resistenten Amyloid-Kerns von ~140-233 bzw. ~150-233 konnte bisher nicht gefunden werden. Die sequentiellen Zuordnungen, die die Region 141-LIHFGNDY-148 umfassen, zeigen zwei unterschiedliche Strukturen, welche die Annahme unterstützen, dass sich die Heterogenität auf die Bereiche außerhalb der Amyloid-Kerne beschränken. Aus dem Vergleich zwischen den sequentiell zugeordneten Regionen und der Struktur des nativen Schafs-PrP fällt auf, dass die Region zwischen 140-148 der Helix A (146-158) dem nativ gefalteten Schafs-PrP entspricht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Helix A im Falle der Struktur A während der Konversion vom nativ gefalteten ovrecPrP zur fehlgefalteten Isoform, eine Umstrukturierung zum β -Faltblatt erfährt. Die Aminosäuren bis 142I sind ebenfalls davon betroffen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen aus dem PK-Dau, die auf einen Amyloid-Kern schließen lässt, der die Region ~140-233 umfasst. Wie lang dieses β -Faltblatt tatsächlich ist kann durch diese Arbeit nicht beantwortet werden. Die Struktur B hingegen behält zumindest den Anfangsbereich der Helix A ab Aminosäure 146N. Vermutlich beginnt der Amyloid-Kern der Struktur B ab Aminosäure ~154. Zum einen ist die zweite Schnittstelle der Proteinase K bei ~150, zum anderen kann davon ausgegangen werden, dass die α -Helix A konserviert wird, welche im nativen Zustand bis Aminosäure 154 reicht.

Werden die Ergebnisse der Charakterisierung der PrP^{Sc} induzierten ovrecPrP Fibrillen zusammengefasst, so ergibt sich ein Bild der Sekundärstruktur, welches in Abbildung 40 zu sehen ist. Zum einen ist wahrscheinlich, dass die hier generierten ovrecPrP Fibrillen aus zwei distinkten Einheiten aufgebaut sind, zum anderen entspricht die Amyloid-Kernregion am ehesten den durch Flüssig-NMR gewonnenen Erkenntnissen der Kernregion. Jedoch kann die Frage der genauen Architektur der Prion-Fibrillen in dieser Arbeit geklärt werden. Die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse können auch keine definitive Aussage über die tatsächliche Länge des Amyloid-Kerns erbringen. Es ist möglich, dass die Kern Region nicht bis 233 reicht, sondern, wie in eigentlich allen bisher publizierten Arbeiten, bis ~220 reicht. Da die sequentiellen Zuordnungen noch bestätigt werden müssen, ist dieses Modell der sekundären Struktur als vorläufig anzusehen.

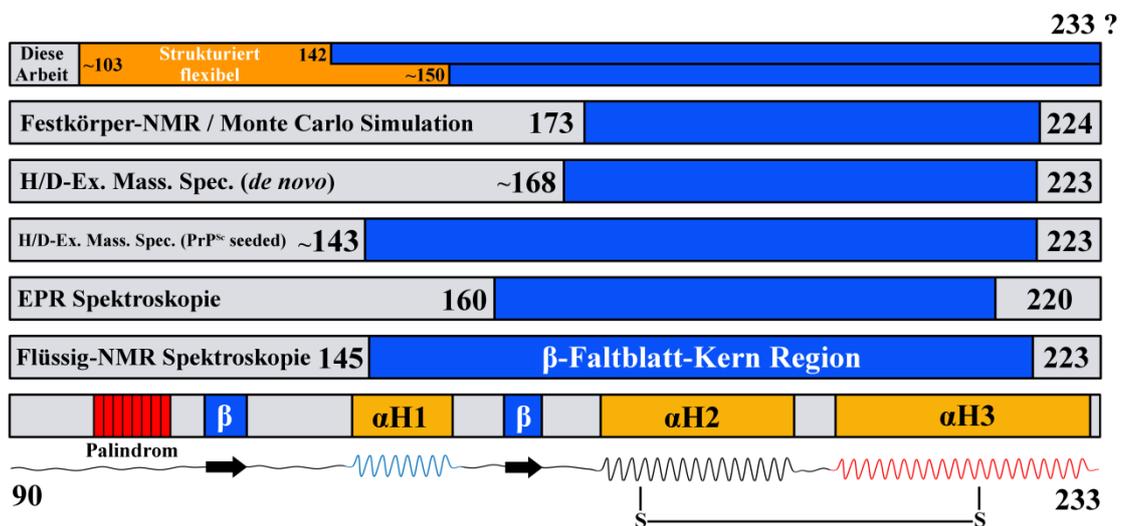


Abbildung 40: Schematische Darstellung der Domänen der Prion-Fibrillen aus dieser Arbeit im Vergleich zur Literatur.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse deuten auf einen strukturierten aber flexiblen Bereich zwischen ~103 und 142 bzw. ~150, und einen strukturierten rigiden Bereich ab 142 bzw. ~150. Im Vergleich dazu stehen die Domänen der Prion-Fibrillen die mit Hilfe von Massenspektroskopie [71], EPR Spektroskopie [70], Flüssig-NMR [72], als auch mit Festkörper-NMR [73, 74] untersucht wurden. Das zelluläre Prion Protein ist mit seinen Domänen der nativen Faltung dargestellt [18].

5. Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse zeigen Potential für weiterführende Untersuchungen.

Die Möglichkeiten der Untersuchungen der Prion-Fibrillen mit Festkörper-NMR-Spektroskopie stoßen bislang an ihre Grenzen. Der Grund dafür ist die schlechte Signaldispersion kombiniert mit der schlechten Auflösung in der ^{15}N -Dimension. Eine Fortführung mit vollständig $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markiertem Protein wäre somit nicht zielführend. Doch die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse der dreifach $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ markierten Proteine zeigen, dass das Potential zur vollständigen strukturellen Analyse vorhanden ist. So konnte trotz der schlechten Dispersion, durch eine gute Auflösung in der ^{15}N -Dimension, Signale in hoch populierten Regionen differenziert werden. In weiterführenden Untersuchungen kann als weitere Dimension die ^1H -Dimension zur Detektion verwendet werden. Dies macht es wiederum möglich alle in dieser Arbeit nicht aufgelösten Region der z.B. Methionine, Arginine und Lysine weiter zu differenzieren. Damit bestünde die Voraussetzung einer vollständigen Zuordnung aller Spinsysteme. Weiterhin können durch Verwendung spezifischer Pulssequenzen, die ähnlich der TOCSY Experimente, alle Seitenkettenkorrelationen sichtbar gemacht werden.

Die Untersuchung der Domänen der Prion-Fibrillen sollte dann den Aufschluss über den genauen Bereich bringen, die die Prion-Domäne umfasst. Diese Analyse könnte Einblick in den Mechanismus der Umfaltung bringen. Abschließend würde auch der Vergleich der *de novo* generierten mit den Keim-induzierten Prion-Fibrillen sowie der MARQ Prion-Fibrillen mit den nicht pathogenen TARQ Prion-Fibrillen Einsicht in den pathogenen Bereich bzw. des pathogenen Mechanismus geben.

6. Zusammenfassung

Die Fehlfaltung des Prion Proteins ist eine der Ursachen für neurodegenerative Erkrankungen im Menschen, aber auch in verschiedenen Arten der Säugetiere. Dazu zählen insbesondere Rinder (BSE), Elche (CWD) oder auch Schafe und Ziegen (Scrapie). Diese Erkrankungen sind charakterisiert durch die Fehlfaltung des zellulären Prion Proteins (PrP^{C}) in die fehlgefaltete Isoform PrP^{Sc} . Die Formation des PrP^{Sc} in die sog. „amyloiden Fibrillen“ ist wahrscheinlich getrieben durch den sog. „Nukleationsevent“. Exogenes PrP^{Sc} dient dabei als Keim zur Induktion des Rearrangements der PrP^{C} Isoform in die des PrP^{Sc} . Natives PrP^{C} polymerisiert dabei an die Enden der amyloiden Fibrillen. Aufgrund des unlöslichen Charakters und keiner Möglichkeit der Kristallisation dieser Prion-Fibrillen können hochauflösende Techniken zur strukturellen Untersuchung, wie z.B. Flüssig-NMR-Spektroskopie oder auch Röntgenkristallographie, nicht verwendet werden. Für die strukturelle Untersuchung kommen aufgrund dessen nur Techniken wie Kryo-EM und/oder Festkörper-NMR-Spektroskopie in Frage. In dieser Arbeit wurde neben biophysikalischen Methoden auch die Festkörper-NMR-Spektroskopie verwendet um die Struktur von Schafs Prion-Fibrillen zu untersuchen.

Um die strukturellen Eigenschaften der Schafs Prion-Fibrillen untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit verschiedene Systeme verwendet um Proben für die Festkörper-NMR-Spektroskopie herzustellen. Mit der Etablierung eines modifizierten autokatalytischen Konversionssystems sollten Prion-Fibrillen *de novo* hergestellt werden, die die makromorphologischen Eigenschaften natürlich vorkommender PrP^{Sc} Fibrillen besitzen. Diese sollten im Anschluss mit den bisher *de novo* generierten Prion-Rods verglichen werden. Der Vergleich sollte über die Eigenschaften aufklären, welche zu dem unterschiedlichen Erscheinungsbild führt, um so auch Informationen über den generellen Aufbau der Fibrillen zu erbringen. Die hier beschriebenen Ergebnisse konnten zeigen, dass die Verwendung von GdnHCl eine große Auswirkung nicht nur auf das Erscheinungsbild der Prionen, sondern auch auf die Eigenschaft der PK-Resistenz hat. So zeigten Prionen die ohne GdnHCl hergestellt wurden nicht nur das gewünschte Erscheinungsbild natürlich vorkommender PrP^{Sc} Fibrillen, sie zeigten auch, im Gegensatz zu den Prion-Rods, eine partielle PK-Resistenz. Zusammen mit den hier präsentierten Festkörper-NMR Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass der Unterschied im Wesentlichen die Anteile der verschiedenen sekundären

Strukturelemente und ihre strukturelle Packung umfasst. So betrifft der strukturelle Unterschied zumindest den Bereich zwischen Aminosäure ~102 und 124, mit einem höheren Anteil an β -Faltblatt. Diese sind weniger mobil und in einer generell weniger dichten Packung in den Prion-Rods im Vergleich zu den Prion-Fibrillen.

Im weiteren Verlauf wurde neben der strukturellen Untersuchung auch auf die Frage eingegangen, ob die Prion-Fibrillen neben der Induktion neuer Fibrillen auch in der Lage sind, ihre Struktur weiter zu vererben. Mit der Verwendung von zwei verschiedenen Schafs Prion Proteinen, das eine mit den hoch infektiösen Polymorphismen M₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁, das andere mit den nicht pathogenen T₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ Polymorphismen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Struktur nicht weitervererbt wird. Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass es dominante Strukturen gibt die, wenn vorhanden, keine anderen Strukturen zulassen.

Die weitere Untersuchung von dreifach ²H/¹³C/¹⁵N markierten und Keim-induzierten ovrecPrP(MARQ) Prion-Fibrillen konnte weiteren Aufschluss über die Struktur der Prion-Fibrillen bringen. Durch diese Art der Markierung war es zum ersten Mal möglich sequentielle Informationen zu erlangen. Diese Ergebnisse konnten zeigen, dass die Prion-Fibrillen aus zwei verschieden strukturierten Einheiten aufgebaut sind, welche sich in der Länge ihre Amyloid-Kerns unterscheiden.

7. Summary

The misfolding of the prion protein gives rise to neurodegenerative diseases not only in humans but also in several different mammals, like mad cow disease (BSE) in cattle, chronic wasting disease (CWD) in deer and elk or scrapie in sheep and goats. These diseases are characterized by a misfolding of the cellular PrP^C into the disease related isoform PrP^{Sc}. The formation of the PrP^{Sc} into the amyloid fibrils is believed to be driven by a nucleation event. The rearrangement of the PrP^C isoform into PrP^{Sc} is driven by Exogenous PrP^{Sc} which then leads to the polymerization formation of newly rearranged PrP^{Sc} at the ends of a fibril. Due to the fact that PrP^{Sc} amyloid fibrils are insoluble and non-crystallizable, they are not amenable to X-ray crystallography and liquid-state NMR. For structural investigations high-resolution techniques like cryo-EM or solid-state NMR-spectroscopy are necessary. In this work we used biophysical and solid-state NMR-spectroscopy to investigate the structure of different ovine prion fibrils.

To investigate the structural properties of the ovine prion fibrils, different conversion systems were used to prepare prion fibrils for biophysical methods and solid-state NMR-spectroscopy. A modified autocatalytic conversion system was established to generate prion fibrils *de novo* which are macro morphologically related to PrP^{Sc} fibrils. Following, these prion fibrils were compared to the *de novo* generated prion rods. This comparison should give insight into the structural difference between the fibrils and rods. The results showed that the use of GdnHCl has a great impact onto the macro morphological appearance of the prion, Furthermore, the use of GdnHCl terminates capability of creating prion fibrils which are partially pK resistant. Prion fibrils which are *de novo* generated show not only the macro morphological appearance of PrP^{Sc} fibrils, they are also partially resistant against pK digestion. Together with the biophysical results, solid-state NMR-spectroscopy shows a main difference between the prion fibrils and rods in the secondary structure and their structural arrangement. The structural difference comprises the amino acid region between ~102 and 124, with a higher β -sheet content which are less mobile for the prion rods, and an overall denser structural arrangement of the prion fibrils.

Following, this work involved the structural investigation of seeded prion fibrils and tried to answer the question to structural inheritance, respectively, templating event. For this purpose, two ovine prion proteins with the disease associated polymorphism

M₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ and the disease resistant polymorphism T₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ were investigated leading to the conclusion that, besides the seeding, the structure cannot be inherited. Furthermore, it could be shown that there are prion structures which are dominant leading to a situation where other prion proteins can occupy only one distinct structure.

Furthermore, with seeded fibrillation of the ²H/¹³C/¹⁵N labeled ovrecPrP(MARQ) it was for the first time possible to gain sequential information of the structure. The results show that the fibril architecture is likely to be constructed by two distinct units which have a different partial pK resistant amyloid core.

8. Literaturverzeichnis

- [1] G. Steger, CD-Spektren, Großpraktikum I in Molekularer Biophysik: Konformation und Wechselwirkung, Düsseldorf, 2011.
- [2] A. Aguzzi, A.M. Calella, Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiological reviews* 89 (2009) 1105-1152.
- [3] D.A. Lysek, C. Schorn, L.G. Nivon, V. Esteve-Moya, B. Christen, L. Calzolari, C. von Schroetter, F. Fiorito, T. Herrmann, P. Güntert, K. Wüthrich, Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005) 640-645.
- [4] T. Alper, D.A. Haig, M.C. Clarke, The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochemical and biophysical research communications* 22 (1966) 278-284.
- [5] T. Alper, W.A. Cramp, D.A. Haig, M.C. Clarke, Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214 (1967) 764-766.
- [6] S.B. Prusiner, Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, NY)* 216 (1982) 136-144.
- [7] K.M. Pan, M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R.J. Fletterick, F.E. Cohen, Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (1993) 10962-10966.
- [8] G.C. Telling, P. Parchi, S.J. DeArmond, P. Cortelli, P. Montagna, R. Gabizon, J. Mastrianni, E. Lugaresi, P. Gambetti, S.B. Prusiner, Evidence for the conformation of the pathologic isoform of the prion protein enciphering and propagating prion diversity. *Science (New York, NY)* 274 (1996) 2079-2082.
- [9] S.B. Prusiner, Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1998) 13363-13383.
- [10] G.G.G. Kovács, G. Trabattoni, J.A. Hainfellner, J.W. Ironside, R.S. Knight, H. Budka, Mutations of the prion protein gene phenotypic spectrum. *Journal of neurology* 249 (2002) 1567-1582.
- [11] S. Collins, C.A. McLean, C.L. Masters, Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human transmissible spongiform encephalopathies. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 8 (2001) 387-397.
- [12] H.L. True, S.L. Lindquist, A yeast prion provides a mechanism for genetic variation and phenotypic diversity. *Nature* 407 (2000) 477-483.
- [13] S. Chakrabortee, C. Kayatekin, G.A. Newby, M.L. Mendillo, A. Lancaster, S. Lindquist, Lumini-dependens (LD) is an Arabidopsis protein with prion behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2016).
- [14] S. Chen, S.P. Yadav, W.K. Surewicz, Interaction between human prion protein and amyloid-beta (A β) oligomers: role OF N-terminal residues. *The Journal of biological chemistry* 285 (2010) 26377-26383.
- [15] D.B. Freir, A.J. Nicoll, I. Klyubin, S. Panico, J.M. Mc Donald, E. Risse, E.A. Asante, M.A. Farrow, R.B. Sessions, H.R. Saibil, A.R. Clarke, M.J. Rowan, D.M. Walsh, J. Collinge, Interaction between prion protein and toxic amyloid β assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. *Nature communications* 2 (2011) 336.

- [16] T. van Rheede, M.M. Smolenaars, O. Madsen, W.W. de Jong, Molecular evolution of the mammalian prion protein. *Molecular biology and evolution* 20 (2003) 111-121.
- [17] B. Oesch, D. Westaway, M. Wälchli, M.P. McKinley, S.B. Kent, R. Aebersold, R.A. Barry, P. Tempst, D.B. Teplow, L.E. Hood, A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell* 40 (1985) 735-746.
- [18] R. Zahn, A. Liu, T. Lührs, R. Riek, C. von Schroetter, F. López García, M. Billeter, L. Calzolari, G. Wider, K. Wüthrich, NMR solution structure of the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000) 145-150.
- [19] C. Weissmann, The state of the prion. *Nature reviews Microbiology* 2 (2004) 861-871.
- [20] L. Calzolari, D.A. Lysek, D.R. Pérez, P. Güntert, K. Wüthrich, Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005) 651-655.
- [21] M. Giel-Pietraszuk, M. Hoffmann, S. Dolecka, J. Rychlewski, J. Barciszewski, Palindromes in proteins. *J Protein Chem* 22 (2003) 109-113.
- [22] T. Haraguchi, S. Fisher, S. Olofsson, T. Endo, D. Groth, A. Tarentino, D.R. Borchelt, D. Teplow, L. Hood, A. Burlingame, Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins. *Archives of biochemistry and biophysics* 274 (1989) 1-13.
- [23] J.L. Laplanche, J. Chatelain, D. Westaway, S. Thomas, M. Dussaucy, J. Brugere-Picoux, J.M. Launay, PrP polymorphisms associated with natural scrapie discovered by denaturing gradient gel electrophoresis. *Genomics* 15 (1993) 30-37.
- [24] W. Goldmann, N. Hunter, G. Benson, J.D. Foster, J. Hope, Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene. *The Journal of general virology* 72 (Pt 10) (1991) 2411-2417.
- [25] A. Bossers, B.E. Schreuder, I.H. Muileman, P.B. Belt, M.A. Smits, PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *The Journal of general virology* 77 (Pt 10) (1996) 2669-2673.
- [26] C. Billinis, V. Psychas, L. Leontides, V. Spyrou, S. Argyroudis, I. Vlemmas, S. Leontides, T. Sklaviadis, O. Papadopoulos, Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected sheep in Greece. *The Journal of general virology* 85 (2004) 547-554.
- [27] P.B. Belt, I.H. Muileman, B.E. Schreuder, J. Bos-de Ruijter, A.L. Gielkens, M.A. Smits, Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *The Journal of general virology* 76 (Pt 3) (1995) 509-517.
- [28] M. Dawson, L.J. Hoinville, B.D. Hosie, N. Hunter, Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Scrapie Information Group. Veterinary Record* 142 (1998) 623-625.
- [29] M. Baylis, W. Goldmann, F. Houston, D. Cairns, A. Chong, A. Ross, A. Smith, N. Hunter, A.R. McLean, Scrapie epidemic in a fully PrP-genotyped sheep flock. *The Journal of general virology* 83 (2002) 2907-2914.
- [30] M. Baylis, C. Chihota, E. Stevenson, W. Goldmann, A. Smith, K. Sivam, S. Tongue, M.B. Gravenor, Risk of scrapie in British sheep of different prion protein genotype. *The Journal of general virology* 85 (2004) 2735-2740.
- [31] W.W. Laegreid, M.L. Clawson, M.P. Heaton, B.T. Green, K.I. O'Rourke, D.P. Knowles, Scrapie resistance in ARQ sheep. *Journal of virology* 82 (2008) 10318-10320.

- [32] R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, M. Billeter, R. Glockshuber, K. Wüthrich, NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* 382 (1996) 180-182.
- [33] R. Riek, S. Hornemann, G. Wider, R. Glockshuber, K. Wüthrich, NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS letters* 413 (1997) 282-288.
- [34] T.L. James, H. Liu, N.B. Ulyanov, S. Farr-Jones, H. Zhang, D.G. Donne, K. Kaneko, D. Groth, I. Mehlhorn, S.B. Prusiner, F.E. Cohen, Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (1997).
- [35] D.G. Donne, J.H. Viles, D. Groth, I. Mehlhorn, T.L. James, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, P.E. Wright, H.J. Dyson, Structure of the recombinant full-length hamster prion protein PrP(29-231): the N terminus is highly flexible. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997) 13452-13457.
- [36] F. López Garcia, R. Zahn, R. Riek, K. Wüthrich, NMR structure of the bovine prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000) 8334-8339.
- [37] J.D. Foster, D.W. Parnham, N. Hunter, M. Bruce, Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *The Journal of general virology* 82 (2001) 2319-2326.
- [38] O.N. Gill, Y. Spencer, A. Richard-Loendt, C. Kelly, R. Dabaghian, L. Boyes, J. Linehan, M. Simmons, P. Webb, P. Bellerby, N. Andrews, D.A. Hilton, J.W. Ironside, J. Beck, M. Poulter, S. Mead, S. Brandner, Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey. *BMJ (Clinical research ed)* 347 (2013).
- [39] S.B. Prusiner, D.F. Groth, S.P. Cochran, M.P. McKinley, F.R. Masiarz, Gel electrophoresis and glass permeation chromatography of the hamster scrapie agent after enzymatic digestion and detergent extraction. *Biochemistry* 19 (1980) 4892-4898.
- [40] S.B. Prusiner, M.P. McKinley, D.F. Groth, K.A. Bowman, N.I. Mock, S.P. Cochran, F.R. Masiarz, Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (1981) 6675-6679.
- [41] M.P. McKinley, D.C. Bolton, S.B. Prusiner, A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. *Cell* 35 (1983) 57-62.
- [42] R.K. Meyer, M.P. McKinley, K.A. Bowman, M.B. Braunfeld, R.A. Barry, S.B. Prusiner, Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (1986) 2310-2314.
- [43] D. Riesner, Transmissible spongiform encephalopathies: the prion theory--background and basic information. *Contributions to microbiology* 11 (2004) 1-13.
- [44] M.P. McKinley, R.K. Meyer, L. Kenaga, F. Rahbar, R. Cotter, A. Serban, S.B. Prusiner, Scrapie prion rod formation in vitro requires both detergent extraction and limited proteolysis. *Journal of virology* 65 (1991) 1340-1351.
- [45] B.W. Caughey, A. Dong, K.S. Bhat, D. Ernst, S.F. Hayes, W.S. Caughey, Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy. *Biochemistry* 30 (1991) 7672-7680.
- [46] M. Horiuchi, B. Caughey, Specific binding of normal prion protein to the scrapie form via a localized domain initiates its conversion to the protease-resistant state. *The EMBO journal* 18 (1999) 3193-3203.

- [47] B. Caughey, D.A. Kocisko, G.J. Raymond, P.T. Lansbury, Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chemistry & biology* 2 (1995) 807-817.
- [48] V.A. Lawson, S.A. Priola, K. Meade-White, M. Lawson, B. Chesebro, Flexible N-terminal region of prion protein influences conformation of protease-resistant prion protein isoforms associated with cross-species scrapie infection in vivo and in vitro. *The Journal of biological chemistry* 279 (2004) 13689-13695.
- [49] Z. Huang, S.B. Prusiner, F.E. Cohen, Structures of Prion Proteins and Conformational Models for Prion Diseases, in: S.B. Prusiner (Ed.) *Prions Prions Prions*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 1996, pp. 49-67.
- [50] M. Eigen, Prionics or the kinetic basis of prion diseases. *Biophysical chemistry* 63 (1996).
- [51] E.M. Norstrom, J.A. Mastrianni, The AGAAAAGA palindrome in PrP is required to generate a productive PrP^{Sc}-PrP^C complex that leads to prion propagation. *The Journal of biological chemistry* 280 (2005) 27236-27243.
- [52] D.A. Kocisko, J.H. Come, S.A. Priola, B. Chesebro, G.J. Raymond, P.T. Lansbury, B. Caughey, Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370 (1994) 471-474.
- [53] L. Kirby, C.R. Birkett, H. Rudyk, I.H. Gilbert, J. Hope, In vitro cell-free conversion of bacterial recombinant PrP to PrP^{Sc} as a model for conversion. *The Journal of general virology* 84 (2003) 1013-1020.
- [54] A.F. Hill, M. Antoniou, J. Collinge, Protease-resistant prion protein produced in vitro lacks detectable infectivity. *The Journal of general virology* 80 (Pt 1) (1999) 11-14.
- [55] G.P. Saborío, C. Soto, R.J. Kascsak, E. Levy, R. Kascsak, D.A. Harris, B. Frangione, Cell-lysate conversion of prion protein into its protease-resistant isoform suggests the participation of a cellular chaperone. *Biochemical and biophysical research communications* 258 (1999) 470-475.
- [56] G.P. Saborio, B. Permanne, C. Soto, Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411 (2001) 810-813.
- [57] P. Saá, L. Cervenakova, Protein misfolding cyclic amplification (PMCA): Current status and future directions. *Virus research* 207 (2015) 47-61.
- [58] J. Castilla, P. Saá, C. Soto, Detection of prions in blood. *Nature medicine* 11 (2005) 982-985.
- [59] Z. Zhang, Y. Zhang, F. Wang, X. Wang, Y. Xu, H. Yang, G. Yu, C. Yuan, J. Ma, De novo generation of infectious prions with bacterially expressed recombinant prion protein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27 (2013) 4768-4775.
- [60] O.V. Bocharova, L. Breydo, A.S. Parfenov, V.V. Salnikov, I.V. Baskakov, In vitro conversion of full-length mammalian prion protein produces amyloid form with physical properties of PrP(Sc). *Journal of molecular biology* 346 (2004) 645-659.
- [61] I.V. Baskakov, G. Legname, M.A. Baldwin, S.B. Prusiner, F.E. Cohen, Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *The Journal of biological chemistry* 277 (2002) 21140-21148.
- [62] I.V. Baskakov, Autocatalytic conversion of recombinant prion proteins displays a species barrier. *The Journal of biological chemistry* 279 (2004) 7671-7677.
- [63] L. Breydo, O.V. Bocharova, I.V. Baskakov, Semiautomated cell-free conversion of prion protein: applications for high-throughput screening of potential antiprion drugs. *Analytical biochemistry* 339 (2005) 165-173.

- [64] G. Legname, I.V. Baskakov, H.-O.B.O. Nguyen, D. Riesner, F.E. Cohen, S.J. DeArmond, S.B. Prusiner, Synthetic mammalian prions. *Science (New York, NY)* 305 (2004) 673-676.
- [65] G. Legname, H.-O.B.O. Nguyen, I.V. Baskakov, F.E. Cohen, S.J. Dearmond, S.B. Prusiner, Strain-specified characteristics of mouse synthetic prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005) 2168-2173.
- [66] D. Westaway, S.J. DeArmond, J. Cayetano-Canlas, D. Groth, D. Foster, S.L. Yang, M. Torchia, G.A. Carlson, S.B. Prusiner, Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins. *Cell* 76 (1994) 117-129.
- [67] R.A. Williamson, D. Peretz, C. Pinilla, H. Ball, R.B. Bastidas, R. Rozenshteyn, R.A. Houghten, S.B. Prusiner, D.R. Burton, Mapping the prion protein using recombinant antibodies. *Journal of virology* 72 (1998) 9413-9418.
- [68] V.L. Sim, B. Caughey, Ultrastructures and strain comparison of underglycosylated scrapie prion fibrils. *Neurobiology of aging* 30 (2009) 2031-2042.
- [69] H. Wille, W. Bian, M. McDonald, A. Kendall, D.W. Colby, L. Bloch, J. Ollesch, A.L. Borovinskiy, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, G. Stubbs, Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009) 16990-16995.
- [70] N.J. Cobb, F.D. Sönnichsen, H. McHaourab, W.K. Surewicz, Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2007) 18946-18951.
- [71] X. Lu, P.L. Wintrode, W.K. Surewicz, Beta-sheet core of human prion protein amyloid fibrils as determined by hydrogen/deuterium exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (2007) 1510-1515.
- [72] J. Kumar, S. Sreeramulu, T.L. Schmidt, C. Richter, J. Vonck, A. Heckel, C. Glaubitz, H. Schwalbe, Prion protein amyloid formation involves structural rearrangements in the C-terminal domain. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 11 (2010) 1208-1213.
- [73] R. Tycko, R. Savtchenko, V.G. Ostapchenko, N. Makarava, I.V. Baskakov, The α -helical C-terminal domain of full-length recombinant PrP converts to an in-register parallel β -sheet structure in PrP fibrils: evidence from solid state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 49 (2010) 9488-9497.
- [74] R. Tycko, Symmetry-based constant-time homonuclear dipolar recoupling in solid state NMR. *The Journal of chemical physics* 126 (2007) 64506.
- [75] M. Gasset, M.A. Baldwin, D.H. Lloyd, J.M. Gabriel, D.M. Holtzman, F. Cohen, R. Fletterick, S.B. Prusiner, Predicted alpha-helical regions of the prion protein when synthesized as peptides form amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (1992) 10940-10944.
- [76] E. Vázquez-Fernández, M.R. Vos, P. Afanasyev, L. Cebeý, A.M. Sevillano, E. Vidal, I. Rosa, L. Renault, A. Ramos, P.J. Peters, J.J.J. Fernández, M. van Heel, H.S. Young, J.R.R. Requena, H. Wille, The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy. *PLoS pathogens* 12 (2016).
- [77] B.R. Groveman, M.A. Dolan, L.M. Taubner, A. Kraus, R.B. Wickner, B. Caughey, Parallel in-register intermolecular β -sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *The Journal of biological chemistry* 289 (2014) 24129-24142.
- [78] R.B. Wickner, [URE3] as an altered URE2 protein: evidence for a prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, NY)* 264 (1994) 566-569.

- [79] V.V. Kushnirov, M.D. Ter-Avanesyan, M.V. Telckov, A.P. Surguchov, V.N. Smirnov, S.G. Inge-Vechtomov, Nucleotide sequence of the SUP2 (SUP35) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 66 (1988) 45-54.
- [80] M.D. Ter-Avanesyan, V.V. Kushnirov, A.R. Dagkesamanskaya, S.A. Didichenko, Y.O. Chernoff, S.G. Inge-Vechtomov, V.N. Smirnov, Deletion analysis of the SUP35 gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals two non-overlapping functional regions in the encoded protein. *Molecular microbiology* 7 (1993) 683-692.
- [81] M.D. Ter-Avanesyan, A.R. Dagkesamanskaya, V.V. Kushnirov, V.N. Smirnov, The SUP35 omnipotent suppressor gene is involved in the maintenance of the non-Mendelian determinant [psi⁺] in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137 (1994) 671-676.
- [82] I.L. Derkatch, Y.O. Chernoff, V.V. Kushnirov, S.G. Inge-Vechtomov, S.W. Liebman, Genesis and variability of [PSI] prion factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 144 (1996) 1375-1386.
- [83] G. Zhouravleva, L. Frolova, X. Le Goff, R. Le Guellec, S. Inge-Vechtomov, L. Kisselev, M. Philippe, Termination of translation in eukaryotes is governed by two interacting polypeptide chain release factors, eRF1 and eRF3. *The EMBO journal* 14 (1995) 4065-4072.
- [84] M.M. Patino, J.J. Liu, J.R. Glover, S. Lindquist, Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science (New York, NY)* 273 (1996) 622-626.
- [85] I. Stansfield, K.M. Jones, V.V. Kushnirov, A.R. Dagkesamanskaya, A.I. Poznyakovski, S.V. Paushkin, C.R. Nierras, B.S. Cox, M.D. Ter-Avanesyan, M.F. Tuite, The products of the SUP45 (eRF1) and SUP35 genes interact to mediate translation termination in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 14 (1995) 4365-4373.
- [86] V.N. Smirnov, V.G. Kreier, L.V. Lizlova, V.M. Andrianova, S.G. Inge-Vechtomov, Recessive super-suppression in yeast. *Molecular & general genetics : MGG* 129 (1974) 105-121.
- [87] D.C. Hawthorne, R.K. Mortimer, Genetic mapping of nonsense suppressors in yeast. *Genetics* 60 (1968) 735-742.
- [88] M.A. Jensen, H.L. True, Y.O. Chernoff, S. Lindquist, Molecular population genetics and evolution of a prion-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 159 (2001) 527-535.
- [89] C. Thual, A.A. Komar, L. Bousset, E. Fernandez-Bellot, C. Cullin, R. Melki, Structural characterization of *Saccharomyces cerevisiae* prion-like protein Ure2. *The Journal of biological chemistry* 274 (1999) 13666-13674.
- [90] D.C. Masison, R.B. Wickner, Prion-inducing domain of yeast Ure2p and protease resistance of Ure2p in prion-containing cells. *Science (New York, NY)* 270 (1995) 93-95.
- [91] A.P. Mitchell, B. Magasanik, Regulation of glutamine-repressible gene products by the GLN3 function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* 4 (1984) 2758-2766.
- [92] W.E. Courchesne, B. Magasanik, Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the URE2 and GLN3 genes. *Journal of bacteriology* 170 (1988) 708-713.
- [93] P.W. Coschigano, B. Magasanik, The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione s-transferases. *Molecular and cellular biology* 11 (1991) 822-832.

- [94] R. Rai, F. Genbauffe, H.Z. Lea, T.G. Cooper, Transcriptional regulation of the DAL5 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology* 169 (1987) 3521-3524.
- [95] U. Baxa, R.B. Wickner, A.C. Steven, D.E. Anderson, L.N. Marekov, W.-M.M. Yau, R. Tycko, Characterization of beta-sheet structure in Ure2p1-89 yeast prion fibrils by solid-state nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 46 (2007) 13149-13162.
- [96] U. Baxa, N. Cheng, D.C. Winkler, T.K. Chiu, D.R. Davies, D. Sharma, H. Inouye, D.A. Kirschner, R.B. Wickner, A.C. Steven, Filaments of the Ure2p prion protein have a cross-beta core structure. *Journal of structural biology* 150 (2005) 170-179.
- [97] F. Shewmaker, R.B. Wickner, R. Tycko, Amyloid of the prion domain of Sup35p has an in-register parallel β -sheet structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (2006) 19754-19759.
- [98] C.Y. King, P. Tittmann, H. Gross, R. Gebert, M. Aebi, K. Wuthrich, Prion-inducing domain 2-114 of yeast Sup35 protein transforms in vitro into amyloid-like filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997) 6618-6622.
- [99] J.R. Glover, A.S. Kowal, E.C. Schirmer, M.M. Patino, J.J. Liu, S. Lindquist, Self-seeded fibers formed by Sup35, the protein determinant of [PSI⁺], a heritable prion-like factor of *S. cerevisiae*. *Cell* 89 (1997) 811-819.
- [100] K.L. Taylor, N. Cheng, R.W. Williams, A.C. Steven, R.B. Wickner, Prion domain initiation of amyloid formation in vitro from native Ure2p. *Science* 283 (1999) 1339-1343.
- [101] N. Luckgei, A.K. Schütz, L. Bousset, B. Habenstein, Y. Sourigues, C. Gardiennet, B.H. Meier, R. Melki, A. Böckmann, The Conformation of the Prion Domain of Sup35 p in Isolation and in the Full-Length Protein. *Angewandte Chemie International Edition* 52 (2013) 12741-12744.
- [102] F. Shewmaker, D. Kryndushkin, B. Chen, R. Tycko, R.B. Wickner, Two prion variants of Sup35p have in-register parallel beta-sheet structures, independent of hydration. *Biochemistry* 48 (2009) 5074-5082.
- [103] D.S. Kryndushkin, R.B. Wickner, R. Tycko, The core of Ure2p prion fibrils is formed by the N-terminal segment in a parallel cross- β structure: evidence from solid-state NMR. *Journal of molecular biology* 409 (2011) 263-277.
- [104] F. Shewmaker, E.D. Ross, R. Tycko, R.B. Wickner, Amyloids of shuffled prion domains that form prions have a parallel in-register beta-sheet structure. *Biochemistry* 47 (2008) 4000-4007.
- [105] U. Baxa, K.L. Taylor, J.S. Wall, M.N. Simon, N. Cheng, R.B. Wickner, A.C. Steven, Architecture of Ure2p prion filaments: the N-terminal domains form a central core fiber. *J Biol Chem* 278 (2003) 43717-43727.
- [106] B. Chen, K.R. Thurber, F. Shewmaker, R.B. Wickner, R. Tycko, Measurement of amyloid fibril mass-per-length by tilted-beam transmission electron microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (2009) 14339-14344.
- [107] R. Diaz-Avalos, C.Y. King, J. Wall, M. Simon, D.L. Caspar, Strain-specific morphologies of yeast prion amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 10165-10170.
- [108] C. Ritter, M.-L.L. Maddelein, A.B. Siemer, T. Lühns, M. Ernst, B.H. Meier, S.J. Saupé, R. Riek, Correlation of structural elements and infectivity of the HET-s prion. *Nature* 435 (2005) 844-848.

- [109] A.B. Siemer, C. Ritter, M.O. Steinmetz, M. Ernst, R. Riek, B.H. Meier, ^{13}C , ^{15}N resonance assignment of parts of the HET-s prion protein in its amyloid form. *Journal of biomolecular NMR* 34 (2006) 75-87.
- [110] C. Wasmer, A. Lange, H. Van Melckebeke, A.B. Siemer, R. Riek, B.H. Meier, Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. *Science* 319 (2008) 1523-1526.
- [111] H. Müller, O. Brener, O. Andreatti, T. Piechatzek, D. Willbold, G. Legname, H. Heise, Progress towards structural understanding of infectious sheep PrP-amyloid. *Prion* 8 (2014) 344-358.
- [112] J.E. Scott, Phosphotungstate: a "universal" (nonspecific) precipitant for polar polymers in acid solution. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 19 (1971) 689-691.
- [113] W. Qiang, K. Kelley, R. Tycko, Polymorph-specific kinetics and thermodynamics of β -amyloid fibril growth. *Journal of the American Chemical Society* 135 (2013) 6860-6871.
- [114] A. Hawe, M. Sutter, W. Jiskoot, Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharmaceutical research* 25 (2008) 1487-1499.
- [115] H. Müller, L. Stitz, H. Wille, S.B. Prusiner, D. Riesner, Influence of water, fat, and glycerol on the mechanism of thermal prion inactivation. *The Journal of biological chemistry* 282 (2007) 35855-35867.
- [116] *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Springer US, 1996.
- [117] O.V. Bocharova, N. Makarava, L. Breydo, M. Anderson, V.V. Salnikov, I.V. Baskakov, Annealing prion protein amyloid fibrils at high temperature results in extension of a proteinase K-resistant core. *Journal of Biological Chemistry* 281 (2006) 2373-2379.
- [118] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.
- [119] B. Vincent, E. Paitel, Y. Frobert, S. Lehmann, J. Grassi, F. Checler, Phorbol ester-regulated cleavage of normal prion protein in HEK293 human cells and murine neurons. *J Biol Chem* 275 (2000) 35612-35616.
- [120] A.M. Haeberle, C. Ribaut-Barassin, G. Bombarde, J. Mariani, G. Hunsmann, J. Grassi, Y. Bailly, Synaptic prion protein immuno-reactivity in the rodent cerebellum. *Microsc Res Tech* 50 (2000) 66-75.
- [121] E.J. Ambrose, A surface contact microscope for the study of cell movements. *Nature* 178 (1956) 1194.
- [122] D. as, P. Klapetek, Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. *Open Physics* 10 (2012) 181-188.
- [123] N. Bloembergen, On the interaction of nuclear spins in a crystalline lattice. *Physica* (1949).
- [124] K. Takegoshi, S. Nakamura, T. Terao, ^{13}C - ^1H dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *Chemical Physics Letters* (2001).
- [125] R. Verel, M. Ernst, B.H. Meier, Adiabatic dipolar recoupling in solid-state NMR: the DREAM scheme. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif : 1997)* 150 (2001) 81-99.
- [126] N.C. Nielsen, H. Bildso, H.J. Jakobsen, Double-quantum homonuclear rotary resonance: Efficient dipolar recovery in magic-angle spinning nuclear magnetic resonance. *J Chem Phys* (1994).
- [127] T. Karlsson†, J.M. Popham†, J.R. Long, N. Oylar∇, G.P. Drobny*†, A Study of Homonuclear Dipolar Recoupling Pulse Sequences in Solid-State Nuclear Magnetic Resonance. *Journal of the American Chemical Society* 125 (2003) 7394-7407.

- [128] V. Chevelkov, K. Giller, S. Becker, A. Lange, Efficient CO–CA transfer in highly deuterated proteins by band-selective homonuclear cross-polarization. *Journal of Magnetic Resonance* 230 (2013) 205-211.
- [129] V. Chevelkov, C. Shi, H. Fasshuber, S. Becker, A. Lange, Efficient band-selective homonuclear CO–CA cross-polarization in protonated proteins. *Journal of Biomolecular NMR* 56 (2013) 303-311.
- [130] C. Shi, H.K. Fasshuber, V. Chevelkov, S. Xiang, B. Habenstein, S. Vasa, S. Becker, A. Lange, BSH-CP based 3D solid-state NMR experiments for protein resonance assignment. *Journal of biomolecular NMR* 59 (2014) 15-22.
- [131] F. Delaglio, S. Grzesiek, G.W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, A. Bax, NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of biomolecular NMR* 6 (1995) 277-293.
- [132] W.F. Vranken, W. Boucher, T.J. Stevens, R.H. Fogh, A. Pajon, M. Llinas, E.L. Ulrich, J.L. Markley, J. Ionides, E.D. Laue, The CCPN data model for NMR spectroscopy: development of a software pipeline. *Proteins* 59 (2005) 687-696.
- [133] D.S. Wishart, C.G. Bigam, A. Holm, R.S. Hodges, B.D. Sykes, ¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *Journal of biomolecular NMR* 5 (1995) 67-81.
- [134] A.L. Morris, M.W. MacArthur, E.G. Hutchinson, J.M. Thornton, Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins* 12 (1992) 345-364.
- [135] B.L. Sibanda, T.L. Blundell, J.M. Thornton, Conformation of beta-hairpins in protein structures. A systematic classification with applications to modelling by homology, electron density fitting and protein engineering. *Journal of molecular biology* 206 (1989) 759-777.
- [136] L.E. Orgel, Prion replication and secondary nucleation. *Chemistry & biology* 3 (1996) 413-414.
- [137] H.H. Bauer, U. Aebi, M. Häner, R. Hermann, M. Müller, H.P. Merkle, Architecture and polymorphism of fibrillar supramolecular assemblies produced by in vitro aggregation of human calcitonin. *Journal of structural biology* 115 (1995) 1-15.
- [138] M. Fändrich, J. Meinhardt, N. Grigorieff, Structural polymorphism of Alzheimer Aβ and other amyloid fibrils. *Prion* 3 (2009) 89-93.
- [139] J. Meinhardt, C. Sachse, P. Hortschansky, N. Grigorieff, M. Fändrich, Aβ(1-40) fibril polymorphism implies diverse interaction patterns in amyloid fibrils. *Journal of molecular biology* 386 (2009) 869-877.
- [140] C.S. Goldsbury, G.J. Cooper, K.N. Goldie, S.A. Müller, E.L. Saafi, W.T. Gruijters, M.P. Misur, A. Engel, U. Aebi, J. Kistler, Polymorphic fibrillar assembly of human amylin. *Journal of structural biology* 119 (1997) 17-27.
- [141] J.L. Jiménez, G. Tennent, M. Pepys, H.R. Saibil, Structural diversity of ex vivo amyloid fibrils studied by cryo-electron microscopy. *Journal of molecular biology* 311 (2001) 241-247.
- [142] J. Madine, E. Jack, P.G. Stockley, S.E. Radford, L.C. Serpell, D.A. Middleton, Structural insights into the polymorphism of amyloid-like fibrils formed by region 20-29 of amylin revealed by solid-state NMR and X-ray fiber diffraction. *Journal of the American Chemical Society* 130 (2008) 14990-15001.
- [143] A.K. Paravastu, R.D. Leapman, W.M. Yau, R. Tycko, Molecular structural basis for polymorphism in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 18349-18354.
- [144] A.T. Petkova, R.D. Leapman, Z. Guo, W.-M. Yau, M.P. Mattson, R. Tycko, Self-propagating, molecular-level polymorphism in Alzheimer's β-amyloid fibrils. *Science* 307 (2005) 262-265.

- [145] J.S. Pedersen, D. Dikov, J.L. Flink, H.A. Hjuler, G. Christiansen, D.E. Otzen, The changing face of glucagon fibrillation: structural polymorphism and conformational imprinting. *Journal of molecular biology* 355 (2006) 501-523.
- [146] P. Parchi, W. Zou, W. Wang, P. Brown, S. Capellari, B. Ghetti, N. Kopp, W.J. Schulz-Schaeffer, H.A. Kretzschmar, M.W. Head, J.W. Ironside, P. Gambetti, S.G. Chen, Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000) 10168-10172.
- [147] R.K. Harris, Quantitative aspects of high-resolution solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Analyst* (1985).
- [148] G.A. Stephenson, R.A. Forbes, S.M. Reutzel-Edens, Characterization of the solid state: quantitative issues. *Advanced drug delivery reviews* 48 (2001) 67-90.
- [149] M.A. Wälti, F. Ravotti, H. Arai, C.G. Glabe, J.S. Wall, A. Böckmann, P. Güntert, B.H. Meier, R. Riek, Atomic-resolution structure of a disease-relevant A β (1-42) amyloid fibril. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (2016) 84.
- [150] F. Weirich, L. Gremer, E.A. Mirecka, S. Schiefer, W. Hoyer, H. Heise, Structural Characterization of Fibrils from Recombinant Human Islet Amyloid Polypeptide by Solid-State NMR: The Central FGAILS Segment Is Part of the β -Sheet Core. *PloS one* 11 (2016).
- [151] D. Wade, Deuterium isotope effects on noncovalent interactions between molecules. *Chemico-biological interactions* (1999).
- [152] N. Makarava, I.V. Baskakov, The Same Primary Structure of the Prion Protein Yields Two Distinct Self-propagating States. *Journal of Biological Chemistry* 283 (2008) 15988-15996.
- [153] B. Reif, Ultra-high resolution in MAS solid-state NMR of perdeuterated proteins: implications for structure and dynamics. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif : 1997)* 216 (2012) 1-12.
- [154] A.S. Maltsev, J. Ying, A. Bax, Deuterium isotope shifts for backbone ^1H , ^{15}N and ^{13}C nuclei in intrinsically disordered protein α -synuclein. *Journal of Biomolecular NMR* 54 (2012) 181-191.
- [155] C. Govaerts, H. Wille, S.B. Prusiner, F.E. Cohen, Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004) 8342-8347.
- [156] W. Hoyer, H. Heise, What Does Solid-State NMR Tell Us about Amyloid Structures?, in: D. Otzen (Ed.) *Amyloid Fibrils and Prefibrillar Aggregates*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013, pp. 39-61.
- [157] R. Tycko, Solid-state NMR studies of amyloid fibril structure. *Annu Rev Phys Chem* 62 (2011) 279-299.
- [158] B.H. Meier, A. Böckmann, The structure of fibrils from 'misfolded' proteins. *Curr Opin Struct Biol* 30 (2015) 43-49.
- [159] H. Van Melckebeke, C. Wasmer, A. Lange, E. Ab, A. Loquet, A. Böckmann, B.H. Meier, Atomic-Resolution Three-Dimensional Structure of HET-s(218-289) Amyloid Fibrils by Solid-State NMR Spectroscopy. *J Am Chem Soc* 132 (2010) 13765-13775.
- [160] A.K. Schütz, T. Vagt, M. Huber, O.Y. Ovchinnikova, R. Cadalbert, J. Wall, P. Güntert, A. Böckmann, R. Glockshuber, B.H. Meier, Atomic-Resolution Three-Dimensional Structure of Amyloid β Fibrils Bearing the Osaka Mutation. *AngewChem Int Ed* 54 (2015) 331-335.
- [161] M.D. Tuttle, G. Comellas, A.J. Nieuwkoop, D.J. Covell, D.A. Berthold, K.D. Kloepper, J.M. Courtney, J.K. Kim, A.M. Barclay, A. Kendall, W. Wan, G. Stubbs,

- C.D. Schwieters, V.M.Y. Lee, J.M. George, C.M. Rienstra, Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human [alpha]-synuclein. *Nat Struct Mol Biol* 23 (2016) 409-415.
- [162] M.T. Colvin, R. Silvers, Q.Z. Ni, T.V. Can, I. Sergeyev, M. Rosay, K.J. Donovan, B. Michael, J. Wall, S. Linse, R.G. Griffin, Atomic Resolution Structure of Monomorphic A β 42 Amyloid Fibrils. *J Am Chem Soc* 138 (2016) 9663-9674.
- [163] R. Linser, M. Dasari, M. Hiller, V. Higman, U. Fink, J.M. Lopez del Amo, S. Markovic, L. Handel, B. Kessler, P. Schmieder, D. Oesterhelt, H. Oschkinat, B. Reif, Proton-detected solid-state NMR spectroscopy of fibrillar and membrane proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* 50 (2011) 4508-4512.
- [164] R. Linser, U. Fink, B. Reif, Narrow carbonyl resonances in proton-diluted proteins facilitate NMR assignments in the solid-state. *Journal of biomolecular NMR* (2010).
- [165] R. Linser, U. Fink, B. Reif, Proton-detected scalar coupling based assignment strategies in MAS solid-state NMR spectroscopy applied to perdeuterated proteins. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif : 1997)* 193 (2008) 89-93.
- [166] G. Bertani, Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 62 (1951) 293-300.
- [167] I. Mehlhorn, D. Groth, J. Stöckel, B. Moffat, D. Reilly, D. Yansura, W.S. Willett, M. Baldwin, R. Fletterick, F.E. Cohen, R. Vandlen, D. Henner, S.B. Prusiner, High-level expression and characterization of a purified 142-residue polypeptide of the prion protein. *Biochemistry* 35 (1996) 5528-5537.
- [168] (!!! INVALID CITATION !!!).
- [169] P. Tekely, Malcolm H. Levitt. *Spin dynamics: basics of nuclear magnetic resonance*. John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2001, 686 pp. Price £34.95. ISBN 0-471-48921-2. *Magnetic Resonance in Chemistry* 40 (2002) 800-800.
- [170] E.L. Hahn, Spin Echoes. *Physical Review* 80 (1950) 580-594.
- [171] M. Hochuli, T. Szyperski, K. Wüthrich, Deuterium isotope effects on the central carbon metabolism of *Escherichia coli* cells grown on a D₂O-containing minimal medium. *Journal of biomolecular NMR* (2000).
- [172] U. Akbey, S. Lange, W. Trent Franks, R. Linser, K. Rehbein, A. Diehl, B.-J.J. van Rossum, B. Reif, H. Oschkinat, Optimum levels of exchangeable protons in perdeuterated proteins for proton detection in MAS solid-state NMR spectroscopy. *Journal of biomolecular NMR* 46 (2010) 67-73.

Anhang

Tabelle S 1: Chemische Verschiebungen der Spinsysteme der ersten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen

Spin System #	Residue	N (ppm)	CO (ppm)	C α (ppm)	C β (ppm)	C γ 1 (ppm)	C γ 2 (ppm)	C δ 1 (ppm)	C δ 2 (ppm)	C ϵ 1 (ppm)	C ζ 1 (ppm)	$\delta\Delta$ (ppm)	
1108	A1	127,64		49,82	21,86							-5,44	
1109	A2	126,57	175,04	49,69	21,48							-5,20	
1110	A3	126,63		49,73	21,48							-5,15	
1155	A4	129,79		50,71	21,87							-4,56	
1425	A5	129,54		51,43	21,08							-3,05	
1111	A6	129,96	173,56	50,70	20,38							-3,08	
1153	A7	131,72		52,05	19,84							-1,19	
1113	A8	122,09	173,63	51,86	17,22							1,24	
1114	A9	123,47	178,14	53,97	17,93							2,64	
1170	R1	119,91		55,63	30,14	28,52						0,40	
1134	R2	120,27		56,76	29,40	26,76		43,40			159,48	2,26	
1086	D/N1	120,21		53,92	45,17	177,96						-4,35	-5,45
1156	D/N2	124,69	174,51	53,47	43,18	177,88						-2,81	-3,91
1082	D/N3	124,92	173,75	54,27	43,17	179,12						-2,00	-3,10
1167	D/N4	125,84		52,15	41,00	177,01						-1,95	-3,05
1157	D/N5	122,04		55,23	42,48	179,36						-0,34	-1,44
1168	D/N6	124,37	175,79	55,54	42,25							0,19	-0,91
1078	D/N7	121,57		54,36	40,17	179,55						1,09	-0,01
1162	D/N8	119,85		55,17	40,98	177,88						1,09	-0,01

1129	E/Q1	125,31	173,71	54,34	33,04	36,15			-5,40	-5,00
1165	E/Q2	123,03	174,07	53,92	31,40	34,09	179,90		-4,17	-3,77
1169	E/Q3	123,18		53,98	31,09	34,20	178,88		-3,81	-3,41
1123	E/Q4	120,36		53,93	29,97	35,28			-2,74	-2,34
1151	E/Q5	121,35		53,56	29,11	33,63			-2,25	-1,85
1166	E/Q6	119,30	174,77	55,38	30,25	34,03	177,92		-1,57	-1,17
1138	E/Q7	122,50	175,75	56,66	29,28	33,37			0,68	1,08
1177	G1	112,50	171,62	44,60						
1179	G2	106,89	175,16	44,09						
1183	G3	111,18	175,22	45,36						
1187	G4	106,03	174,58	43,22						
1398	G5	110,18	173,24	46,54						
1399	G6	110,58	173,15	46,35						
1400	G7	111,72	176,88	46,31						
1401	G8	113,21	174,83	44,44						
1404	G9	107,56	173,03	43,86						
1405	G10	106,09	174,21	44,62						
1406	G11	106,99	172,66	45,42						
1408	G12	103,74	174,01	45,11						
1409	G13	114,23	173,89	44,23						
1412	G14	107,86	175,07	45,04						
1413	G15	105,66	176,73	45,30						
1415	G16	112,60	175,93	46,08						
1416	G17	112,50	171,06	45,81						
1417	G18	106,56	174,21	46,04						
1418	G19	105,76	174,08	46,05						
1419	G20	104,47	174,23	46,27						
1158	H1	124,60		55,40	33,65	129,29	118,44	137,34	-4,25	

1137	H2	117,36	173,95	53,97	30,01	133,13			119,31	137,28	-2,04
1178	H3	126,03	174,38	54,56	28,95	131,26			119,41		-0,39
1092	H4	125,88		57,49	30,61	133,07			119,45		0,88
1175	H5	126,95	174,68	58,83	29,02						3,80
981	I1	122,07		59,63	42,81	27,45	17,21	13,99			-5,48
984	I2	117,40	173,65	59,88	41,72	27,58	17,42	13,13			-4,15
978	I3	124,47		60,13	41,91	27,33	17,43	14,11			-4,09
977	I4	126,15		59,99	40,42	27,51	16,97	12,89			-2,73
1149	L1	123,98		52,77	44,58	28,01		25,10			-4,51
1098	L2	120,54		53,83	45,19	28,97		22,52			-4,06
1097	L3	119,89	173,42	55,46	43,16	28,79		23,16			-0,40
1136	K1	118,08	172,56	53,75	33,20	23,73		26,72			-2,55
1152	K2	126,11		54,01	33,40	22,16		25,95	40,10		-2,49
1181	M1	119,50		53,12	34,46	31,50					-3,84
1182	M2	124,37		53,85	32,91	30,99					-1,56
1148	M3	118,99		55,20	33,94	30,14			17,04		-1,24
1147	M4	119,25		58,38	33,62	31,88			17,39		2,27
951	S1			55,30	65,42						-4,62
1184	S2	115,68		56,98	65,14						-2,66
10	S3	118,01		56,69	64,56						-2,37
11	S4			57,67	63,66						-0,49
1171	S5			57,67	63,08						0,09
1172	S6			58,81	63,92						0,39
952	S7			58,14	61,99						1,65
968	T1	126,88		60,79	70,68		21,91				-1,88
969	T2	125,74	175,70	61,21	70,46		21,50				-1,25
970	T3	130,60		61,49	70,59		21,27				-1,10
974	T4	125,65		61,95	71,04		21,19				-1,09

1174	T5	125,73		61,20	70,22					-1,02	
967	T6	124,37		61,00	69,94		21,11			-0,94	
972	T7	126,13		61,61	70,48		23,46			-0,87	
1062	F/Y1	118,12		57,03	42,39					-3,46	-4,46
1161	F/Y2	122,56		54,13	39,32	*		*		-3,29	-4,29
1073	F/Y3	115,79	174,23	56,96	41,43	*		*		-2,57	-3,57
1160	F/Y4	123,23		54,93	39,13	*		*		-2,29	-3,29
1075	F/Y5	115,83		55,80	39,15	*		*		-1,45	-2,45
1077	F/Y6	114,05		58,16	40,55	*		*		-0,49	-1,49
1052	F/Y7	123,82		57,14	38,37	*		*		0,67	-0,33
1180	V1	128,11		60,57	38,43					-7,15	
1142	V2	120,23		60,65	38,43	21,64				-7,08	
1008	V3	121,73		58,88	36,12					-6,54	
1000	V4	118,21		59,89	37,03					-6,44	
992	V5	118,70		58,99	35,77	22,46				-6,07	
1143	V6	122,17	176,76	60,56	36,95					-5,69	
1007	V7	123,02		59,51	34,86					-4,64	
1141	V8	126,62	172,66	61,49	36,72					-4,53	
991	V9	125,38	174,46	60,16	34,66					-3,80	
990	V10	124,90	175,29	60,62	35,01					-3,69	
988	V11	126,74		60,69	34,72					-3,33	
1144	V12	122,67		61,41	33,66					-1,54	
986	V13	116,89		60,82	32,35	19,55				-0,82	
1146	V14	118,91		65,82	31,92	20,76				4,60	

Tabelle S 2: Chemische Verschiebungen der Spinsysteme der dritten Generation Keim-induzierter Prion-Fibrillen

Spin System #	Residue	N (ppm)	CO (ppm)	C α (ppm)	C β (ppm)	$\delta\Delta$ (ppm)	
1191	A1	120,62		50,84	23,57	-6,12	
1210	A2	126,56		50,56	23,06	-5,90	
1189	A3	117,54		50,32	22,61	-5,69	
1238	A4	123,07		50,85	22,73	-5,27	
1236	A5	121,18		50,83	22,65	-5,23	
1188	A6	119,12		50,45	22,04	-4,99	
1190	A7	121,98		50,68	21,77	-4,50	
1192	A8	125,44		50,70	21,49	-4,19	
1207	A9	120,95		51,36	21,50	-3,54	
1206	A10	125,59		51,89	20,64	-2,15	
1241	A11	126,57		52,43	18,44	0,59	
1242	A12	126,30		54,03	16,11	4,52	
764	R1	126,04		53,14	32,38	-4,34	
770	R2	124,70		54,87	33,30	-3,53	
1341	D1	121,52	174,01	51,83	43,34	-4,60	
1332	D2	117,41	175,25	53,81	38,86	1,84	
1339	N1	117,47	175,06	52,12	41,52	-3,60	
1369	N2	122,90	174,31	52,97	41,41	-2,64	
1347	N3	121,63	174,16	51,47	39,80	-2,53	
707	N4	123,61	174,54	54,34	42,08	-1,93	
1331	N5	118,99	174,28	52,54	39,96	-1,62	
1308	N6	119,74	175,64	56,51	39,24	3,07	
1368	D/N1	123,21		52,04	43,37	-4,43	-5,53
666	D/N2	120,16		52,21	43,21	-4,10	-5,20
1343	D/N3	114,41		50,93	41,89	-4,06	-5,16
1329	D/N4	127,65		51,83	42,31	-3,59	-4,69
660	D/N5	115,99		52,44	42,80	-3,46	-4,56
1346	D/N6	123,41		52,52	41,86	-2,44	-3,54
658	D/N7	127,18		51,85	41,02	-2,27	-3,37
1358	D/N8	119,42		52,97	41,78	-1,91	-3,01
1348	D/N9	126,87		52,11	40,52	-1,52	-2,62
1330	D/N10	120,74		52,35	38,97	0,28	-0,82
1334	D/N11	120,45		53,06	37,80	2,15	1,05
1335	D/N12	121,96		54,00	37,85	3,05	1,95
1337	D/N13	120,70		54,50	37,53	3,87	2,77
1307	D/N14	119,60		56,01	39,02	3,89	2,79
766	E/Q1	122,87		53,88	31,30	-4,02	-3,72
677	E/Q2	121,52		54,70	30,66	-2,56	-2,26
675	E/Q3	123,93		54,61	30,30	-2,29	-1,99
676	E/Q4	118,32		54,96	28,51	-0,15	0,15
1272	G1	105,90		47,77			
1273	G2	107,39		47,21			

1274	G3	112,27		47,42		
1275	G4	102,89		47,18		
1276	G5	108,25		46,90		
1277	G6	104,06		46,79		
1278	G7	112,15		46,80		
1279	G8	110,16		46,35		
1280	G9	108,27		45,67		
1281	G10	113,90		45,54		
1282	G11	106,16		45,66		
1283	G12	103,10		45,31		
1284	G13	109,32		45,37		
1285	G14	113,14		45,24		
1286	G15	113,82		44,86		
1287	G16	112,62		45,04		
1288	G17	106,64		44,87		
1289	G18	109,68		45,05		
1290	G19	110,53		44,85		
1291	G20	107,13		44,58		
1292	G21	109,44	172,83	44,27		
1293	G22	103,83		44,34		
1294	G23	105,53	174,86	44,14		
1295	G24	106,62		43,54		
1296	G25	111,40		43,46		
1297	G26	110,87		43,15		
1298	G27	110,55		42,98		
1299	G28	111,00		42,40		
781	H1	120,82		53,41	31,40	-3,99
1385	H2	126,06	175,44	53,88	31,54	-3,66
1383	H3	118,61		55,38	31,81	-2,43
1394	H4	119,65		55,43	31,21	-1,77
1380	H5	124,57		55,51	31,24	-1,73
793	H6	121,86	175,89	56,77	31,21	-0,44
650	I1	125,57		58,94	40,67	-4,03
648	I2	119,38		60,88	42,24	-3,66
1379	I3	124,54		61,81	42,60	-3,09
651	I4	122,41		59,73	40,45	-3,02
654	I5	124,97		60,47	41,18	-3,01
1269	I6	123,78	175,23	59,73	39,17	-1,74
1270	I7	116,24		59,85	37,92	-0,37
797	I8	119,58	174,34	60,02	37,37	0,35
796	I9	123,62		61,72	38,09	1,33
1361	L1	112,47		54,59	44,46	-2,57
1360	L2	113,48		54,74	43,79	-1,74
1345	L3	121,55	175,18	53,15	42,59	-0,84
1364	L4	117,41	174,34	53,13	42,10	-0,37
1378	K1	124,24		54,18	34,88	-3,80
674	K2	126,07		55,28	35,97	-3,79

792	K3	118,42		53,91	33,70	-2,89	
673	K4	126,15		53,94	31,70	-0,86	
771	M1	125,61		54,19	34,33	-2,64	
769	M2	125,27		54,79	32,67	-0,38	
682	S1			56,46	66,05	-4,09	
683	S2			56,64	65,54	-3,40	
684	S3			56,10	64,26	-2,66	
1264	S4			55,79	63,57	-2,27	
1267	S5			56,95	64,21	-1,76	
1268	S6			57,15	63,77	-1,12	
685	S7			57,65	64,02	-0,87	
686	S8			57,44	62,88	0,06	
688	S9			57,94	63,15	0,29	
689	S10			58,27	62,74	1,04	
1218	T1	125,50		60,72	71,69	-2,98	
1222	T2	123,94		60,54	71,28	-2,74	
1224	T3	121,52		60,57	70,50	-1,93	
1225	T4	120,77		60,57	70,35	-1,78	
1221	T5	124,38		60,43	70,19	-1,76	
1229	T6	124,63		58,92	68,66	-1,75	
1214	T7	127,99		60,94	70,55	-1,61	
1213	T8	128,27		61,23	70,79	-1,56	
1223	T9	123,32		61,24	70,66	-1,42	
1219	T10	126,38		60,79	70,16	-1,37	
1228	T11	121,44		61,51	70,73	-1,23	
1215	T12	126,94		61,26	70,12	-0,87	
1227	T13	127,52		61,07	69,60	-0,53	
1216	T14	126,49		60,79	68,65	0,14	
1220	T16	123,12		61,41	69,17	0,24	
1226	T17	125,74		61,10	68,61	0,49	
697	F1	120,53	175,45	55,42	40,82	-3,30	
695	F2	122,11	174,10	56,46	41,37	-2,81	
1322	F3	126,61	174,78	57,31	41,67	-2,26	
709	F4	119,50	175,90	57,48	39,29	0,28	
1315	Y1	125,13		56,87	40,74	-2,97	
1384	Y2	120,98		58,31	37,97	1,24	
1355	F/Y1	123,43		54,41	40,76	-4,24	-5,44
1354	F/Y2	110,12		54,81	40,54	-3,63	-4,83
1325	F/Y3	117,75		56,15	41,75	-3,50	-4,70
1328	F/Y4	126,74		55,00	39,71	-2,61	-3,81
1320	F/Y5	118,19		56,03	40,47	-2,33	-3,53
1310	F/Y6	119,31		56,70	40,85	-2,05	-3,25
704	F/Y7	125,24		55,95	39,91	-1,87	-3,07
711	F/Y8	116,74		56,47	40,19	-1,62	-2,82
1319	F/Y9	121,02		55,11	38,81	-1,60	-2,80
696	F/Y10	122,00		56,86	40,56	-1,60	-2,80
1312	F/Y11	125,21		56,73	39,70	-0,87	-2,07

1323	F/Y12	116,97	56,72	39,45	-0,62	-1,82
1318	F/Y13	121,67	56,10	38,74	-0,54	-1,74
1316	F/Y14	122,76	56,46	38,45	0,11	-1,09
693	F/Y15	124,41	56,72	38,68	0,14	-1,06
1314	F/Y16	125,21	57,35	38,72	0,72	-0,48
1317	F/Y17	121,42	57,90	39,02	0,98	-0,22
1271	F/Y18	121,15	59,17	40,03	1,24	0,04
705	F/Y19	124,66	57,72	38,04	1,78	0,58
1389	V1	122,50	58,01	35,50	-6,78	
1255	V2	120,41	59,10	34,95	-5,15	
1258	V3	119,53	58,82	34,57	-5,05	
1374	V4	124,40	59,42	34,44	-4,32	
1254	V5	120,87	60,44	34,97	-3,83	
1373	V6	126,14	59,83	33,99	-3,47	
1375	V7	123,47	59,39	33,53	-3,44	
1250	V8	126,34	60,47	34,51	-3,34	
1248	V9	120,98	60,93	34,69	-3,06	
1262	V10	116,14	60,64	34,36	-3,03	
1372	V11	127,24	60,51	33,90	-2,69	
1251	V12	125,67	60,25	33,62	-2,67	
1252	V13	125,28	60,76	34,03	-2,56	
1256	V14	120,14	60,82	33,66	-2,15	
1261	V15	119,65	60,37	33,12	-2,05	
1249	V16	126,52	60,84	33,22	-1,68	
1253	V17	122,48	60,69	32,97	-1,59	
1423	V18		65,38	30,52	5,55	
1424	V19		66,49	30,79	6,40	

1 High yield Expression and Purification of fully labelled and
2 deuterated Ovine Recombinant Prion Protein

3

4 T. Piechatzek, C. Pohl, R. Hartmann, S. Metzger, H. Müller, B. Esters, H. Heise

5

1 Abstract

2 Scrapie is characterized by the deposition of misfolded prion protein (PrP^{Sc}) in the brain of
3 sheep and goats. A detailed structure of the disease related PrP^{Sc} amyloids is still behind
4 scope of all high resolution techniques such as x-ray crystallography, solution-state and solid-
5 state NMR. This is not only due to the fact that the PrP^{Sc} amyloids are insoluble and non-
6 crystallizable, but also comprise over 200 amino acids, which, in solid-state NMR at least,
7 makes it highly difficult to gain structural information. Therefore, improvements in sample
8 preparation are of high importance. In order to introduce proton detection we present a
9 cloning, expression and purification protocol that allows the recombinant expression of fully
10 deuterated ovine prion protein (ovrecPrP) which yields ~40 mg >99 % labelled protein per
11 liter of minimal medium. The two constructs, one with the M₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ allele and one
12 with the T₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ allele, were characterized with ESI-MS analysis and liquid-state
13 NMR spectroscopy, following solid-state NMR spectroscopy of formed ovrecPrP^{Sc} amyloids.

14 Introduction

15 Misfolded prions can cause fatal neurodegenerative diseases not only in humans, but also in
16 several different mammals. Prominent examples are bovine spongiform encephalopathy
17 (BSE) in cattle, chronic wasting disease (CWD) in elk or scrapie in sheep and goats. These
18 disorders are characterized by the conversion of the cellular prion protein (PrP^C) into the
19 misfolded and infectious isoform (PrP^{Sc})[9]. The *Prnp* gene, in sheep and goats, encodes the
20 256 amino acid ovine prion protein which possesses high sequence diversity. Common amino
21 acid polymorphisms are found at amino acid positions 112 (M/T)[23], 136 (A/V)[24], 137
22 (M/T)[25], 141(L/F)[26], 154(R/H)[24] and 171 (R/H/Q)[27]. Furthermore, only four of these
23 positions seem to influence the susceptibility for scrapie, namely 112, 136, 154 and 171. The
24 different combinations of the three positions 136, 154 and 171 would lead to twelve possible
25 alleles, though, only five are commonly seen: ARR, ARQ, AHQ, ARH and VRQ [27], where

1 VRQ and ARQ are associated with high susceptibility, AHQ and ARH with a lower
2 susceptibility, and ARR seems to be resistant to scrapie infection [27-29]. Also, the genotype
3 is of great importance for susceptibility to scrapie, e.g. genotypes with at least one VRQ-
4 allele, like ARQ/VRQ, ARH/VRQ or VRQ/VRQ are highly susceptible to scrapie
5 infection[30]. Despite the fact that the homologues ARQ/ARQ genotype is known to be
6 highly susceptible to scrapie[30], there is evidence for a further variation that even in this
7 genotype may play a role for resistance. The analysis of the M112T variation indicates a
8 prolonged survival time, suggesting a genetic resistance, even in heterozygotes, to the
9 development of classical scrapie[31]. The comprehensive structural study of both, MARQ and
10 TARQ variations may thus help to understand the critical role of the mechanism which leads
11 to the inheritable state of misfolding and the accumulation of pathogenic prion deposits. Due
12 to the fact that PrP^{Sc} amyloid fibrils are insoluble and non-crystallizable, they are not
13 amenable to X-ray crystallography and liquid-state NMR. In contrast, the structure of natively
14 folded PrP^C was determined by solution-state NMR [3]. Based on different techniques,
15 however, several structural models have been proposed [67, 70, 73, 76, 77, 155]. However,
16 the detailed structure of PrP^{Sc} amyloid fibrils and thus the conversion mechanism still remains
17 elusive. Solid-state NMR spectroscopy has developed into a promising method for structure
18 elucidation and also determination of proteins which are neither crystallizable nor soluble and
19 is thus the method of choice for structural investigation of amyloid fibrils [156-158], and in
20 favorable cases of high sample homogeneity, even atomic resolution 3D structures could be
21 obtained [149, 159-162]. However, in the case of full-length prion protein fibrils with more
22 than 200 amino acids, spectral resolution is hampered severely by spectral overlap in highly
23 populated chemical shift regions. In general, resolution may be enhanced by multidimensional
24 NMR-spectroscopy, and recent progress has been made by using perdeuterated proteins. For
25 example, Reif and co-workers showed that sequential assignments of perdeuterated A β fibrils
26 [163] could be obtained via proton detected HNCO/HNCACO [164] and HNCACB/HNCA

1 [165] experiments. The typical $^1\text{H}^{\text{N}}$ and ^{15}N linewidths of the A β fibrils were on the order of
2 90-220 Hz and 30-50 Hz for $^1\text{H}^{\text{N}}$ and ^{15}N , respectively. Essential for solid-state NMR-
3 spectroscopy of perdeuterated samples is a robust expression system which yields high
4 amounts of triply labeled protein. Here we present a cloning, expression and purification
5 protocol that allows the production of fully labelled ($^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$) and fully perdeuterated (^2H)
6 ovine recombinant prion protein (ovrecPrP) with yields up to 40 mg >99 % labelled protein
7 per liter of minimal medium in D_2O . ESI-MS analysis was used to determine the labelling
8 degree as well as to confirm the correct ovrecPrP construct. Liquid-state NMR was used to
9 characterize the H/D-exchange of ovrecPrP, and solid-state NMR to confirm the right
10 misfolding of ovrecPrP^{Sc} amyloid fibrils as well as the enhanced T_2 -relaxation. This cloning,
11 expression and purification protocol can also be used for different labelling schemes in
12 minimal medium with or without deuterium.

13 **Material and Methods**

14 *Cloning of the recombinant plasmids*

15 The pET24a(+)_ovrecPrP plasmids, M₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁ and T₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁, was constructed
16 using 685 bp DNA fragments containing the 633 bp coding sequences for the respective ovine
17 prion proteins. The vector for cloning was pET24a(+) (*Novagen*). The inserts were designed
18 using the original DNA sequence of the major prion protein of MARQ or TARQ ovine prion
19 (UniProtKB - P23907), respectively, and codon optimization for expression in *E.coli* by
20 GeneArt™ (*lifetechnologies*). The inserts were purchased from *lifetechnologies* as a DNA
21 fragment (TARQ) or as a DNA fragment inserted into a pMT-A cloning vector (MARQ).
22 Both inserts were ligated using the NdeI restriction site at the 5' end and BamHI restriction
23 site at the 3' end. The ovrecPrP sequence is tagless, as two stop codons are between the
24 coding sequence and the following His-tag region at the 3' end. After ligation of the inserts

1 into the plasmid with the respective enzymes, the plasmids were transformed into XL-1 Blue
2 cells. The plasmid DNA containing the insert was extracted by a mini-prep using the QIAprep
3 Spin Miniprep Kit (*Qiagen*). The correctness of the clone was confirmed by DNA sequencing
4 (*Eurofins*).

5 *Expression of ovrecPrP*

6 The ovrecPrP constructs were transformed into BL21(DE3) *E.coli* cells for expression. All
7 ingredients for minimal medium (M9) were prepared as stock solutions, dissolved in H₂O in
8 high concentrations to not exceed 0.5 % (v/v) when added to D₂O. For expression a single
9 fresh colony was used to grow in a 10 ml LB [166] (50 % D₂O) pre-culture for 10 h at 37 °C
10 and under agitation at 180 rpm. All media were supplied with 50 µg/ml kanamycin. A second
11 5 ml LB (100 % D₂O) pre-culture was inoculated with 100 µl of the first pre-culture for 12 h
12 at 37 °C and agitation at 180 rpm. 100 µl of the cells were centrifuged (3 min, 1.000 g),
13 washed with minimal medium, centrifuged again (3 min, 1.000 g) and then transferred into 25
14 ml minimal medium (M9, 100 % D₂O) for a third pre-culture. The cells were incubated for 12
15 h at 37 °C and agitation at 180 rpm, and then separated into 5 ml aliquots, centrifuged,
16 washed with minimal medium, centrifuged again and then transferred into 0,5 l of minimal
17 medium (M9, 100 % D₂O) main culture containing 0.5 g/l ¹⁵NH₄Cl and 2 g/l ²H, ¹³C-glucose.
18 Cells required 13 – 17 h to reach an OD₆₀₀ between 0.7 and 0.9. 1 mM Isopropyl-beta-D-
19 thiogalactopyranoside (IPTG) was added to induce the expression. The cultures were grown
20 for 24 h at 37 °C and 180 rpm. Subsequently, the cells were harvested at 5.000 g for 15 min.
21 Approximately 2.5 g cells were obtained from 0.5 l of culture.

22

23 *Extraction of inclusion bodies and purification of the ovrecPrP*

1 The purification is based on the protocol from Melhorn et al. [167], adapted and optimized for
2 full-length ovine PrP. After centrifugation, the cells were washed twice with 50 ml (per 5 g
3 cells) buffer solution containing 25 mM Tris HCl, 5 mM EDTA at pH 8,0, and centrifuged for
4 15 min at 4.500 g. At this point the cells may be stored at -20 °C. Cells were resuspended in
5 12.5 ml TET buffer (50 mM Tris HCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100) and shock-frozen
6 twice at -80 °C. Lysozyme to a final concentration of 100 µg/ml was added and incubated at
7 37 °C for 30 min. After adding DNaseI (grade 2) to a final concentration of 10 µg/ml, the
8 cells were incubated again at 37 °C for 30 min and then lysed by sonication on ice (5x 1 min,
9 1 s pulse, 1 s pause, sonication power: 100 W). The inclusion bodies were separated from the
10 cell debris by centrifugation for 30 min at 15.000 g. The pellet containing PrP as inclusion
11 bodies was then washed with buffer solution containing 12.5 ml 12.5 mM Tris HCl, 5 mM
12 EDTA pH 8.0 and centrifuged for 30 min at 15.000 g. Subsequently, the inclusion bodies
13 were dissolved in buffer solution containing 8 ml M GnHCl, 12,5 mM Tris HCl, 100 mM
14 DTT at pH 8,0, and incubated for 1h before submitted to centrifugation to remove remaining
15 debris. OvrecPrP was then separated by size exclusion chromatography (SEC) employing a 26
16 mm x 60 cm HiLoad Superdex 200 column, eluting with 6 M Guanidinihydrochlorid, 12,5
17 mM Tris, pH 8 at a flow rate of 2.7 ml/min. The fractions containing the ovrecPrP were
18 pooled and further purified by reversed phase high-performance liquid chromatography (RP-
19 HPLC) using a 25 mm x 25 cm C-4 column and a gradient of buffer 1. H₂O/0.1 % TFA and
20 buffer 2. Acetonitrile/0.1 % TFA at a flow rate of 5 ml/min. OvrecPrP was typically found in
21 fractions containing ~32 % acetonitrile. The purified ovrecPrP was then lyophilized and
22 stored at 4 °C until further use. A total amount of roughly 40 mg of protein per liter minimal
23 medium was obtained for both ovrecPrP constructs.

24 *SDS-PAGE and Western Blot*

1 SDS polyacrylamide gel electrophoresis according to Laemmli was performed using 10 %
2 SDS gel. The gels were fixed and stained for 1 h in a Coomassie staining solution containing
3 45 % methanol, 10 % acetic acid and 0.5 g Coomassie blue. Subsequently, the gels were
4 washed with de-ionized water, and de-stained for 20 min with 45 % methanol and 10 % acetic
5 acid. The gels were stored in a plastic wrap.

6 *Mass spectrometry*

7 OvrecPrP MARQ and TARQ samples were subjected to mass spectrometry after
8 lyophilisation. Samples were resuspended in 60 % MeOH with 5% formic acid. The ESI-MS
9 analysis was performed using a tandem hybrid mass spectrometer, ESI-QqTOF (QSTAR XL,
10 Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) equipped with an offline nanospray ion source
11 (Proxeon Biosystems, Denmark). Mass spectra were typically measured in a mass range 600 –
12 2000 m/z. The ESI-MS spectra were reconstructed using the deconvolution algorithm
13 included in the analysis software Anlayst QS version 1.1 (Applied Biosystems, Darmstadt,
14 Germany).

15 *Seeded Fibrillation of ovrecPrP for Solid-State NMR*

16 Seeded fibrillation and sample preparation was carried out as described before[111], but in the
17 absence of thioflavin T (ThT). Further, to obtain fibrils in which 30 % of exchangeable proton
18 sites are occupied by ^1H , the lyophilized protein was dissolved in buffer with a proton content
19 of 30 %. Likewise, the buffer solution for fibrillation had a proton content of 30 %. For
20 monitoring the fibrillation kinetics, a 150 μl 1:10 dilution of sample with fibrillation buffer
21 containing a final concentration of 5 μM ThT was subjected to the ThT-fluorescence assay on
22 a daily bases. For solid-state NMR 10 mg of seeded fibrils of each ovrecPrP polymorph were
23 prepared containing 30 % protons at exchangeable sites.

24 *Liquid-State NMR*

1 Samples for liquid-state NMR were prepared regarding to the protocol of Lysek et al. [3]. One
2 dimensional ^1H -NMR spectra and two dimensional ^{15}N -HSQC spectra were recorded using
3 standard pulse sequences with a Bruker AV III HD 600 spectrometer equipped with a QCI
4 cryo-probe. For the ^1H -NMR experiment excitation sculpting was used for water suppression,
5 a sweep width of 9.000 Hz and 32 K data points were collected. The sweep width for the ^{15}N -
6 HSQC was 9000 Hz for the proton dimension and 2500 Hz for ^{15}N dimension. Two thousand
7 data points were collected in F2, and 256 data points using States-TPPI in F1. All spectra
8 were recorded at 25 °C.

9 *Solid-State NMR*

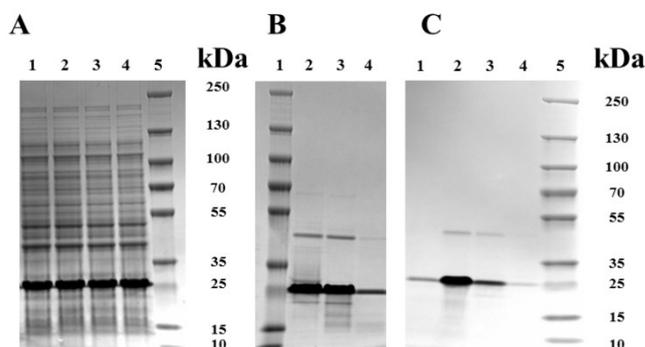
10 All solid-state NMR spectra were recorded using a 600 MHz Agilent narrow bore
11 spectrometer equipped with a 3.2 mm triple resonance (^1H , ^{13}C , ^{15}N) probe head. ^{13}C direct
12 excitation experiments were recorded at 24 kHz or 11 kHz and with or without high power
13 (~80 kHz) proton decoupling, HC-CP experiments were recorded at 24 kHz with or without
14 high power (~80 kHz) proton decoupling, T_2 -relaxation measurements were recorded at
15 spinning speeds of 14 kHz MAS frequency. Cooling gas was adjusted resulting in a sample
16 temperature of 10 °C \pm 5 °C. Adamantane was used for referencing ^{13}C and ^{15}N chemical
17 shifts. Data sets were processed with NMRPipe using shifted sine-bell squared functions, and
18 data analysis was done with CCPNmr[132].

19 **Results**

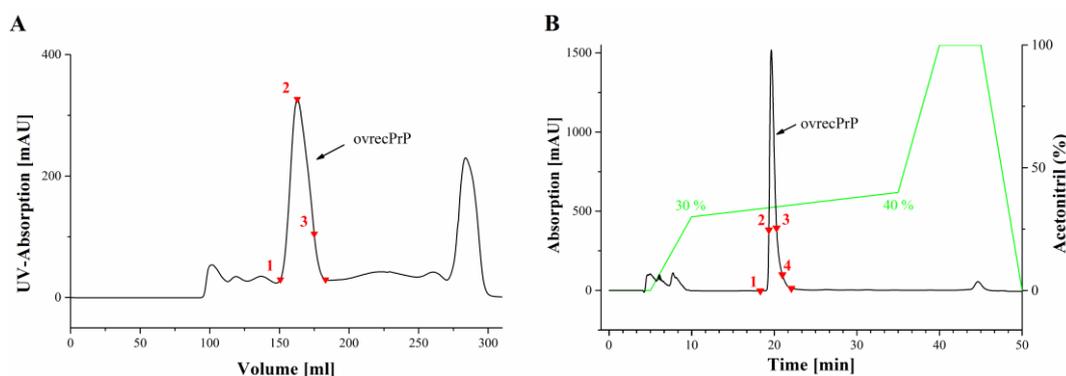
20 The existing expression and purification protocols allow the production of $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ uniformly
21 isotopically labeled PrP, but limited cell growth and protein expression render perdeuterated
22 expression unfavorable. Our biochemical protocol is optimized for high yield expression of
23 ovine PrP, achieving a high grade isotopically enrichment (>99 %) and of high purity (>95 %)
24 for the two variations ovrecPrP(M₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁) and ovrecPrP(T₁₁₂A₁₃₆R₁₅₄Q₁₇₁). The

1 ovrecPrP plasmid is used for non-tagged expression, making use of the deposition of
2 ovrecPrP in inclusion bodies, straight forward non-native purification and simple refolding.
3 Construction of the gene fragment carrying the coding sequence was done by using the
4 respective DNA sequence (UniProtKB - P23907) for the major prion protein (25-233). To fit
5 the requirements for expression of eukaryotic genes, such as codons used for bacterial tRNA,
6 the DNA sequence was codon optimized with the GeneOptimizer™ technology (*Thermo*
7 *Fisher Scientific*). After cloning the respective gene insert into the pET24a(+) vector
8 (*Novagen*), the plasmids were transformed by heat shock transformation into BL21(DE3)
9 competent cells. To familiarize the *E.coli* cells to growth in M9 media with 100 % D₂O, cells
10 were first grown in LB medium containing 50 % D₂O, centrifuged and washed, and
11 transferred into LB medium containing 100 % D₂O. Subsequently, the cells were transferred
12 to M9 medium containing 100 % D₂O for the last pre-culture before setting up the main
13 culture, also M9 medium containing 100 % D₂O. Pre-culture cells were grown to an OD₆₀₀ of
14 0.4 - 0.6, and the main culture to an OD₆₀₀ of 0.6 – 0.9 before induction with 1 mM IPTG.
15 Induced cells were incubated for 24 h at 37 °C reaching an OD₆₀₀ of 2.4 – 3.0. Cells were
16 harvested and centrifuged before cell lysis. Protein expression levels were tracked by SDS-
17 PAGE. The large protein band at ~25 kDa is corresponding to the ovrecPrP (Figure 1 A). The
18 IBs containing the ovrecPrP were separated from the cell debris by centrifugation, directly
19 after cell lysis, and subjected to size exclusion chromatography. Figure 2 A shows a typical
20 chromatogram of 5 ml sample injected into a Superdex 200 (26 x 600 mm) column with
21 typical elution volume of the ovrecPrP of ~ 160 ml. The main peak fractions (Figure 2A)
22 were monitored with SDS-PAGE to confirm the ovrecPrP elution (Figure 1B, lane 2-4).
23 Subsequently, the ovrecPrP is subjected to RP-HPLC. Roughly 5 mg protein is loaded onto a
24 C8-column and eluted with an acetonitrile gradient as shown in Figure 2B. The ovrecPrP elutes
25 as a single peak at an acetonitrile concentration of 33.5-34.5%. Elution and pureness of the
26 main peak fraction containing the ovrecPrP were monitored by SDS-PAGE (Figure 1C, lane

1 1-4). Finally, the main peak fractions containing the ovrecPrP were dried by lyophilisation
 2 and stored at 4 °C until further use.



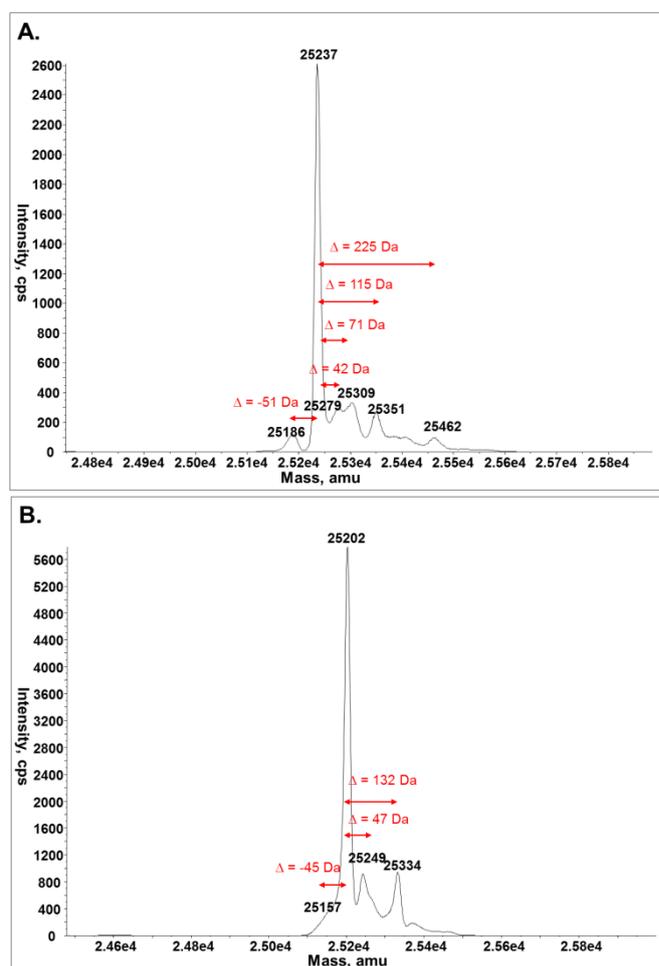
3
 4 **Figure 1:** ovrecPrP(TARQ) purification monitored by SDS-PAGE. (A) 4 different (flasks) lysates of induced BL21(DE3)
 5 after 24 h expression containing ovrecPrP(TARQ) (~25 kDa) (1-4), protein maker. (B) Main peak fractions from size
 6 exclusion chromatography (SEC) (2-4), protein marker (1). (C) Main peak fractions after RP-HPLC (1-4), protein marker (5).



7
 8 **Figure 2:** ovrecPrP(TARQ) purification (A) SEC of ovrecPrP(TARQ) with 26 mm x 600 mm HiLoad Superdex 200 column,
 9 ovrecPrP elutes after 150 ml, Numbers indicate main peak fractions. The corresponding SDS-PAGE is shown in **Figure 1B**.
 10 (B) RP-HPLC of ovrecPrP(TARQ) with a C8-column. ovrecPrP elutes between 33.5 % and 34.5 % acetonitrile. Numbers
 11 indicate main peak fractions. The corresponding SDS-PAGE is shown in **Figure 1C**.

12 Mass spectrometry was performed to determine the exact molecular mass of both ovrecPrP
 13 variants (Figure 3). The mass of triple labeled ovrecPrP(MARQ) was found to be 25236 Da
 14 (Figure 3A), which closely corresponds to the theoretical mass of triply labeled
 15 ovrecPrP(MARQ) with completely protonated exchangeable sites (25278 Da). The deviation
 16 resembles the overall labeling degree, resulting in 99.83 %. Also the mass of 25204 Da
 17 (Figure 3B) of triple labeled ovrecPrP(TARQ) was found to be close to the theoretical mass of
 18 triply labeled ovrecPrP(TARQ) and completely protonated at the exchangeable sites (25244
 19 Da), and corresponds to an overall labeling degree of 99.84 %. Furthermore, the measured

- 1 difference between the two variations of 34 Da is closely related to the theoretical mass
- 2 difference (32 Da) between the amino acids methionine and threonine.

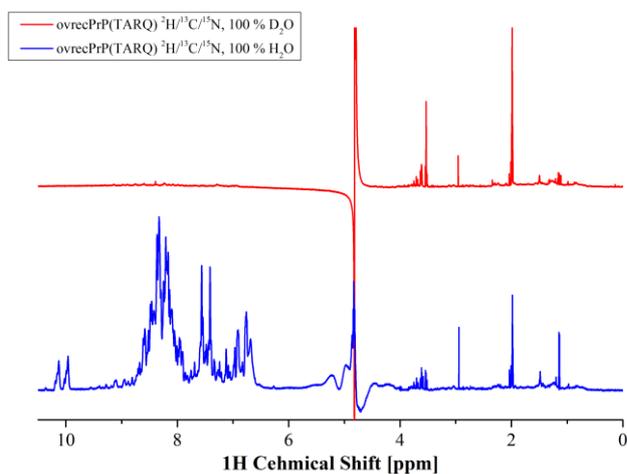


3

4 **Figure 3:** Mass spectra of (A) ovrecPrP(MARQ) and (B) ovrecPrP(TARQ). Main fraction of ovrecPrP(MARQ) has a mass
 5 of 25237 Da (A), main fraction of ovrecPrP(TARQ) has a mass of 25202 Da (B).

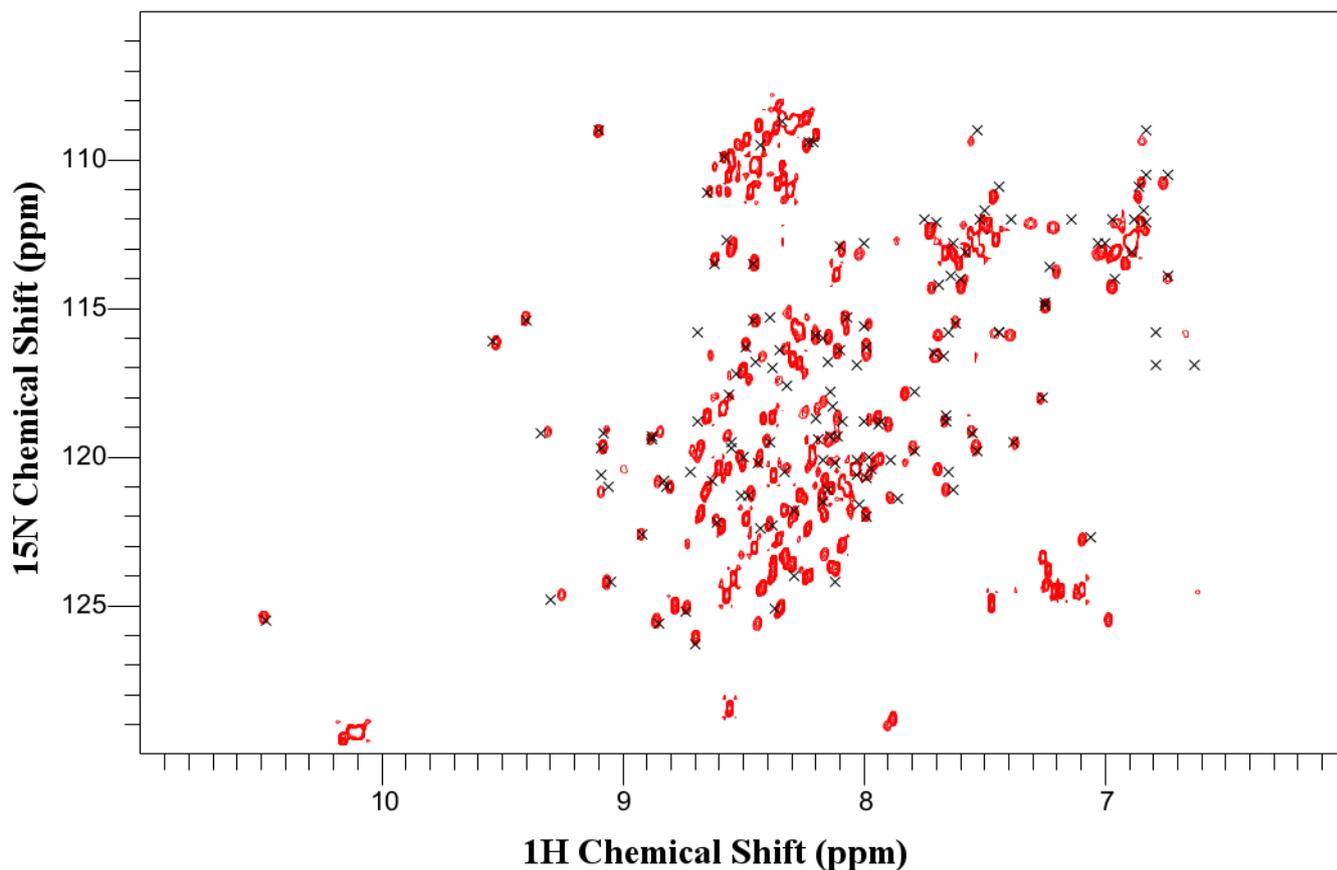
6 We performed solution-state NMR experiments of the purified ovrecPrP(TARQ). The protein
 7 was dissolved in acetic acid (pH 4.5, 10 mM, according to Lysek et al. [3]) containing 100%
 8 D₂O or 100 % H₂O. ovrecPrP(TARQ) dissolved in buffer containing 100 % D₂O shows no
 9 protein peaks in the standard ¹H-spectrum (Figure 4, red spectrum), whereas in buffer
 10 containing 100 % H₂O protein peaks are only visible in the amide region between 6.5-9 ppm
 11 (Figure 4, blue spectrum). The 2D-HSQC spectrum shows 242 well defined and well
 12 dispersed HN-correlation signals (Figure 5) which are closely related to the chemical shifts
 13 from the A₁₃₆R₁₅₄R₁₇₁ ovrecPrP(121-231) structure published (PDB entry: 1Y2S) by Wüthrich

1 and co-workers[3]. The increased number of observable peaks in the HSQC-spectrum is due
2 to the fact that we used the full-length ovPrP(25-233) in contrast to Wüthrichs N-terminally
3 truncated ovPrP(121-231).



5 **Figure 4:** ^1H liquid-state NMR of ovrecPrP(TARQ). **Red:** ^1H spectrum of ovrecPrP(TARQ) $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labelled and
6 solubilized in NaOAc 10 mM 100 % D_2O . **Blue:** ^1H spectrum of ovrecPrP(TARQ) $^2\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ labelled and solubilized in
7 NaOAc 10 mM 100 % H_2O .

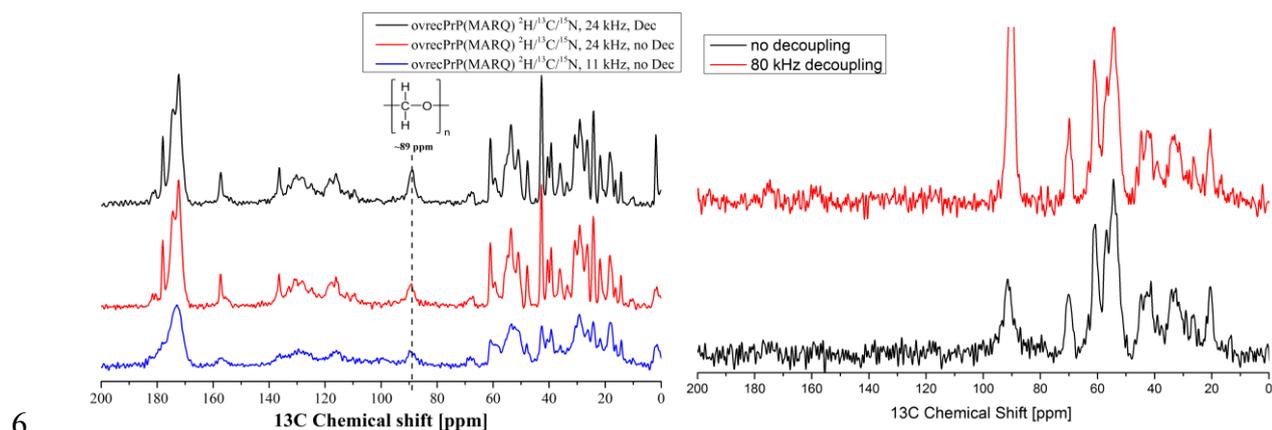
8



1
2 **Figure 5:** HN-correlation spectra of ovrecPrP(TARQ). ovrecPrP(TARQ) was dissolved in acetic acid (pH 4.5, 10 mM) after
3 Lyophilisation. The spectrum shows 242 well resolved and dispersed HM-correlation signals. Marks indicate the chemical
4 shifts of the ovrecPrP(ARR) structure published (PDB entry: 1Y2S) by Wüthrich and co-workers[168]

5
6 Finally, we performed solid-state NMR experiments of fibrillated ovrecPrP(MARQ) and
7 ovrecPrP(TARQ). Fibrils containing 30 % protons at the exchangeable sites were washed
8 after fibrillation with 100 % D₂O to get rid of all protons which are not in the structured
9 region, respectively in the core-region. The findings of Nazabal et al. indicate a non-
10 accessible state of the folded amyloid-core region, in which the amide-sites are protected from
11 deuterium exchange with the surrounding solvent. ¹³C direct excitation solid-state NMR
12 experiments were performed with or without ¹H decoupling and at spinning speeds of 11 kHz
13 and 24 kHz MAS, respectively (Figure 6, left panel). As described before by Reif and co-
14 authors [153], with increasing MAS frequency the ¹³C-spectrum yields better S/N-ratio as
15 well as an increased resolution. As expected, high power decoupling did not improve the

1 spectra in contrast to experiments in non-deuterated samples. HC-CP solid-state NMR
 2 experiments were performed with or without ^1H decoupling and under 24 kHz MAS (Figure
 3 6, right panel). Like for the ^{13}C direct excitation experiments, no S/N improvement could be
 4 observed with decoupling. Decoupling did not change the shape of the spectrum, only the
 5 background signal of the polyoxymethylene insert at ~ 89 ppm is increased.



7 **Figure 6:** ^{13}C -direct excitation (left) and HC-CP (right) solid-state NMR experiments on ovrecPrP(MARQ) fibrils. (left
 8 panel) Black: 24 kHz MAS and decoupling. Red: 24 kHz MAS and no decoupling. Blue: 11 kHz MAS and no decoupling.
 9 (right panel) Black: HC-CP recorded at 24 kHz MAS and no decoupling, CP-contact time 1.1 ms. Red: HC-CP recorded at
 10 24 kHz MAS and full power decoupling, CP-contact time 1.1 ms. Signal at ~ 89 ppm corresponds to the polyoxymethylen of
 11 the insert.

12

13 Spin-echo experiments for T_2 -relaxation measurements [169] were fitted for exponential
 14 decay:

$$M(t) = M_0 * e^{-t/T_2}$$

15 with M_0 the amplitude and T_2 the decay constant.

16 The ^{15}N signal of the non-deuterated sample decreases irreversibly to 37 % (T_2 -relaxation
 17 time [170]) of the initial intensity after 10.2 ms where as in ovrecPrP(MARQ) and
 18 ovrecPrP(TARQ) the T_2 -relaxation times are 14,9 ms and 13,7 ms, respectively (Figure 7A).
 19 ^{13}C -relaxation times for non-deuterated uniformly labeled sample is 1.8 ms, 3.1 ms and 3.0
 20 ms for orePrP(MARQ) and ovrecPrP(TARQ) (Figure 7B).

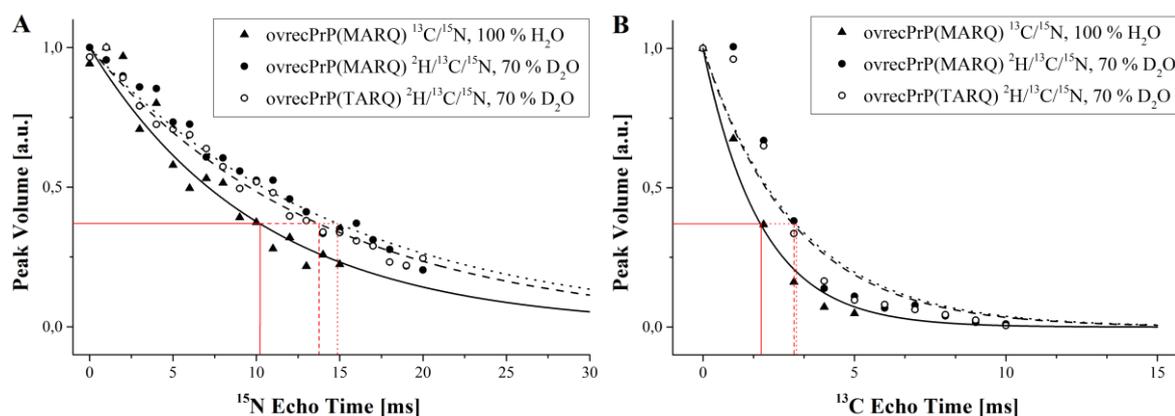


Figure 7: T₂-relaxation estimation of ¹³C and ¹⁵N of double and triple labeled ovrecPrP(MARQ) (A) and ovrecPrP(TARQ) (B). All data were fitted for exponential decay. (A) T₂-relaxation graphs for ¹⁵N of ovrecPrP(MARQ) and ovrecPrP(TARQ). Double labeled ovrecPrP(MARQ) shows a T₂-relaxation time of 10.2 ms (R² = 0.94), triple labeled ovrecPrP(MARQ) of 14.9 ms (R² = 0.98) and triple labeled ovrecPrP(TARQ) of 13.7 ms (R² = 0.99). (B) T₂-relaxation graphs for ¹³C of ovrecPrP(MARQ) and ovrecPrP(TARQ). Double labeled ovrecPrP(MARQ) shows a T₂-relaxation time of 1.8 ms (R² = 0.98), triple labeled ovrecPrP(MARQ) of 3.1 ms (R² = 0.91) and triple labeled ovrecPrP(TARQ) of 3.0 ms (R² = 0.93)

Discussion

The aim of this project was to establish a straight forward and cost effective protocol for high yield expression and purification of isotopically enriched (¹³C/¹⁵N) and perdeuterated (²H) prion protein. Previous expression systems like Rosseta™ (Novagen), the preferred expression system for eukaryotic proteins that contain codons rarely used in *E.coli*, yielded only ~5 mg ovrecPrP per liter non-deuterated minimal medium. Furthermore, the codon optimization was carried out to fit the tRNA triplet code used in *E.coli*. Our modified protocol now allows the expression and purification of deuterated and highly pure ovrecPrP yielding ~40 mg protein per liter minimal medium. The essential step for expression in D₂O is the familiarization of *E.coli* to growth in deuterated media [171]. With our described procedure it is possible to let the *E.coli* slowly adept to growth in D₂O, as well as to reduce the incorporation of ¹H by the usage of two pre-cultures containing 100 % D₂O. Furthermore, the minimal medium pre-culture is set up without addition of glucose and ammonium chloride;

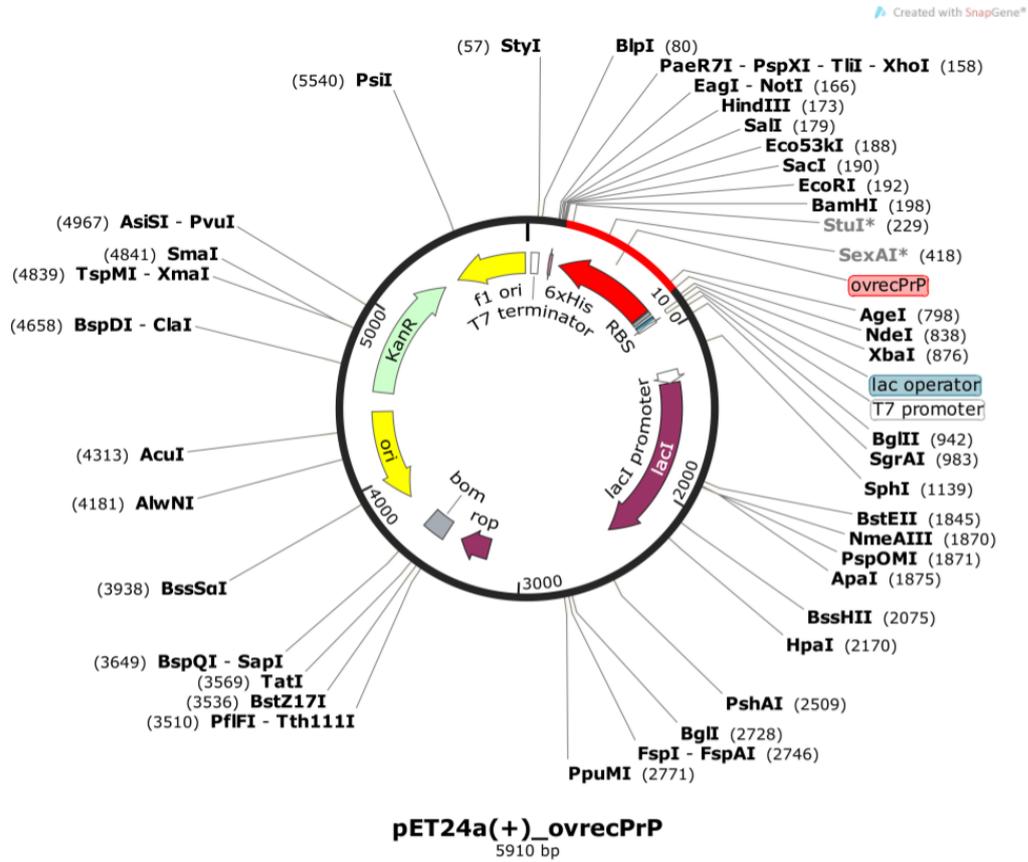
1 the remaining $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ sources are sufficient for growth to an OD_{600} of 0.4-0.6, which in
2 addition also reduces the probability of ^1H incorporation. We observed problems during
3 preparation of stock solution in D_2O , e.g. trace minerals. Either it was not possible to dissolve
4 the chemicals or it started to precipitate short after solubilization. Our results show that
5 addition of the nutrients, except glucose and ammonium chloride, solubilized in H_2O in high
6 concentration to not exceed 0.5 % (v/v) is straight forward and particularly sufficient for
7 yielding deuteration degrees of >99 %. Our solution state results suggest that if lyophilized
8 ovrecPrP is dissolved in buffer, the exchange of H/D-exchangeable sites is faster than folding
9 of the protein, introducing the possibility for solubilization of the ovrecPrP in buffer with the
10 desired H/D-composition. The signal dispersion yielded from 2D-HSQC experiments are
11 closely related to the published chemical shifts from the structure of native folded ovine
12 $\text{A}_{136}\text{R}_{154}\text{R}_{171}$ PrP(121-231). Together with the CD-spectrum shown in Figure S3, we assume
13 (1) a well ordered and native folded structure of the ovrecPrP and (2) an independently
14 folding mechanism with no necessity for a refolding protocol. Fibrils precipitated from
15 scrapie ill sheep, carrying the $\text{M}_{112}\text{A}_{136}\text{R}_{154}\text{Q}_{171}$ genotype, were used to induce seeded
16 fibrillation of both ovrecPrP(MARQ) and ovrecPrP(TARQ) and subjected to first solid-state
17 NMR experiments. Fibrils were grown in buffer containing 70 % D_2O / 30 % H_2O and were
18 washed after harvesting with 100 % D_2O to remove all non-protected exchangeable protons,
19 respectively introducing deuterium at these sites. We assume that magnetization transfer from
20 HN-CP or HC-CP will then only be possible in the folded amyloid core region. The already
21 estimated deuteration degree, respectively the overall labeling degree is reflected by ^{13}C -
22 spectra; no enhancement of the S/N-ratio as well as of the resolution is obtained by high
23 power decoupling during acquisition, thus proofing the successful dilution of protons and
24 elimination of the strong dipolar coupled proton network. As Reif and co-workers have shown
25 previously, with increasing MAS frequency the S/N-ration increases as well as the resolution.
26 We finally estimated the T_2 -relaxation times of ^{13}C and ^{15}N of triply labeled ovrecPrP in

1 comparison to doubly labeled ovrecPrP. As expected, for both variants as well as for both
2 nuclei, the T_2 -relaxation times increased. Likewise, for the α -spectrin SH3-domain an increase
3 of the ^{15}N T_2 -relaxation time to over 30 ms after deuteration was shown [172]. In contrast to
4 the SH3-domain, the prion fibrils cannot be crystallized. We assume a higher flexibility of the
5 structure of prion fibrils resulting in molecular motion affecting the NMR time scale and thus
6 leading to less increased T_2 -relaxation times. The protocol presented here should also work
7 for different labeling schemes, such as reverse labeling or sparse labeling. In conclusion, we
8 could show that it is possible to obtain triple labeled prion protein in high yields of roughly 40
9 mg per liter minimal medium and with an high degree of enrichment (>99 %) with a straight
10 forward and simple to use protocol. We are sure that our protocol will help to further
11 characterize and understand the misfolded prion protein by introducing a further nucleus to
12 solid-state NMR of PrP.

13

1 Supplementary

2



3

4 Figure S 1: Scheme of the pET24a(+) plasmid containing the ovrecPrP gene insert.

5

```

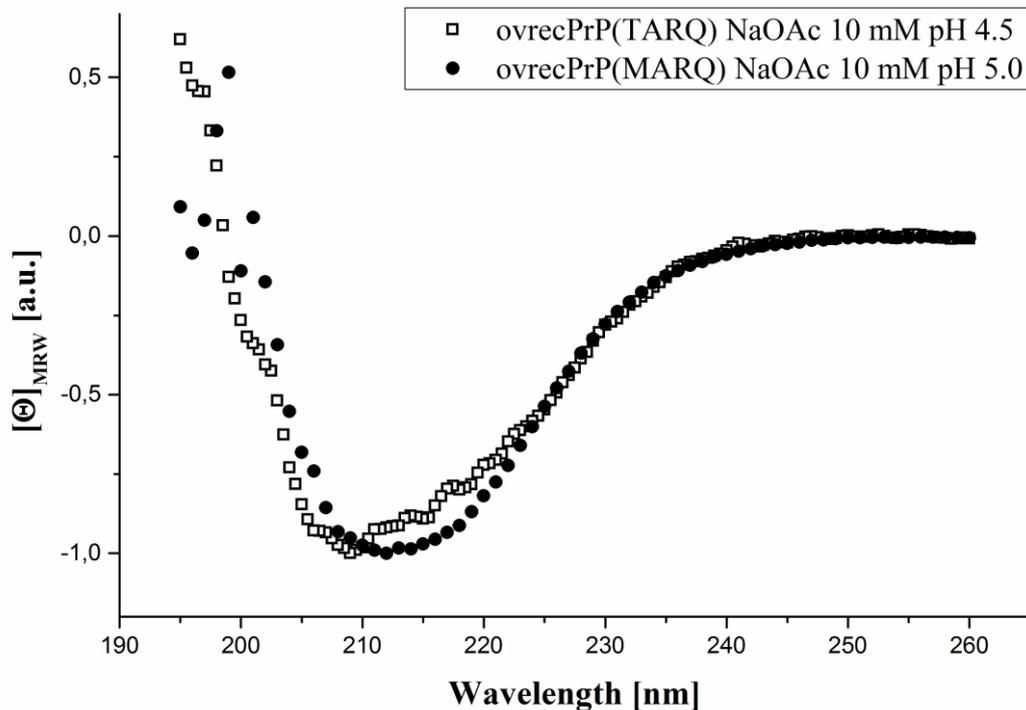
1  ATAATTTTGTTTAACTTTAACATATGAAAAACGTCCGAAACCGGGTGGT
51  GGTGGAATACCGGTGGTAGCCGTTATCCGGGTCAGGGTAGTCCGGGTGG
101 TAATCGTTATCCTCCGCAGGGTGGTGGCGGTTGGGGTCAGCCTCATGGTG
151 GTGGATGGGGACAACCGCATGGCGGAGGCTGGGGACAGCCACATGGCGGT
201 GGTGGGGTCAACCACACGGTGGGGGTGGCTGGGGTCAGGGTGGTAGCCA
251 TAGCCAGTGAATAAACCGAGCAAACCGAAAACCAATATGAAACATGTTG
301 CCGGTGCAGCAGCAGCGGGTGCAGTTGTTGGTGGTCTGGGTGGTTATATG
351 CTGGGTAGCGCAATGAGCCGTCGCTGATTCATTTTGGTAATGATTATGA
401 GGATCGCTACTATCGCGAAAACATGTATCGCTATCCGAACCAGGTTTATT
451 ATCGTCCGGTTGATCAGTATAGCAACCAGAATAATTTTCGTGCATGATTGC
501 GTGAACATTACCGTTAAACAGCATAACCGTTACCACCACCACAAAAGGTGA
551 AAACTTTACCGAAACCGATATCAAATTATGGAACGCGTTGTTGAGCAGA
601 TGTGCATTACCCAGTATCAGCGTGAAAGCCAGGCCTATTATCAACGTGGT
651 GCATAGTGAGGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAA

```

1

2 **Figure S 2: DNA sequence of the constructed gene insert. The highlighted DNA triplet indicates the position of the**
3 **codon for methionine in ovrecPrP(MARQ), which is replaced by ACG for the threonine used for ovrecPrP(TARQ).**

4



5

6 **Figure S 3: CD-spectra of monomeric ovrecPrP(MARQ) and ovrecPrP(TARQ).**