

Funktionelle und strukturelle Charakterisierung der A β -PrP-Interaktion

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Nadine Sabrina Rösener

aus Ratingen

Düsseldorf, Mai 2018

aus dem Institut für Physikalische Biologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
und dem Institute of Complex Systems Strukturbiochemie (ICS-6)
des Forschungszentrums Jülich GmbH

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

Referent: Prof. Dr. Dieter Willbold
Koreferent: Prof. Dr. Georg Groth
Tag der mündlichen Prüfung: 26.06.2018

*Für alle, die mich -insbesondere bei der Fertigstellung dieser Arbeit-
bedingungslos unterstützt haben!*

*„Es kommt nicht darauf an, mit dem Kopf durch die Wand zu rennen,
sondern mit den Augen die Tür zu finden.“*

- Werner von Siemens

Zusammenfassung

Die Alzheimersche Demenz ist eine fortschreitende neurodegenerative Krankheit, von der Millionen Menschen weltweit betroffen sind. Sie stellt durch die immer älter werdende Bevölkerung eine zunehmende Herausforderung dar, besonders, da es derzeit kein Heilmittel gibt. Dem 38 - 43 Aminosäuren langen Peptid Amyloid- β ($A\beta$) wird im Krankheitsverlauf eine zentrale Rolle zugesprochen. Durch Aggregation von insbesondere $A\beta(1-42)$ mit weiteren $A\beta$ -Peptiden entstehen $A\beta$ -Oligomere sowie $A\beta$ -Fibrillen, von denen sich letztere im Gehirn der Betroffenen ablagern. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass $A\beta$ -Oligomere für die Weiterleitung toxischer Signale verantwortlich sind und dafür das zelluläre Prion-Protein (PrP) als Co-Rezeptor benötigen. Aus der Interaktion zwischen $A\beta$ -Oligomeren und dem PrP ergibt sich somit ein neuer möglicher Therapieansatzpunkt.

In dieser Arbeit wurde die $A\beta$ -PrP-Interaktion untersucht und der Einfluss möglicher Wirkstoffkandidaten auf die Interaktion analysiert. Hierfür wurden die rekombinanten Prion-Varianten PrP(23-230), PrP(23-144) und PrP(90-230) sowie das synthetische PrP(23-111 Δ 41-94) untersucht. Diese Prion-Konstrukte wurden in verschiedenen Konzentrationen zu $A\beta$ -Oligomeren hinzugefügt, wodurch sich hochmolekulare Komplexe ausbildeten. Diese Bindung war mit PrP(90-230) am schwächsten und deckt sich mit den in der Literatur angegebenen Bindestellen. Durch Abtrennen der $A\beta$ -PrP-Komplexe von weiteren Bestandteilen wie Monomeren oder Oligomeren über einen Saccharosedichtegradienten war es möglich die Komplexe zu charakterisieren. Mit Hilfe chromatographischer Methoden konnten die Komplexe dissoziiert und deren $A\beta$ - bzw. PrP-Anteil quantifiziert werden. Die so erhaltenen $A\beta$ /PrP-Verhältnisse sind konzentrationsabhängig und erreichen nach PrP-Sättigung einen konstanten Wert von 4 $A\beta$: 1 PrP. Untersuchungen der Komplexe über Rasterkraftmikroskopie zeigten, dass mit geringen Mengen PrP viele runde verkettete Substrukturen innerhalb der Komplexe erhalten werden, während eine Sättigung mit PrP zu kompakteren und weniger detaillierten Strukturen führt. Zur Strukturaufklärung der Komplexe wurden Festkörper-NMR-Spektroskopie-Proben hergestellt, von denen insbesondere die mit isotoopenmarkiertem $A\beta$ vielversprechende Ergebnisse zeigen und eine partielle Zuordnung der Resonanzen möglich ist.

Die zuvor ermittelten $A\beta$ /PrP-Stöchiometrien wurden zugrunde gelegt, um nach möglichen Wirkstoffkandidaten zu suchen, welche die $A\beta$ -PrP-Interaktion beeinflussen können. Untersucht wurden die $A\beta$ -bindenden D-enantiomeren Peptide RD2-FITC und RD2D3-FITC. Mit letzterem konnte ein konzentrationsabhängiger Einfluss auf die $A\beta$ -PrP-Interaktion nachgewiesen werden. Insgesamt zeigt diese Arbeit, dass die quantitative Analyse der $A\beta$ -PrP-Interaktion dazu genutzt werden kann, nach Wirkstoffkandidaten zu suchen und ein Kandidat bereits erfolgreich identifiziert werden konnte.

Summary

Alzheimer's disease (AD) is a progressive neurodegenerative disorder that affects millions of people worldwide. Because of the prolonged life span of the population the number of AD patients increases. Therefore, the disease is a challenge for the population as it still is not curable. The amyloid- β ($A\beta$) peptide which is 38 - 43 amino acids in length plays a key role for the progression of the disease. Due to the aggregation of $A\beta$ peptides, especially $A\beta(1-42)$, $A\beta$ oligomers and $A\beta$ fibrils are formed of which the latter accumulate in the patient's brain and form amyloid plaques. Recently, it was shown that $A\beta$ oligomers are responsible for the toxic signalling which need the cellular prion protein (PrP) as a co-receptor. Therefore, the interaction of $A\beta$ and PrP might be a potential therapeutic target.

The $A\beta$ -PrP-interaction was analysed in detail and the effect of potential drug candidates were tested in this thesis. To this end, the recombinant prion constructs PrP(23-230), PrP(23-144) and PrP(90-230) as well as the synthetic PrP(23-111 Δ 41-94) were investigated. Different concentrations of these prion constructs were added to $A\beta$ oligomers resulting in high molecular weight complexes. The binding of PrP(90-230) was the weakest linkage and corresponds to the binding sites of $A\beta$ oligomers found in the literature. The separation of $A\beta$ -PrP-complexes from monomers and oligomers by sucrose density gradient centrifugation allowed the characterisation of the complexes. Chromatographic methods were used to dissociate the complexes and quantify their $A\beta$ and PrP content. The resulting $A\beta$ to PrP ratios are concentration dependent and gain a constant value of 4 $A\beta$ to 1 PrP after saturation with PrP. The analysis of the complexes by Atomic Force Microscopy (AFM) resulted in many spherical connected substructures, building up the complexes when low PrP amounts were used. However, the saturation of the complexes with PrP led to more compact and less detailed structures. Samples of the complexes were prepared for the structure determination by solid state NMR. Especially those with isotope labelled $A\beta$ show promising results and allow partial assignment of the detected resonances.

The previously determined $A\beta$ to PrP ratios were used to search for potential drug candidates which might affect the $A\beta$ -PrP-interaction. Therefore, the $A\beta$ -binding D-enantiomeric peptides RD2-FITC and RD2D3-FITC were analysed. The latter had a concentration dependent influence on the $A\beta$ -PrP-interaction. This thesis shows that the quantitative analysis of the $A\beta$ -PrP-interaction can be used for the determination of drug candidates. One potential drug compound was already identified.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neurodegenerative Krankheiten	2
1.2	Morbus Alzheimer	2
1.3	Prozessierung des APP	3
1.4	Das Prion-Protein	6
1.4.1	Struktur des Prion-Proteins	7
1.4.2	Prozessierung des Prion-Proteins	9
1.4.3	Das PrP Y145Stop	11
1.5	Interaktion von A β -Oligomeren mit dem Prion-Protein	11
1.5.1	Bindestellen	12
1.5.2	Größe der PrP-bindenden A β -Oligomere	14
1.5.3	Signalweiterleitung über die Membran	15
1.5.4	Die A β -PrP-Interaktion als möglicher Therapieansatzpunkt	19
1.6	D-Peptide als Wirkstoffe gegen Alzheimer	22
1.7	Fragestellung	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	26
2.1.1	Chemikalien	26
2.1.2	<i>E. coli</i> Stämme	28
2.1.3	Plasmide	28
2.1.4	Peptide und Proteine	28
2.1.5	Nährmedien	31
2.1.6	Lösungen und Puffer	33
2.1.7	Größenstandards	38
2.1.8	Säulen	39
2.1.9	Laborgeräte	39
2.1.10	Software	41
2.1.11	Spezielle Verbrauchsmaterialien	41

2.2	Methoden	42
2.2.1	Herstellung von <i>E. coli</i> Glycerolstocks	42
2.2.2	Expression von PrP(23-230) in <i>E. coli</i>	42
2.2.3	Expression von PrP(23-144) in <i>E. coli</i>	43
2.2.4	Zellaufschluss von <i>E. coli</i> und Reinigung von <i>inclusion bodies</i> .	43
2.2.5	Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)	43
2.2.6	TEV-Protease-Verdau	44
2.2.7	Größenausschluss-Chromatographie (SEC)	45
2.2.8	Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)	45
2.2.9	Semi-präparative <i>reversed-phase high-performance liquid chroma-</i> <i>tography</i> (RP-HPLC)	46
2.2.10	Lyophilisierung von gereinigtem PrP	46
2.2.11	Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Photometer	47
2.2.12	Circulardichroismus (CD)-Spektroskopie von Proteinen . . .	47
2.2.13	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Glycin	48
2.2.14	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Tricin	49
2.2.15	Nachweis von fluoreszenzmarkierten D-Peptiden in SDS-Gelen	50
2.2.16	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	50
2.2.17	Silberfärbung von SDS-Gelen	50
2.2.18	Herstellung von A β -Lyophilisaten	51
2.2.19	Angepasster QIAD Assay zur Bestimmung von Proteinvertei-	
	lungen und -konzentrationen	52
2.2.20	Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) mit Iodixanol	55
2.2.21	<i>Atomic Force Microscopy</i> (AFM)	56
2.2.22	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (NMR)-Spektroskopie	57
3	Ergebnisse	61
3.1	Reinigung von PrP(23-230)	62
3.1.1	Größenausschluss-Chromatographie (SEC)	62
3.1.2	Semi-präparative <i>reversed-phase high-performance liquid chroma-</i> <i>tography</i> (RP-HPLC)	63
3.2	Reinigung von PrP(23-144)	64
3.2.1	Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)	65
3.2.2	Semi-präparative <i>reversed-phase high-performance liquid chroma-</i> <i>tography</i> (RP-HPLC)	67
3.3	Überprüfung der gereinigten PrP-Konstrukte	69
3.4	Pufferoptimierung zur Oligomerisierung von A β	70

3.5	Anpassung des QIAD Assays und DGZ von Standardproteinen . . .	71
3.6	Charakterisierung der Ausgangsmaterialien	74
3.6.1	Analyse der PrP-Konstrukte über Circular dichroismus (CD) .	75
3.6.2	Analyse von PrP(23-230) und PrP(23-144) über NMR	76
3.6.3	Verteilung von A β (1-42)-Oligomeren im Dichtegradienten . .	79
3.6.4	Verteilung der verschiedenen PrP-Konstrukte im Dichtegra- dienten	81
3.7	Charakterisierung der A β -PrP-Interaktion	83
3.7.1	Verteilung von A β (1-42) mit PrP(23-230)	83
3.7.2	Verteilung von A β (1-42) mit PrP(23-144)	85
3.7.3	Verteilung von A β (1-42) mit PrP(90-230)	88
3.7.4	Verteilung von A β (1-42) mit PrP(23-111 Δ 41-94)	90
3.7.5	Stöchiometrien der verschiedenen A β -PrP-Komplexe	92
3.7.6	Untersuchung von A β -PrP(23-144)-Komplexen mittels Ras- terkraftmikroskopie (<i>Atomic Force Microscopy</i> , AFM)	95
3.7.7	Strukturelle Untersuchungen der A β -PrP-Komplexe über Festkörper-NMR-Spektroskopie	99
3.8	Einfluss des Inhibitors Chicago Sky Blue auf die A β -PrP-Interaktion	108
3.9	Einfluss von D-Peptiden auf die A β -PrP-Interaktion	111
3.9.1	Einfluss des D-Peptids RD2-FITC	112
3.9.2	Einfluss des D-Peptids RD2D3-FITC	117
4	Diskussion	127
4.1	Reinigung von PrP(23-230) und PrP(23-144)	128
4.2	Anpassung des QIAD Assays	129
4.3	Charakterisierung der Ausgangsmaterialien	130
4.4	Charakterisierung der A β -PrP-Interaktion	133
4.4.1	Verteilung von A β -PrP-Komplexen im Dichtegradienten . . .	133
4.4.2	Stöchiometrien der verschiedenen A β -PrP-Komplexe	138
4.4.3	Untersuchung von A β -PrP(23-144)-Komplexen über AFM . .	141
4.4.4	Strukturelle Untersuchungen der A β -PrP-Komplexe über FK- NMR	142
4.5	Einfluss von CSB und D-Peptiden auf die A β -PrP-Interaktion	143
4.5.1	Einfluss von CSB	144
4.5.2	Einfluss von D-Peptiden	145
4.6	Modell der A β -PrP-Komplexe	148
4.7	Ausblick	151

5	Anhang	153
5.1	AFM von A β -PrP(23-144)-Komplexen	153
5.2	Verteilung von A β mit 60 μ M PrP(23-144)	157
5.3	HSQC-Spektren von PrP(23-230) und PrP(23-144)	157
6	Danksagung	159
7	Abkürzungsverzeichnis	161
	Tabellenverzeichnis	165
	Abbildungsverzeichnis	167
	Literaturverzeichnis	171

1 Einleitung

Inhaltsangabe

1.1	Neurodegenerative Krankheiten	2
1.2	Morbus Alzheimer	2
1.3	Prozessierung des APP	3
1.4	Das Prion-Protein	6
1.5	Interaktion von A β -Oligomeren mit dem Prion-Protein	11
1.6	D-Peptide als Wirkstoffe gegen Alzheimer	22
1.7	Fragestellung	24

1.1 Neurodegenerative Krankheiten

Als neurodegenerative Krankheiten werden Krankheiten bezeichnet, bei denen der kontinuierliche irreversible Abbau neuronalen Gewebes, insbesondere des Gehirns, zu beobachten ist. Damit einhergehend kann im weiteren Krankheitsverlauf eine fortschreitende Demenz festgestellt werden und final führt die Neurodegeneration zum Tod des Betroffenen. Die bekanntesten neurodegenerativen Krankheiten sind die Alzheimersche Demenz, bei der es zur Akkumulation des Amyloid- β ($A\beta$)-Peptids sowie des Tau-Proteins kommt, die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, bei der das Prion-Protein (PrP) fehlgefaltet wird und die Parkinson-Krankheit, bei der Ablagerungen des Proteins α -Synuclein diagnostiziert werden können.

Schätzungen zufolge leiden derzeit weltweit 47 Millionen Menschen an einer Demenzerkrankung (Stand: 2016) [1]. Aufgrund der älter werdenden Bevölkerung wird diese Zahl voraussichtlich auf über 131 Millionen Betroffene im Jahr 2050 ansteigen [1]. Allein in Deutschland leben etwa 1,6 Millionen Menschen mit einer Demenzerkrankung; unter ihnen leiden schätzungsweise zwei Drittel an Alzheimerscher Demenz [2].

1.2 Morbus Alzheimer

Morbus Alzheimer, besser bekannt als Alzheimer Krankheit, Alzheimersche Demenz oder kurz Alzheimer, ist eine neurodegenerative Erkrankung und wurde nach dem Psychiater Alois Alzheimer benannt. In dem Artikel „Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde“, erschienen in der Allgemeinen Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin aus dem Jahr 1907, beschreibt er erstmals die Verhaltensauffälligkeiten und den Rückgang kognitiver Fähigkeiten seiner Patientin sowie die neuropathologischen Merkmale nach Untersuchung ihres Gehirns *post mortem* [3]. So berichtete er über extrazelluläre Ablagerungen, welche heutzutage als amyloide Plaques bezeichnet werden, sowie über weitere Läsionen, welche intrazellulär vorkommen und heute neurofibrilläre Bündel genannt werden [3].

Über einen langen Zeitraum waren die Komponenten, aus denen die Ablagerungen bestehen, unbekannt. Mitte der 80er Jahre konnte gezeigt werden, dass sich die extrazellulären Plaques aus Aggregaten eines ca. 4 kDa großen Peptids zusammensetzen, welches inzwischen als $A\beta$ bekannt ist [4–6]. Über die neurofibrillären Bündel wurde herausgefunden, dass diese aus dem Tau-Protein bestehen, welches

durch die Krankheit bedingt hyperphosphoryliert vorliegt [6–9]. Neben diesen Merkmalen gibt es noch weitere Veränderungen, welche im Gehirn eines an Alzheimer erkrankten Patienten erfolgen. So können auch entzündliche Prozesse sowie oxidativer Stress beobachtet werden [6, 10, 11].

Die Folgen all dieser Prozesse sind schwerwiegende neuronale und synaptische Störungen und final der Verlust der Nervenzellen und Tod des Patienten. Bedingt durch den demografischen Wandel der Bevölkerung stellt die Alzheimersche Demenz eine immer größere Herausforderung dar, sowohl ökonomisch als auch sozial. Da es derzeit noch keine Heilung gibt, ist die Entwicklung eines Medikamentes gegen Alzheimer umso dringlicher [12].

1.3 Prozessierung des APP

Insbesondere dem Peptid A β wird eine zentrale Rolle als Auslöser der Alzheimerschen Demenz zugesprochen. A β wird durch die Prozessierung des Amyloid-Precursor-Proteins (APP) generiert. Bei dem APP handelt es sich um ein Typ I integrales Membranprotein, welches eine große N-terminale Domäne und einen kurzen C-terminalen Bereich aufweist und auf dem Chromosom 21 codiert ist [13]. Das APP kann auf zwei alternativen Wegen prozessiert werden, dem amyloidogenen oder dem nicht-amyloidogenen Weg [14, 15] (Abb. 1.1).

Bei dem nicht-amyloidogenen Weg erfolgt die proteolytische Spaltung des APP durch eine α -Sekretase. Insbesondere über drei Enzyme wurde lange spekuliert diese Aufgabe zu erfüllen. Alle drei stammen aus der *a disintegrin and metalloprotease* (ADAM)-Familie, namentlich ADAM9, ADAM10 und ADAM17; letztere ist besser bekannt als *tumour necrosis factor- α converting enzyme* (TACE) [15]. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass ADAM10 die physiologisch relevante α -Sekretase zur Prozessierung des APP ist [16, 17]. Diese spaltet innerhalb der A β -Region und verhindert so die Entstehung von intaktem A β . Durch die Prozessierung durch die α -Sekretase entstehen das sAPP α - und das C-terminale C83-Fragment, welches durch weitere Spaltung durch die γ -Sekretase ein Peptid generiert, das als P3 bezeichnet wird [18] (Abb. 1.1).

Bei der amyloidogenen Prozessierung des APP erfolgt die Spaltung zunächst durch die β -Sekretase und anschließend durch die γ -Sekretase. Die Protease *β -site APP cleaving enzyme 1* (BACE1) konnte als β -Sekretase identifiziert werden, welche das APP an der N-terminalen Region der A β -Sequenz schneidet [18, 19]. Durch diese

Spaltung wird das APP in das sAPP β - und C99-Fragment geteilt (Abb. 1.1). Aus letzterem entsteht A β nach weiterer Prozessierung durch die γ -Sekretase, einem Enzymkomplex u.a. bestehend aus den Präsenilinen 1 und 2 [6]. Durch das unspezifische Schneiden der γ -Sekretase werden A β -Peptide verschiedener Längen von 38 bis 43 Aminosäuren (AS) erhalten [20, 21]. Diese weisen in Abhängigkeit von ihrer Länge unterschiedliche Eigenschaften auf. Insbesondere A β (1-42) zeigt eine starke Tendenz zur Aggregation mit weiteren A β (1-42)-Peptiden verglichen mit kürzeren A β -Varianten [22].

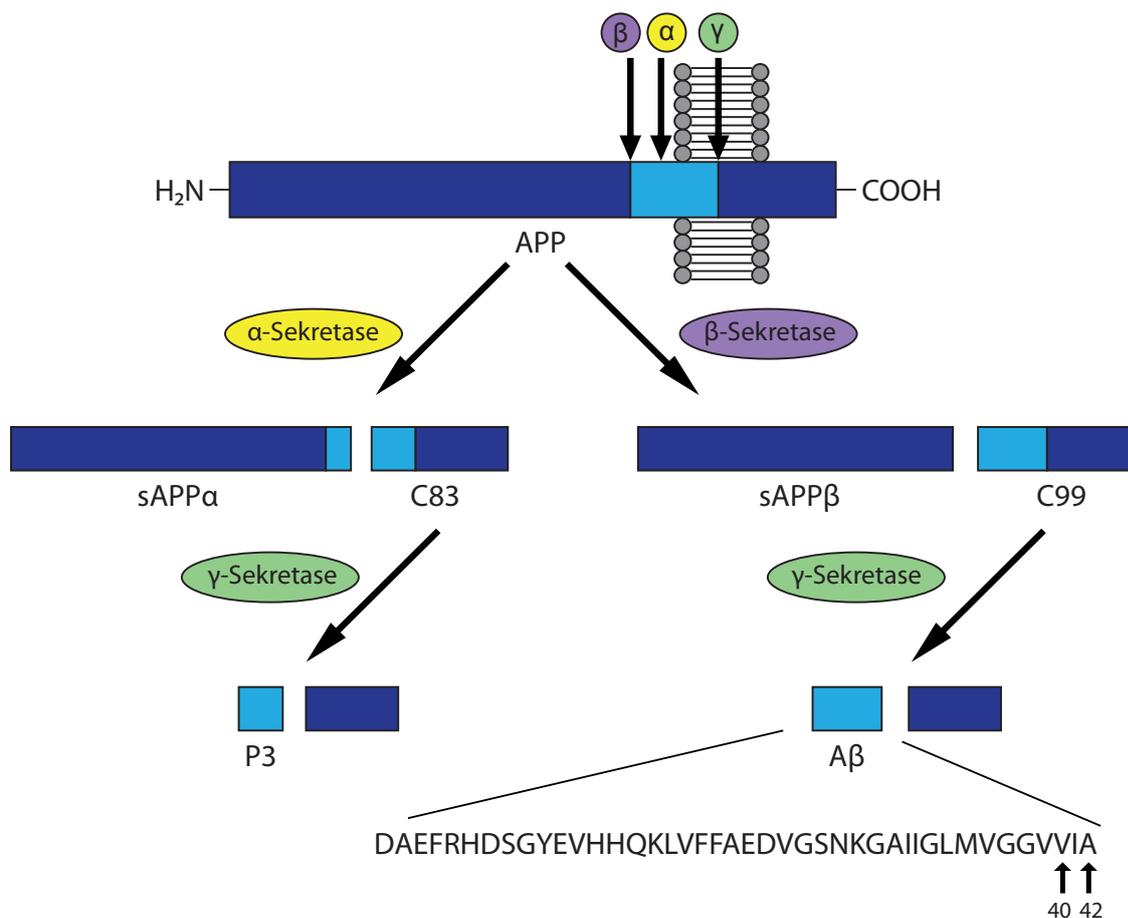


Abbildung 1.1: Prozessierung des APP. Das APP (blau) kann entweder durch die α -Sekretase oder über den amyloidogenen Weg, vermittelt durch die β -Sekretase, gespalten werden. Nach Schneiden der α -Sekretase entstehen das sAPP α - sowie das C83-Fragment, welches nach weiterer Prozessierung zur Entstehung des P3-Peptids führt. Spaltet hingegen die β -Sekretase das APP, so entstehen das sAPP β - und das C99-Fragment. Letzteres wird durch die γ -Sekretase unter Entstehung von A β (hellblau, unten: Aminosäuresequenz) geteilt. Abbildung modifiziert nach [18].

Durch Mutationen der Gene, die für das APP oder die Präseniline 1 oder 2 codieren, kommt es zu einer Veränderung der Prozessierung des APP und zur Entstehung längerer A β -Derivate wie A β (1-42) und A β (1-43) statt der normalerweise häufiger vertretenen A β (1-40)-Variante [13, 20]. Diese Mutationen kommen bei der sogenannten familiären Alzheimerschen Demenz vor, welche meist früher ausbricht als die sporadische Alzheimersche Demenz, da während der gesamten Lebenszeit der Betroffenen erhöhte Mengen an A β (1-42) produziert werden [23].

Bereits 1992 nahmen Hardy und Higgins in ihrer Amyloid-Kaskaden-Hypothese an, dass es sich bei den Ablagerungen des A β -Peptids um den Auslöser der Alzheimerschen Demenz handelt und alle weiteren mit Alzheimer assoziierten Prozesse das Resultat dieser Ablagerungen sind [24]. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass nicht die amyloiden Plaques, sondern vielmehr lösliche A β -Oligomere mit dem Krankheitsverlauf korrelieren und als die toxische Spezies angesehen werden können [25, 26].

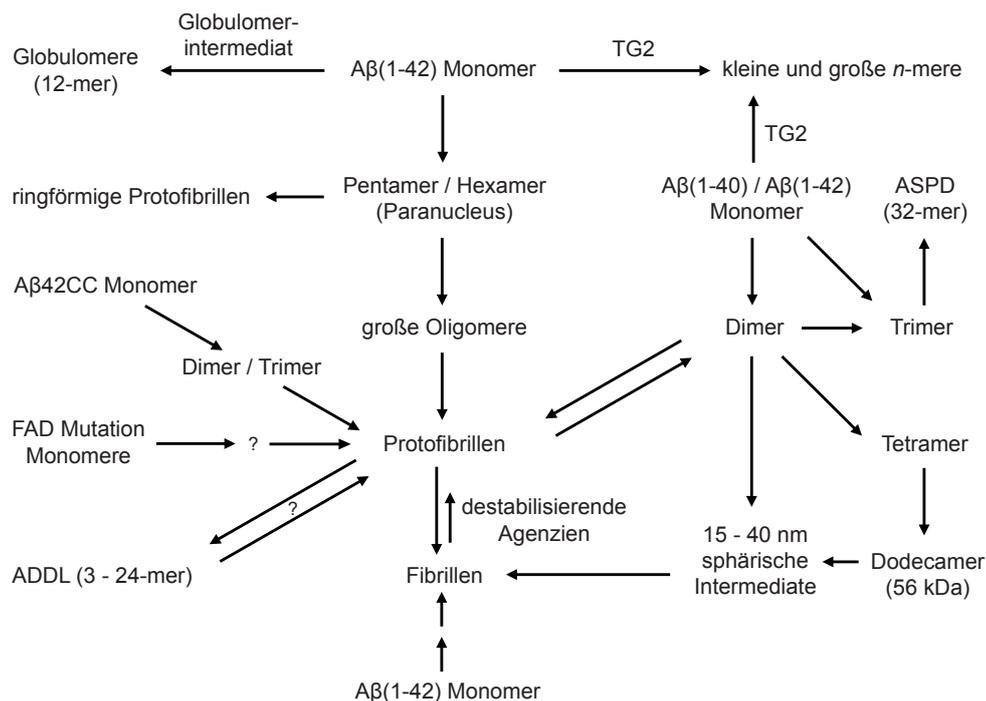


Abbildung 1.2: Schema verschiedener A β -Spezies und Umwandlungsarten. Dargestellt sind die diversen in der Literatur beschriebenen Konversionen natürlicher sowie synthetischer A β -Spezies. A β -Monomere, Oligomere und Fibrillen befinden sich in einem komplexen Gleichgewicht. Hierbei ist die Koexistenz mehrerer A β -Oligomerspezies möglich, aus denen Fibrillen entstehen können. Ebenfalls ist das Fibrillenwachstum durch Anlagerung von A β -Monomeren gezeigt worden [27]. TG: Transglutaminase, ASPD: Amylospheroide, ADDL: *amyloid derived diffusile ligands*, FAD: familiäre Alzheimersche Demenz, A β 42CC: A β (1-42) mit intramolekularer Disulfidbrücke. Abbildung modifiziert nach [21].

Insgesamt gibt es eine Vielfalt an A β -Spezies, die mit dem Begriff „Oligomer“ beschrieben werden [21] (Abb. 1.2). Darunter fallen sowohl A β -Spezies mit niedrigem Molekulargewicht (Dimere, Trimere, Tetramere, usw.) als auch A β -Spezies bestehend aus teilweise mehreren Dutzend A β -Monomeren. Bei den verschiedenen dargestellten A β -Oligomeren handelt es sich sowohl um natürlich vorkommende als auch um synthetisch hergestellte A β -Spezies [21] (Abb. 1.2). Gezeigt ist ebenfalls die Konversion der verschiedenen A β -Spezies, welche in einem komplexen Gleichgewicht zueinander stehen. Neben der Konversion von A β -Oligomeren zu Fibrillen ergibt sich aus der Struktur von kürzlich publizierten Fibrillen [27], dass diese durch Anlagerung von A β -Monomeren gewachsen sein müssen. All die verschiedenen A β -Spezies und möglichen Umwandlungsarten zeigen wie komplex der Mechanismus vom löslichen A β -Monomer zur unlöslichen A β -Fibrille ist. Entsprechend schwierig ist die Bestimmung der A β -Spezies, welche mit dem Krankheitsverlauf der Alzheimerschen Demenz korreliert bzw. korrelieren (vgl. Kapitel 1.5.2).

Aber nicht nur die Produktion von A β allein, sondern auch dessen Degradation ist für den pathologischen Prozess der Alzheimerschen Demenz von großer Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass verschiedene Allele des Apolipoproteins E, welches an der Beseitigung von A β im Gehirn beteiligt ist, die Degradation unterschiedlich stark regulieren [23, 28]. Insbesondere das Apolipoprotein E4 führt zu einer verminderten Degradation von A β und folglich zu einer vermehrten Akkumulation von A β im Gehirn und gilt somit als Alzheimer-Risikofaktor [23, 28].

Haben sich erhöhte Mengen an A β , insbesondere A β (1-42), gebildet, so sind diverse Rezeptoren an einer Signalweiterleitung beteiligt. Bezogen auf den Krankheitsverlauf gibt es sowohl „gute“ als auch „schlechte“ Rezeptoren, wie ausführlich in dem Review von Jarosz-Griffiths et al. beschrieben [29]. Einer der Rezeptoren, denen innerhalb der letzten Jahre eine zentrale Rolle zuteil wurde, stellt das Prion-Protein (PrP) dar (siehe Kapitel 1.4).

1.4 Das Prion-Protein

Das Prion-Protein (PrP) ist ein zelluläres Glycoprotein, das insbesondere in Neuronen, Gliazellen des Gehirns, Rückenmark und Leukozyten exprimiert wird und sich hauptsächlich in Cholesterin-haltigen Mikrodomänen, sogenannten *lipid rafts*, befindet [30–32]. Die physiologische Funktion des PrPs ist noch nicht vollständig geklärt [33]; diskutiert wird jedoch unter anderem über Beteiligungen an dem

Kupfermetabolismus, der Signaltransduktion, der Zellreifung sowie über neuroprotektive Eigenschaften [34, 35]. Auch die Funktion als sogenanntes *scaffold protein* an der Zelloberfläche könnte das PrP erfüllen [35].

Der Name „Prion“ wurde durch Stanley Prusiner im Rahmen seiner *protein-only*-Hypothese eingeführt und steht für *proteinaceous infectious particle* [36]. Zu diesem Zeitpunkt wurde herausgefunden, dass es ein infektiöses Protein geben muss, welches mit Scrapie und der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) in Verbindung gebracht werden kann [36]. Nachdem das PrP als dieses Protein identifiziert wurde, erhielt es den Namen „Prion-Protein“. Allgemein werden die durch PrP ausgelösten neurodegenerativen Krankheiten als transmissible spongiforme Enzephalopathien (TSE) bezeichnet, zu denen neben Scrapie und CJD auch die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) und Kuru zählen [37].

Die Prionkrankheiten werden durch posttranslationale Umfaltung der „normalen“, nicht-krankheitsassoziierten Form des PrPs (PrP^c) in die pathogene PrP^{Sc} -Isoform (Sc: Scrapie) mit hohem β -Faltblattanteil ausgelöst [36, 38]. Diese Konversion erfolgt insbesondere durch andere PrP^{Sc} -Moleküle, kann aber auch spontan auftreten [38]. PrP^{Sc} ist weniger löslich als PrP^c und neigt zur Aggregation und zur Fibrillenbildung. Final führen TSEs zur Demenz und zum Tod des Erkrankten.

1.4.1 Struktur des Prion-Proteins

Das PrP besteht aus 253 AS (humane Sequenz), von denen die ersten 22 AS als Signalsequenz dienen und bei der Reifung des Proteins abgeschnitten werden [39]. Darauf folgt die Hauptkette mit 208 AS bis einschließlich Ser^{230} und ein abschließendes 23 AS langes hydrophobes Propeptid, welches nach Abspaltung durch einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker ersetzt wird und das PrP mit der Zellmembran verbindet [30, 39].

Der N-terminale Bereich des PrPs von AS 23 bis AS 124 ist unstrukturiert und flexibel, während der C-terminale Bereich ab AS 125 bis AS 228 aus einer strukturierten globulären Domäne besteht [39, 40] (vgl. Abb. 1.3). Innerhalb der N-terminalen Region befindet sich eine acht AS lange Sequenz, die sich insgesamt fünfmal aneinanderreicht (AS 51 - 91) und nachfolgend als „Octarepeats“ bezeichnet wird. In dieser werden unter physiologisch relevanten Konzentrationen durchschnittlich zwei Kupferionen (Cu^{2+}) gebunden [41]. Zusätzlich gibt es zwei Bereiche (AS 23 - 27 und 96 - 111), in denen eine hohe Dichte an positiven AS vorhanden ist, welche an der Bindung von $\text{A}\beta$ -Oligomeren beteiligt sind (siehe Kapitel 1.5).

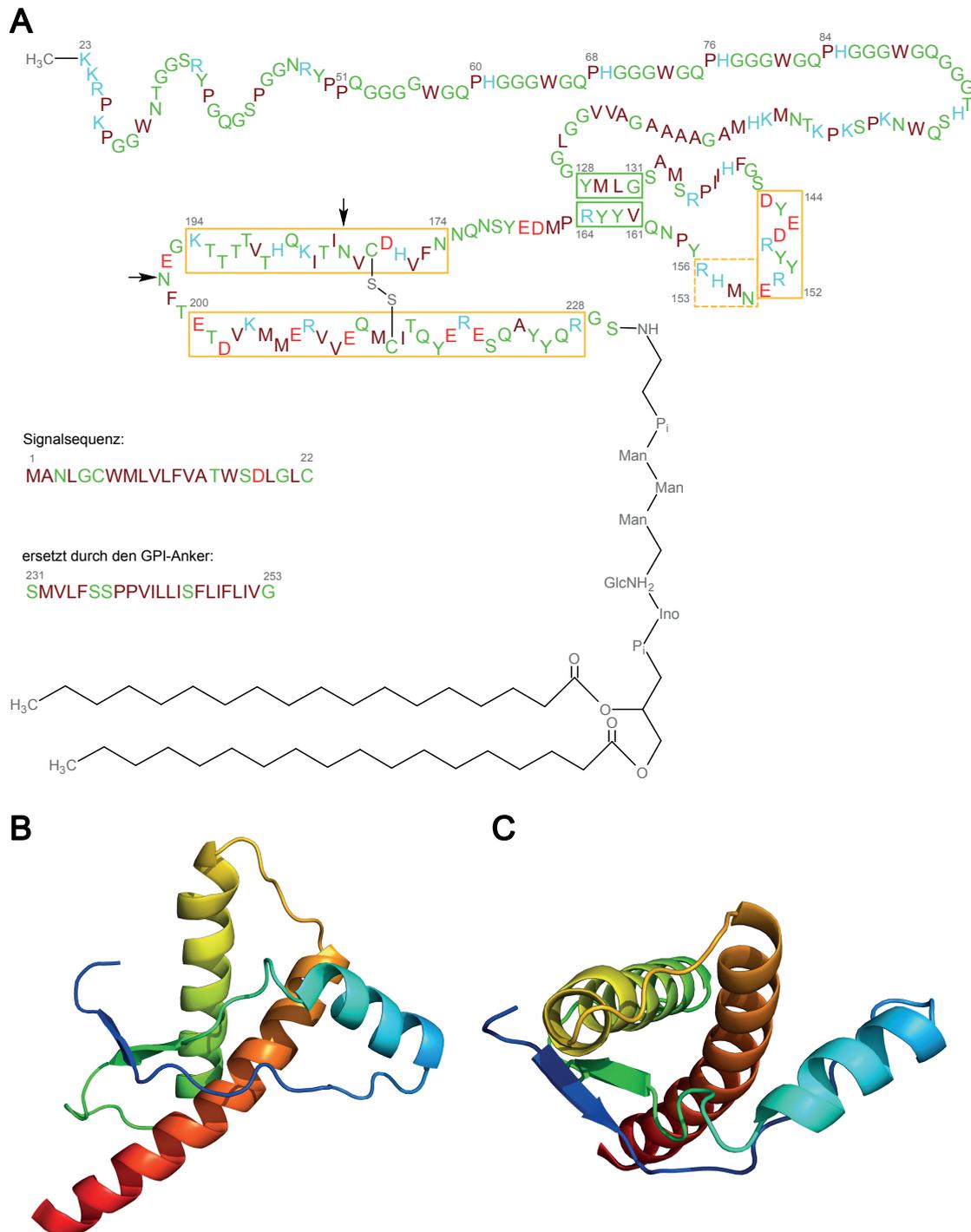


Abbildung 1.3: Struktur des Prion-Proteins. Das PrP besteht aus einem flexiblen N-Terminus sowie einem strukturierten C-Terminus bestehend aus einem antiparallelen β -Faltblatt (A, grüner Kasten), drei α -Helices (A, orangene Kästen) sowie einer 3_{10} -Helix (A, orangener gestrichelter Kasten). Die Pfeile zeigen auf die Glykosylierungsstellen. Rot: saure AS, blau: basische AS, grün: polare oder neutrale AS, braun: unpolare oder hydrophobe AS. Abbildung erstellt durch Lisa Galle [42] modifiziert nach [43]. Strukturmodelle des C-Terminus' ab AS 125 aus zwei verschiedenen Ansichten (B und C). PDB-Code: 1QLX.

Der C-terminale strukturierte Bereich besteht aus drei α -Helices (Abb. 1.3 A, orangene Kästen), einer kurzen 3_{10} -Helix (Abb. 1.3 A, orangener gestrichelter Kasten) sowie einem antiparallelen β -Faltblatt (Abb. 1.3 A, grüne Kästen) [40]. Die beiden C-terminalen α -Helices werden über eine Disulfidbrücke (Cys¹⁷⁹ und Cys²¹⁴) miteinander verbunden [40]. Ferner kann das PrP entweder un-, mono-, oder diglykosyliert vorliegen [39]. Die Glykosylierungsstellen sind hierbei Asn¹⁹⁷ und Asn¹⁸¹ (Abb. 1.3 A, schwarze Pfeile).

1.4.2 Prozessierung des Prion-Proteins

Wie zuvor bei APP beschrieben (siehe Kapitel 1.3), so kann auch das reife PrP proteolytisch prozessiert werden [32]. Insgesamt sind drei Stellen bekannt, an denen das PrP prozessiert werden kann, namentlich α -cleavage, β -cleavage und *shedding* [32]. Hierbei stellt der α -cleavage-Prozess die wichtigste Prozessierungsart dar, bei dem die sogenannten N1- und C1-Fragmente entstehen (Abb. 1.4 B). Der Schnitt erfolgt durch eine α -Sekretase entweder zwischen AS 110 und 111 oder zwischen AS 111 und 112 (beides humane Sequenz) [32, 44]. Ungeklärt ist jedoch, welche Protease die Funktion der α -Sekretase erfüllt; infrage kämen insbesondere die ADAM10 und ADAM17 [32, 45]. Die durch den α -cleavage-Prozess entstandenen C1-Fragmente akkumulieren an der Plasmamembran und machen -in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Gehirnregion- zwischen 5 % - 50 % der Gesamt-PrP-Menge aus [32, 44, 46]. Sowohl N1 als auch C1 können unter physiologischen Bedingungen in Hirnhomogenaten und Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden [32]. Durch den Schnitt wird die neurotoxische und amyloidogene Region des PrPs (AS 106 - 126) zerstört, das PrP vor Fehlfaltung geschützt und dem N1-Fragment wird eine neuroprotektive Funktion zugesprochen [32, 44, 47]. Somit stellt dieser Prozess eine wichtige physiologische Rolle dar.

Eine weitere unter physiologischen Bedingungen jedoch seltener auftretende Prozessierung stellt der β -cleavage-Prozess dar, bei dem die proteolytische Spaltung am Ende der Octarepeats erfolgt und das N2- sowie C2-Fragment entstehen [32] (Abb. 1.4 C). Im Gegensatz zu dem N1-Fragment erfüllt das N2-Fragment keine neuroprotektive Funktion und das C2-Fragment ist resistent gegenüber Proteasen und kann in Gehirnen von CJD-Patienten gefunden werden [44, 47]. Deshalb wird dem β -cleavage-Prozess eine pathophysiologische Bedeutung zugewiesen. Dieser könnte einen Schritt zum zellulären Schutz vor oxidativem Stress darstellen, da

der β -cleavage-Prozess wahrscheinlich durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst wird [32, 48, 49].

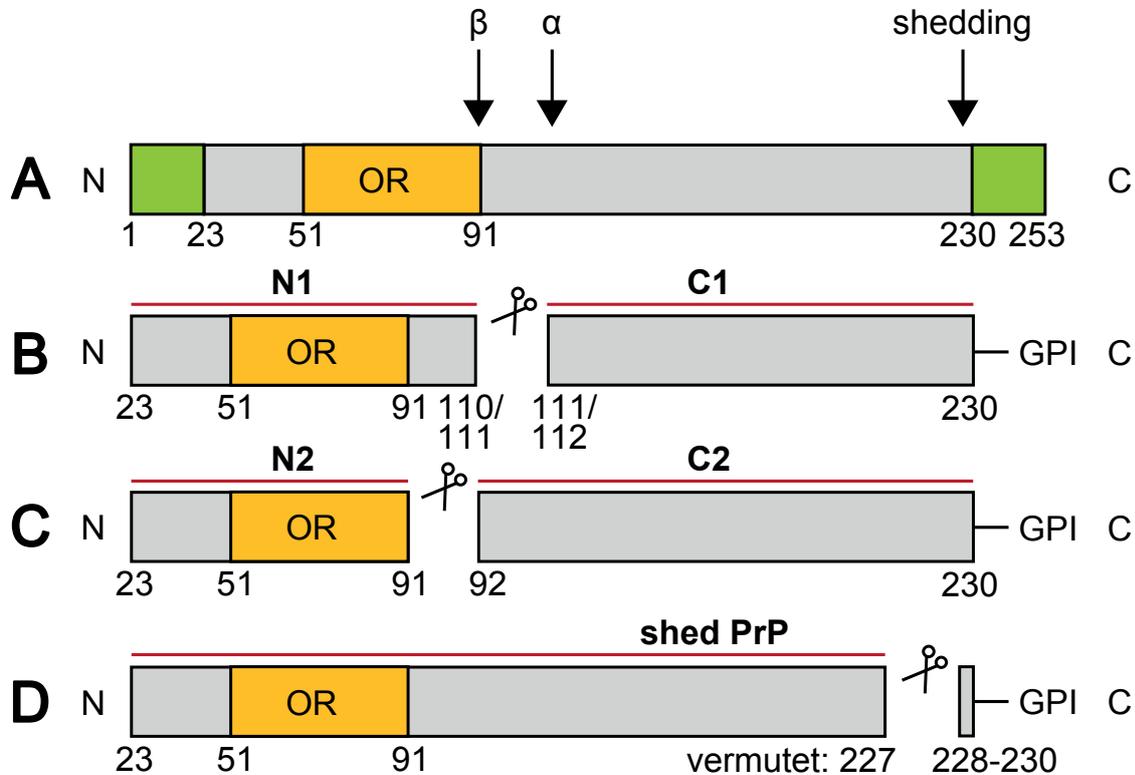


Abbildung 1.4: Prozessierung des Prion-Proteins. A: Nach Entfernung der N-terminalen Signalsequenz (AS 1 - 22, grüne Box) und des C-terminalen Propeptids (AS 231 - 253, grüne Box), welches durch einen Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker ersetzt wird, entsteht das Vollständigen-PrP, das auf drei verschiedenen Wegen prozessiert werden kann. Durch α -cleavage hinter AS 110 oder 111 entstehen das N1- und das C1-Fragment (B). β -cleavage erfolgt hinter der Octarepeatregion (OR, gelbe Box) und resultiert in dem N2- sowie C2-Fragment (C). PrP-shedding erfolgt in der Nähe des GPI-Ankers und führt zur Freisetzung von nahezu Vollständigen-PrP (D). Abbildung modifiziert nach [32].

Das sogenannte *shedding* ist ein Protease-vermittelter Prozess am Ende des PrP-C-Terminus' kurz vor dem GPI-Anker und resultiert in der Abspaltung von nahezu Vollständigen-PrP [32] (Abb. 1.4 D). Die ADAM10 konnte als *shedase* identifiziert werden und reguliert die PrP-Mengen an der Plasmamembran [32, 50]. Das von der Membran abgetrennte PrP könnte -wie das N1-Fragment auch- A β -Oligomere binden und diese zur Phagozytose und Degradation lenken [32]. Folglich wäre das *shedding* unter anderem ein Mechanismus zur Verhinderung A β -Oligomer-vermittelter toxischer Effekte [32] (siehe Kapitel 1.5).

1.4.3 Das PrP Y145Stop

Durch Mutation des Tyr¹⁴⁵ des PrPs zu einem Stop-Codon entsteht das verkürzte PrP Y145Stop Konstrukt, nachfolgend als PrP(23-144) bezeichnet, welches zu amyloiden Ablagerungen im Gehirn führt und die Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom ähnliche Krankheit „Cerebrale Amyloide Angiopathie“ auslöst [51, 52]. Das Hinzufügen von Phosphatpuffer zu in Wasser gelösten rekombinanten humanen PrP(23-144)-Monomeren *in vitro* führt zur Bildung von Fibrillen [51]. Es konnte gezeigt werden, dass die AS 138 - 141 essentiell für diese Umwandlung sind [51]. Nach Untersuchung der Fibrillen durch *magic angle spinning* (MAS) Festkörper-NMR-Spektroskopie (FK-NMR) konnte gezeigt werden, dass diese Fibrillen einen hoch geordneten Kern von AS 112 - 141 besitzen, der aus β -strängigen Segmenten besteht [52, 53]. Alle weiteren AS sind unter physiologisch relevanten Bedingungen weitestgehend unstrukturiert [52, 53]. Deletion der konservierten Palindromsequenz ¹¹³AGAAAAGA¹²⁰ führt zu einer Veränderung des amyloiden β -strängigen Kerns ohne die Amyloidogenität oder *seeding* Spezifität zu beeinflussen [54]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese PrP(23-144)-Fibrillen infektiös sind [55]. Insgesamt stellen PrP(23-144)-Fibrillen ein wertvolles *in vitro* Modell dar, um die strukturellen und molekularen Grundlagen amyloider *seeding* Spezifitäten zu beschreiben [56].

1.5 Interaktion von A β -Oligomeren mit dem Prion-Protein

Im Jahr 2009 screenen Laurén et al. gezielt nach einem Rezeptor, welcher biotinylierte A β (1-42)-Oligomere bindet [57]. Aus 225.000 Klonen wurden zwei unabhängige positive Klone isoliert, welche beide für murines Vollängen-Prion-Protein kodierten [57]. Nach diesem genomweiten Screen wurde eine weitere Bibliothek mit 352 bekannten Transmembranproteinen untersucht, bei der sowohl das *Amyloid- β precursor-like protein 1* (APLP1) als auch das Transmembranprotein 30B (TMEM30B) als A β -Oligomer bindende Proteine identifiziert wurden [57]. Doch die Affinitäten beider Proteine sind niedriger als die von PrP zu A β -Oligomeren. Ebenfalls die Oligomerselektivität, also das Verhältnis des Monomer-K_D-Wertes zu dem Oligomer-K_D-Wert ist für das PrP am Größten und zeigt somit, dass das Vorhandensein von A β -Oligomeren für die A β -PrP-Bindung von Bedeutung ist [57, 58].

1.5.1 Bindestellen

Nach intensiven Untersuchungen verschiedener PrP-Deletionsmutanten konnten die Bindestellen für A β -Oligomere auf dem Prion-Protein den Regionen 23 - 27 sowie 95 - 110 zugewiesen werden [57, 59–62] (Abb. 1.5, dunkelblaue Kästen). Beide Bindestellen befinden sich nicht nur innerhalb des N-terminalen, unstrukturierten Bereich des PrPs [40], sondern sogar auf dem N1-Fragment (Aminosäure (AS) 23 - 110/111), welches durch natürliche Prozessierung (α -cleavage) des membranverankerten PrPs entsteht [44, 63] (siehe Kapitel 1.4.2). Interessanterweise ist die polybasische Region des PrP-N-Terminus' (Sequenz: KKRP) nicht nur an der Bindung von A β -Oligomeren beteiligt, sondern wird ebenfalls für die Inhibition der β -Sekretase BACE1 benötigt [64], welche für die Prozessierung des APP und Entstehung von A β verantwortlich ist (siehe Kapitel 1.3).

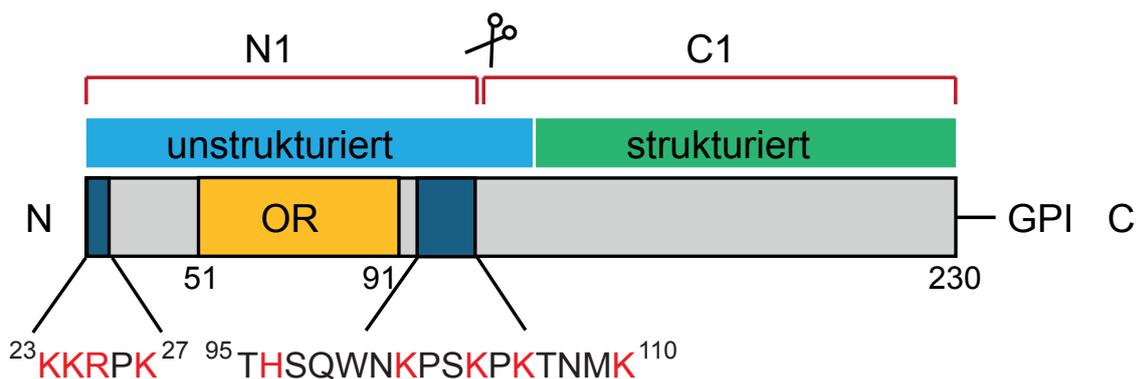


Abbildung 1.5: A β -Bindestellen auf dem Prion-Protein. In den dunkelblauen Kästen sind die Bindestellen für A β -Oligomere und darunter die dazugehörige PrP-Sequenz angegeben. Die Bindestellen befinden sich an den Regionen 23 - 27 und 95 - 110. Rot markierte Aminosäuren sind basisch und tragen folglich eine positive Ladung. Ebenfalls gezeigt sind die PrP-Regionen, die strukturiert bzw. unstrukturiert sind, sowie die Schnittstelle der α -Sekretase, die das PrP in das N1- und C1-Fragment teilt. OR: Octarepeats, GPI: Glycosylphosphatidylinositol-Anker.

Es konnte gezeigt werden, dass beide identifizierten Bindestellen auf dem PrP für eine Bindung von A β -Oligomeren nötig sind, da die Deletion einer der beiden Regionen zu einer deutlichen Abnahme der Bindung führt [59]. Hierbei macht es keinen Unterschied, ob Met¹²⁹ oder Val¹²⁹ des natürlichen PrP-Polymorphismus' verwendet wird [59], da diese Region nicht an der Bindung beteiligt ist. Beide Bindestellen zeichnen sich durch ihren erhöhten Anteil positiv geladener Aminosäuren aus (Abb. 1.5). Ein Austausch dieser zu den ungeladenen AS Glycin oder Alanin reduziert zwar die Bindung von A β -Oligomeren, jedoch ohne die Bindungskonstante zu beeinflussen [60] und ist ein Indiz dafür, dass es sich bei der A β -PrP-Interaktion

wahrscheinlich nicht um eine rein elektrostatische Bindung handelt. Der strukturierte C-terminale Bereich des PrPs wird hingegen nicht für die Bindung von A β -Oligomeren benötigt. Das N1-Fragment bzw. sogar Mutanten, bei denen die Octarepeats, eine Region, die sich zwischen den Bindestellen befindet (Abb. 1.5, OR), deletiert wurden, reichen für eine Bindung mit nanomolarer Affinität aus [59, 60]. Hierbei ist die Bindung von A β und PrP, bzw. A β und dem N1-Fragment des PrPs konzentrationsabhängig [59, 60].

Obwohl die Bindestellen auf Seite des PrPs identifiziert und intensiv untersucht wurden, so gestaltet sich die Suche nach den Bindestellen auf A β -Seite hingegen als schwierig. Sowohl A β als auch PrP wurden durch einen *epitope mapping immunoassay* untersucht und die oben genannten Binderegionen auf dem PrP konnten hierbei bestätigt werden [62]. Für A β jedoch konnten keine Binderegionen für PrP identifiziert werden, was vermuten lässt, dass eine bestimmte dreidimensionale Konformation des A β für die Bindung benötigt wird [62], ohne die eine Identifikation der Bindestellen nicht möglich ist. Diese Beobachtung wird dadurch unterstützt, dass weder mit A β (1-42)-Monomeren noch mit langen oder fragmentierten A β (1-42)-Fibrillen eine Bindung an das Prion-Protein über Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie nachgewiesen wurde [59, 60]. Nieznanski et al. hingegen zeigten, dass auch eine Bindung von PrP an A β -Fibrillen durch laterale Assoziation an bereits gebildete Fibrillen erfolgt [65]. Younan et al. hingegen beobachteten eine Disassemblierung von A β (1-40)-Fibrillen nach Hinzufügen von PrP [61]. Dies konnte jedoch durch keine weitere Gruppe beobachtet werden.

Auch wenn es verschiedene Beobachtungen bezüglich der Interaktion von PrP mit reifen A β -Fibrillen gibt, so sind sich die Wissenschaftler jedoch darüber einig, dass PrP und N-terminale PrP-Fragmente wie N1 die spontane A β -Fibrillenbildung verhindern [60, 61, 66]. Hierfür genügen niedrige PrP-Mengen von 1/20 Mol-Äquivalenten [61]. Ebenfalls die induzierte A β -Fibrillenbildung kann in Anwesenheit von PrP verhindert werden [65]. Auf diesen Beobachtungen basierend entstand der Gedanke PrP-Fragmente bzw. PrP-basierte Peptide und Derivate als mögliches Therapeutikum gegen Alzheimer zu verwenden [60, 65, 66].

1.5.2 Größe der PrP-bindenden A β -Oligomere

Trotz der Einigkeit darüber, dass A β -Oligomere an der PrP-Bindung beteiligt sind, ist dennoch unklar wie groß die bindende A β -Spezies ist. Der Begriff „Oligomer“ beschreibt eine große Vielfalt an nicht-monomeren A β -Spezies, welche entweder durch verschiedene Methoden *in vitro* generiert oder aus Hirngewebe isoliert werden [21]. Insbesondere die verschiedenen Techniken zur Generierung von A β -Oligomeren *in vitro* erschweren die Vergleichbarkeit der Ergebnisse, besonders wenn entweder eine bestimmte Größe an Oligomeren (z.B. nach SEC) verwendet wird oder die gesamte Probe mit einer großen Vielzahl an diversen generierten A β -Oligomeren untersucht wird. Aber auch der Mangel an zuverlässigen Detektions- und Quantifikationsmethoden erschwert die Identifikation von A β -Oligomeren einer definierten Größe [21]. So ist es nicht verwunderlich, dass auch im Falle der Interaktion von A β -Oligomeren mit PrP Uneinigkeit über die Größe des oder der involvierten A β -Oligomerspezies herrscht.

So wurde zum einen gezeigt, dass überwiegend kleine A β -Oligomere (Dimere und Trimere) mit dem PrP interagieren [67]. Diese Beobachtung machten auch Williams et al. [68] bei Verwendung der *Photo-Induced Crosslinking of Unmodified Proteins* (PICUP)-Methode, bei der die Oligomere unter Ausbildung einer kovalenten Bindung gebildet werden. Deshalb ist eine genaue Zuordnung der Größe der Oligomere möglich, weil eine definierte Oligomerspezies untersucht wird und kein Gemisch aus verschiedenen großen A β -Oligomeren.

Zum anderen gibt es auch Untersuchungen, die belegen, dass die Bindung von PrP an hochmolekulare A β -Spezies erfolgt [69, 70]. Hierbei konnten Dohler et al. nachweisen, dass ausschließlich bei Alzheimer-Patienten und nicht bei der Kontrollgruppe eine Bindung von A β -Oligomeren an PrP erfolgt und es sich bei diesen um hochmolekulare A β -Spezies handelt (150 kDa - 300 kDa) [69]. Gleichzeitig wurde im Falle von synthetischem A β eine optimale Bindung an PrP für 8 kDa - 16 kDa große A β -Oligomere gezeigt, welche mit Dimeren bis Tetrameren korrelieren [69]. Weitere große A β -Strukturen, mit denen eine Bindung an PrP und infolgedessen Synaptotoxizität nachgewiesen wurde, sind Protofibrillen, welche die Struktur einer Nanoröhre aufweisen [71]. Es konnte ebenfalls die Interaktion von PrP mit reifen A β -Fibrillen gezeigt werden [65]. All diese Ergebnisse zeigen, dass es wahrscheinlich verschieden große A β -Oligomere gibt, die mit dem PrP interagieren, bzw. dass diese Interaktion von den Oligomerpräparationen und weiteren Faktoren abhängig ist.

1.5.3 Signalweiterleitung über die Membran

Bereits bei ihrer Entdeckung der Bindung von A β -Oligomeren an das zelluläre PrP konnten Laurén et al. zeigen, dass das PrP an der Vermittlung eines synaptotoxischen Signals durch A β -Oligomere beteiligt ist und dass die Bindung von A β -Oligomeren und PrP nicht die infektiöse Form des PrPs (PrP^{Sc}) erfordert [57]. Diese Rolle des PrPs wurde jedoch kurz darauf durch andere Forscherteams in Frage gestellt. So bestätigten Balducci et al. zwar die nanomolare Affinität von PrP zu A β -Oligomeren, konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von PrP und der kognitiven Beeinträchtigung durch A β -Oligomere sehen [72]. Auch weitere Gruppen berichten über diverse Experimente, bei denen die A β -vermittelte Toxizität das PrP nicht erfordert [73–75]. Trotzdem wurden die Ergebnisse von Laurén et al. vielfach bestätigt [71, 76–83]. So konnte beispielsweise durch die Verwendung von anti-PrP-Antikörpern (z.B. 6D11) und einer daraus resultierenden Abschirmung des PrPs gezeigt werden, dass weniger A β -Oligomere gebunden werden [77] und die intrazelluläre Calciumkonzentration, welche üblicherweise durch die A β -Oligomerzugabe steigt, konstant bleibt [83]. Auch die enzymatische Spaltung des zellulären PrPs von der Plasmamembran durch die Phospholipase C resultiert in einer A β -Abnahme an den Neuronen [83].

Im Jahr 2012 zeigten Um et al., dass durch die Bindung von A β -Oligomeren an zelluläres PrP die intrazelluläre Tyrosinkinase Fyn aktiviert wird [78] (Abb. 1.6). Über diese war zuvor bereits bekannt, dass sie in der postsynaptischen Dichte (PSD) lokalisiert ist [84] und die Untereinheiten GluN2A und GluN2B (früher: NR2A bzw. NR2B) von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren, nicht-selektiven Kationenkanälen, phosphoryliert [84, 85]. Um et al. konnten nachweisen, dass PrP ebenfalls in der PSD angereichert ist [78] und stellten einen vorläufigen Signalweg auf: Nach Bindung von A β -Oligomeren an PrP wird die intrazelluläre Fyn-Kinase aktiviert, welche die GluN2B-Untereinheit von NMDA-Rezeptoren phosphoryliert. Dies führt zu einer veränderten NMDA-Rezeptor-Lokalisierung und zu einer Destabilisierung von dendritischen Dornen (Englisch: *dendritic spines*) im Gehirn [78, 86].

Darüberhinaus konnten Larson et al. zeigen, dass die durch die Fyn-Kinase vermittelte Hyperphosphorylierung des Tau-Proteins abhängig von der A β -PrP-Interaktion ist [87]. Wird die PrP-Konzentration verringert, so gibt es auch weniger hyperphosphoryliertes Tau-Protein [87].

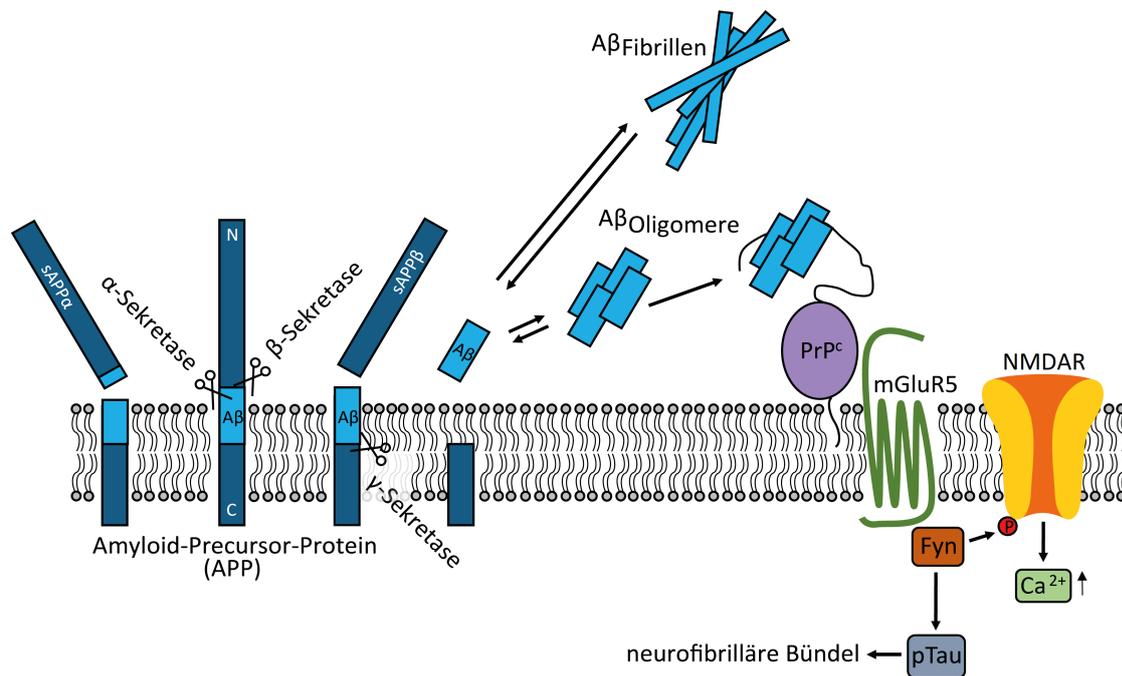


Abbildung 1.6: Signalweiterleitung über mGluR5 und Fyn-Kinase. Wird das Amyloid-Precursor-Protein (APP) durch die β - und γ -Sekretase prozessiert, so entsteht A β , welches zu Oligomeren und weiter zu Fibrillen aggregieren kann. Die A β -Oligomere interagieren mit dem zellulären PrP (PrP^c), welches über einen GPI-Anker mit der Zellmembran verankert ist. Durch Interaktion des A β -PrP-Komplexes mit mGluR5 wird die Fyn-Kinase aktiviert. Diese phosphoryliert Tau sowie NMDA-Rezeptoren. Die Phosphorylierung von Tau führt zur Bildung neurofibrillärer Bündel, während die Phosphorylierung von NMDA-Rezeptoren zu einer Veränderung der Menge an NMDA-Rezeptoren in der Membran führt. Final resultiert dies in Veränderungen der Calciumkonzentrationen in der Zelle und zur Zytotoxizität [78]. Abbildung modifiziert nach [88, 89].

Trotz der vielen neuen Erkenntnisse gab es noch ein weiteres Hindernis zu klären: PrP wird lediglich durch einen GPI-Anker mit der Membran verbunden. Es handelt sich bei PrP somit um kein Transmembranprotein, welches ein Signal von ex- nach intrazellulär weiterleiten kann. Somit muss es einen weiteren Rezeptor geben, welcher an der Signaltransduktion beteiligt ist. Hierfür wurde über verschiedene Proteine spekuliert [90]. Geklärt wurde diese Fragestellung durch Um et al. im Jahr 2013. Nach Untersuchung von 81 bekannten Transmembranproteinen, welche sich in der PSD befinden, identifizierten sie den metabotropen Glutamatrezeptor 5 (mGluR5) [91]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass mGluR5 nicht A β , sondern PrP und Fyn physisch bindet und diese beiden somit miteinander verknüpft [91] (Abb. 1.6). Die Interaktion von PrP und A β -Oligomeren resultiert in mGluR5-vermitteltem Anstieg von intrazellulärem Calcium und der mGluR5-Antagonist

3-((2-Methyl-4-thiazolyl)ethynyl)pyridin (MTEP) macht Beeinträchtigungen des Lern- sowie Erinnerungsvermögens rückgängig [91, 92]. So konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von mGluR5 und zellulärem PrP eine zentrale Rolle bei der Alzheimerschen Demenz spielt [93].

Neben dem oben aufgeführten Signalweg gibt es noch einen weiteren beschriebenen Weg, an dem sowohl PrP als auch A β beteiligt sind. PrP bindet Cu²⁺ mit hoher Affinität [94–96]. Im Jahr 2012 zeigten You et al., dass native NMDA-Rezeptoren neben den bekannten Aktivatoren Glutamat und Glycin durch Kupferionen reguliert werden [82] (Abb. 1.7 A). Sowohl Komplexierung des Cu²⁺ durch Kupferchelatoren wie Bathocuproindisulfonsäure (Englisch: *bathocuproine sulfonate*) (BCS) (Abb. 1.7 B) als auch Knockout des PrPs (Abb. 1.7 C) resultieren in einer höheren Affinität der NMDA-Rezeptoren für Glycin, was final eine größere Akkumulation von Ca²⁺ in der Zelle zur Folge hat [82, 97]. Ferner zeigten sie, dass diese Effekte nicht additiv sind und schlossen daraus auf eine PrP-vermittelte Cu²⁺-Regulation von NMDA-Rezeptoren [82, 97]. Das Hinzufügen nanomolarer Konzentrationen von A β (1-42)-Oligomeren (Abb. 1.7 D) erzielte denselben Effekt wie der Einsatz von Kupferchelatoren oder die Entfernung des PrPs (sei es durch ein Knockout des Gens oder Abschneiden des GPI-Ankers) [82, 97]. Ebenfalls das Hinzufügen mikromolarer Konzentrationen von A β (1-42)-Monomeren resultiert in erhöhter Calciumakkumulation in der Zelle [82, 97]. Über A β (1-42) ist bekannt, dass es ebenfalls ein hochaffines Kupfer-bindendes Peptid ist [98] und der Einsatz hoher A β (1-42)-Monomerkonzentrationen folglich denselben Effekt auf NMDA-Rezeptoren hat wie BCS [82, 97]. Final führt der Einsatz von A β zu kultivierten Neuronen zum Zelltod, welcher aber durch NMDA-Rezeptorantagonisten oder durch Kupferüberschuss verhindert werden kann [82, 97]. Insgesamt kann festgehalten werden, dass ebenfalls durch diesen Mechanismus der neurotoxische Effekt von A β durch eine Unterbindung der normalen Cu²⁺-Regulation von NMDA-Rezeptoren durch das PrP erklärt werden kann.

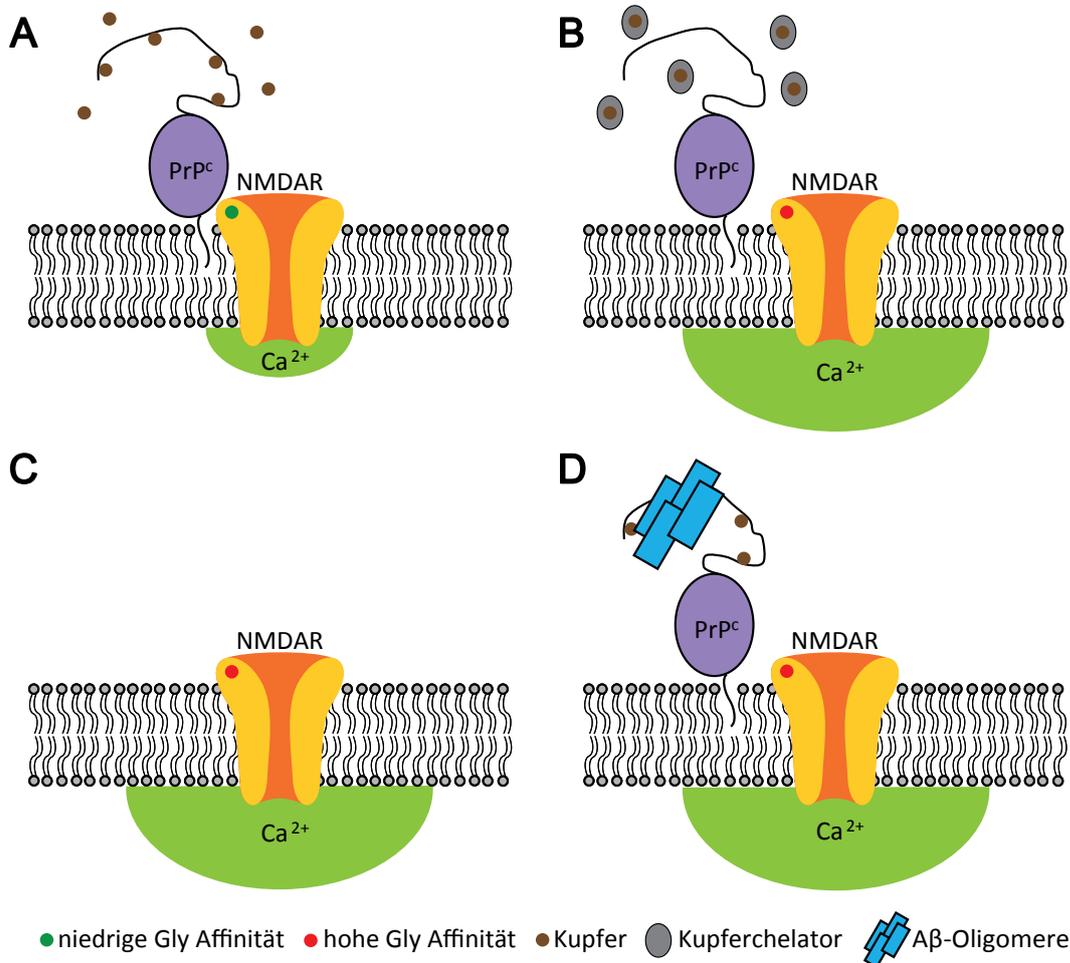


Abbildung 1.7: NMDA-Rezeptor-Regulation durch Kupfer und PrP. Unter normalen Bedingungen wird der NMDA-Rezeptor durch das mit Cu^{2+} beladene PrP reguliert und die Affinität für den NMDA-Rezeptor Co-Agonisten Glycin reduziert (A). Werden die Kupferionen durch einen Chelator komplexiert, so wird die Assoziation zwischen PrP und dem Rezeptor geschwächt. Dies führt zu einer erhöhten Glycinaffinität des Rezeptors und erhöhten Calciumkonzentrationen in der Zelle (B). Deletion des PrPs resultiert ebenfalls in erhöhten intrazellulären Calciumkonzentrationen (C). Bindung von A β -Oligomeren an PrP verhindert die Regulation der NMDA-Rezeptoren durch PrP und erzielt denselben Effekt wie B und C (D). Abbildung modifiziert nach [97].

1.5.4 Die A β -PrP-Interaktion als möglicher Therapieansatzpunkt

Die oben aufgeführten Signalwege deuten auf ein hohes Potential der A β -PrP-Interaktion als Ansatzpunkt zur Therapie gegen Alzheimer hin. Im Folgenden werden einige Therapiemöglichkeiten und deren aktueller Stand zusammengefasst, die ausführlich in dem Review von Elezgarai und Biasini beschrieben werden [45]. Die unter 1.5.3 beschriebenen Signalwege vorausgesetzt, gibt es vier verschiedene Ebenen, auf denen eingegriffen werden könnte, um die Weiterleitung eines toxischen Signals zu beeinflussen bzw. gänzlich zu unterbinden [45]: 1) Silencing der PrP-Expression, 2) Verringerung der funktionellen PrP-Menge an der Zelloberfläche, 3) Entwicklung von PrP-bindenden Pharmazeutika, 4) Unterbindung der A β -abhängigen PrP-vermittelten Signalweiterleitung.

1) Das Silencing der PrP-Expression könnte entweder durch sogenannte *short hairpin* RNAs (shRNAs) oder durch direktes Ausschalten des PrP-Gens vermittelt werden [45]. In Mäusen konnten mit beiden Methoden schon Erfolge erzielt werden [57, 76, 99] und es gibt bereits vielversprechende Methoden, die das Ausschalten von Genen im Menschen ermöglichen und zukünftig angewandt werden könnten. Dennoch birgt das Stilllegen eines Gens immer ein Risiko, insbesondere dann, wenn die physiologische Funktion des Proteins nicht geklärt ist (siehe Kapitel 1.4) und es keine Daten möglicher Spätfolgen gibt.

2) Zur Verringerung der funktionellen PrP-Menge an der Zelloberfläche sind ebenfalls Ansatzpunkte denkbar. So könnte das PrP entweder durch die Phospholipase C vom GPI-Anker oder durch *shedding* durch die Protease ADAM10 gelöst werden [32, 50, 83] (Abb. 1.8 A). Dies würde dazu führen, dass weniger PrP an der Membran vorhanden ist, um ein toxisches Signal weiterzuleiten. So konnte für das Medikament Acitretin in einer klinischen Phase 2 gezeigt werden, dass es die ADAM10-Transkription erhöht und sich positiv auf Alzheimerpatienten auswirkt [100]. Ebenfalls die Zunahme des α -*cleavage*-Prozesses durch eine ADAM-Protease (Abb. 1.8 E) könnte ein Ansatzpunkt sein. Hierbei würde das N1-Fragment des PrPs, welches die Bindestellen für A β -Oligomere enthält, abgetrennt, weshalb die A β -Oligomere nicht mehr an membranständiges PrP binden könnten. Zusätzlich hätte es den weiteren positiven Effekt, dass das N1-Fragment die löslichen A β -Oligomere abfängt und somit neuroprotektiv wirkt [60, 66, 101].

3) Ein weiterer Therapieansatz stellt die Entwicklung PrP-bindender Pharmazeutika dar. Hierdurch würde ebenfalls die Signalweiterleitung unterbunden, da A β -Oligomere nicht mehr an PrP binden könnten (Abb. 1.8 B). So konnte bereits gezeigt werden, dass anti-PrP-Antikörper eine Anlagerung von A β verhindern und eine Weiterleitung des toxischen Signals unterbinden [57, 77, 79, 83]. Darüber hinaus wird nach kleinen organischen Molekülen gesucht, die PrP binden. Nachgewiesen werden konnte das bisher für zwei. Zum einen für das kationische Porphyrin mit dem Namen „Fe(III)-TMPyP“, zum anderen für Chicago Sky Blue 6B (CSB), welches nach einem Screen von 1.200 Komponenten identifiziert wurde [45, 102, 103]. Für das Porphyrin konnte eine Bindung am C-terminalen strukturierten Bereich des PrPs nachgewiesen werden, während CSB am flexiblen PrP-N-Terminus bindet [45, 102, 103]. CSB ist das erste identifizierte kleine Molekül, das eine Bindung von A β an PrP verhindert. Ebenfalls das Polysaccharid Dextransulfat-Natrium ist ein potentieller Kandidat zur Unterbindung der A β -PrP-Interaktion, obgleich keine direkte Bindung an PrP nachgewiesen werden konnte [45, 104]. Dextransulfat-Natrium wird bereits zur Behandlung von Menschen mit Hypertriglyceridämie verwendet [104]. Leider haben alle bisher gefundenen PrP-bindenden Moleküle Eigenschaften, welche eine Verwendung *in vivo* einschränken, sei es eine niedrige Spezifität, hohe Zytotoxizität oder die Unfähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden [45].

Ebenfalls Peptide, die von dem N-Terminus des PrPs abgeleitet werden, könnten möglicherweise als Medikamente wirksam sein. So konnte bereits für das N1-Fragment und Deletionsmutanten dessen gezeigt werden, dass es A β -Oligomere bindet und die A β -vermittelte Zytotoxizität verhindert [59, 60, 66, 101].

4) Die Unterbindung der A β -abhängigen PrP-vermittelten Signalweiterleitung stellt eine weitere Therapiemöglichkeit dar. Hier gibt es mehrere Ansatzpunkte, insbesondere die Fyn-Kinase (Abb. 1.8 D), mGluR5 (Abb. 1.8 C) und NMDA-Rezeptoren (Abb. 1.8 F). So konnte gezeigt werden, dass mit AZD0530 (Saracatinib), einem Kinase-Inhibitor, Synapsen- und Gedächtnisverlust in transgenen Mäusen entgegengewirkt werden konnte [88, 105]. Auch die Inhibition von mGluR5 scheint ein vielversprechender Ansatzpunkt zu sein. So zeigten Um et al., dass nach Einsatz von MTEP, einem negativen allosterischen Modulator von mGluR5, Lern- sowie Erinnerungsdefizite in transgenen Mäusen verhindert werden können [91]. Ebenfalls der mGluR5 selektive, oral biologisch verfügbare, negative allosterische Modulator CTEP zeigt ähnliche Erfolge wie MTEP und reduziert die Konzentration löslicher A β -Oligomere sowie die Ablagerung amyloider Plaques [106].

Eines der wenigen verfügbaren Medikamente gegen Alzheimer stellt Memantin, ein NMDA-Rezeptorantagonist, dar [45, 107]. Dieses zeigte sich in diversen Studien mit transgenen Mäusen als neuroprotektiv, ist im Menschen jedoch weniger effektiv [45]. Das liegt wahrscheinlich daran, dass die Wirksamkeit von Memantin lediglich in jungen Mäusen gezeigt werden kann, jedoch keinen Effekt auf Mäuse mit fortgeschrittenem Krankheitsverlauf hat [45, 108]. Ähnlich wird es sich im Menschen verhalten, da der Beginn der Alzheimer-Krankheit weit vor dem Ausbruch mit starkem Gedächtnisverlust liegt. Dennoch sind NMDA-Rezeptoren ein vielversprechendes Ziel für die Entwicklung neuer Medikamente.

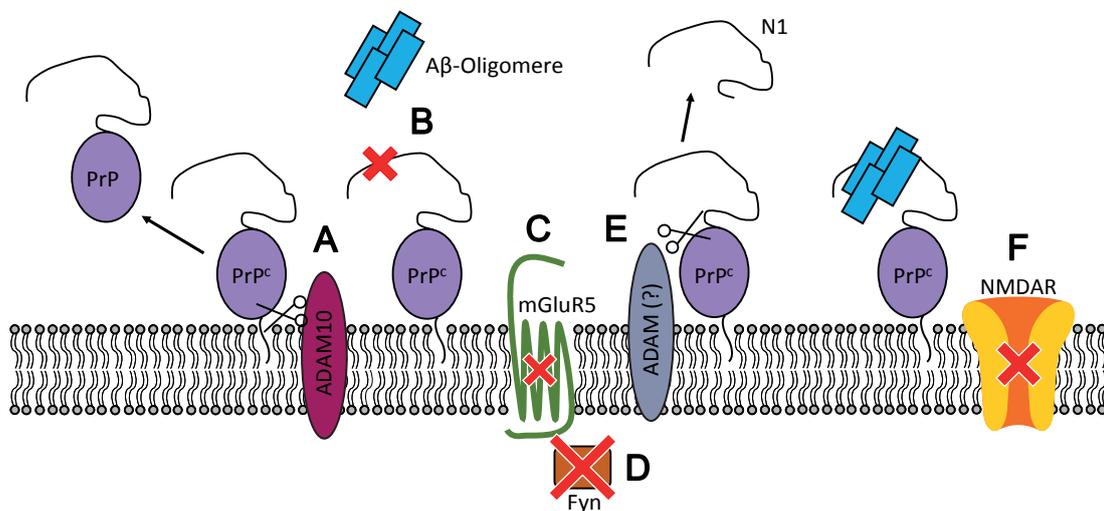


Abbildung 1.8: Mögliche Therapieansatzpunkte gegen Alzheimer. Erhöhung der Proteaseaktivität von ADAM10 würde *shedding* des PrPs von der Membran steigern und somit weitere folgenden Mechanismen unterbinden (A). Eine Verhinderung der Bindung der toxischen A β -Oligomere beispielsweise durch PrP-bindende Komponenten, würde ebenfalls eine Signalweiterleitung verhindern (B). Auch die Inhibition von mGluR5 (C) und der Fyn-Kinase (D) sind potentielle Ziele für Medikamente. Begünstigung des α -*cleavage*-Prozesses des PrPs durch eine ADAM-Protease (welche es ist, ist noch nicht geklärt) würde zur Entfernung des N1-Fragments führen. Dies würde zum einen verhindern, dass A β -Oligomere an membranständiges PrP binden und andererseits das Komplexieren löslicher A β -Oligomere begünstigen (E). Auch NMDA-Rezeptorantagonisten könnten die Weiterleitung eines toxischen Signals verhindern (F). Abbildung modifiziert nach [45].

1.6 D-Peptide als Wirkstoffe gegen Alzheimer

Eine vielversprechende Wirkstoffklasse stellen D-enantiomere Peptide dar. Im Gegensatz zu den natürlich vorkommenden L-Peptiden und L-Proteinen bestehen diese ausschließlich aus D-Aminosäuren. Wegen der Enantioselektivität der meisten im Körper vorkommenden proteolytischen Enzyme werden D-Peptide deutlich seltener durch Proteasen degradiert, bleiben somit länger im Körper und können über einen größeren Zeitraum therapeutisch aktiv sein [109]. Darüber hinaus sind diese weniger immunogen als L-konfigurierte Peptide [110].

Zur Selektion von D-Peptiden eignet sich das Spiegelbild-Phagendisplay [111]. Hierbei wird eine Bibliothek mit Phagen, die aus L-Aminosäuren bestehende Peptide exprimieren, gegen ein D-konfiguriertes Zielprotein untersucht. Wurde ein das D-Zielprotein bindende L-Peptid selektiert, so kann die Konfiguration invertiert werden und das nun D-konfigurierte Peptid derselben Aminosäuresequenz bindet das entsprechende L-enantiomere Zielprotein.

Mit Hilfe des Spiegelbild-Phagendisplays wurde nach A β (1-42) bindenden 12 AS langen D-Peptiden gesucht und es konnte ein D-Peptid gefunden werden, das spezifisch an A β bindet. [112, 113]. Im Jahr 2008 wurde das D-Peptid D3 (Struktur siehe Abb. 1.9) aus einer Bibliothek mit 1×10^9 verschiedenen 12 AS langen Peptiden selektiert [114]. Hier zeigten 9 von 23 zufällig ausgewählten Klonen dieselbe Sequenz [114]. Zur Selektion wurden Bedingungen gewählt, bei denen A β -Monomere bzw. kleine A β -Oligomere die Hauptspezies darstellen [114]. Es konnte gezeigt werden, dass D3 toxische A β -Spezies unter der Ausbildung amorpher Co-Aggregate bindet ohne die Konzentration von monomerem A β zu erhöhen [115]. Diese Co-Aggregate weisen keine amyloidogene oder fibrilläre Struktur auf und sind nicht toxisch für die Zellen [115]. Die Behandlung mit D3 reduziert die Anzahl amyloider Plaques und verbessert die kognitiven Fähigkeiten transgener Mäuse [114, 115]. Dies ist auch dann der Fall, wenn D3 erst bei fortgeschrittenem Krankheitsverlauf verabreicht wird [116]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass D3 in Medien, die den Weg oral verabreichter Medikamente simulieren (Gastrointestinaltrakt, Blut, Leber), eine hohe Stabilität aufweist [117].

Ein weiteres intensiv untersuchtes D-Peptid ist RD2 (Abb. 1.9). Dieses wurde rational designed und setzt sich aus denselben AS zusammen wie D3, jedoch in einer anderen Reihenfolge. RD2 reduziert A β -Oligomere effektiver als D3 [118], ist oral biologisch verfügbar und weist eine lange Halbwertszeit von etwa 60 h auf [119]. L-enantiomere Peptide werden oftmals innerhalb von wenigen Minuten aus dem Blut entfernt [119].

Sowohl für D3 als auch für RD2 konnte eine starke Bindung zu A β nachgewiesen werden, die durch elektrostatische Interaktionen zwischen den positiv geladenen Argininen der D-Peptide und den negativen Ladungen auf Seiten von A β erfolgt [120, 121]. Insbesondere die N-terminalen AS Glu¹¹, Glu²² und Asp²³ des A β sind an der Bindung beteiligt [121]. Die Bindung von D3 verursacht strukturelle Veränderungen von A β und reduziert den β -Faltblattanteil [120]. Insgesamt sind die anti-amyloiden Eigenschaften der D-Peptide abhängig von der Länge und Sequenz des jeweiligen Peptids, schwachen hydrophoben Interaktionen zwischen Peptid und A β und der Größe der A β -Oligomere [121]. All diese vielversprechenden Ergebnisse zeigen, dass D-Peptide möglicherweise als Therapeutikum gegen Alzheimer eingesetzt werden könnten.

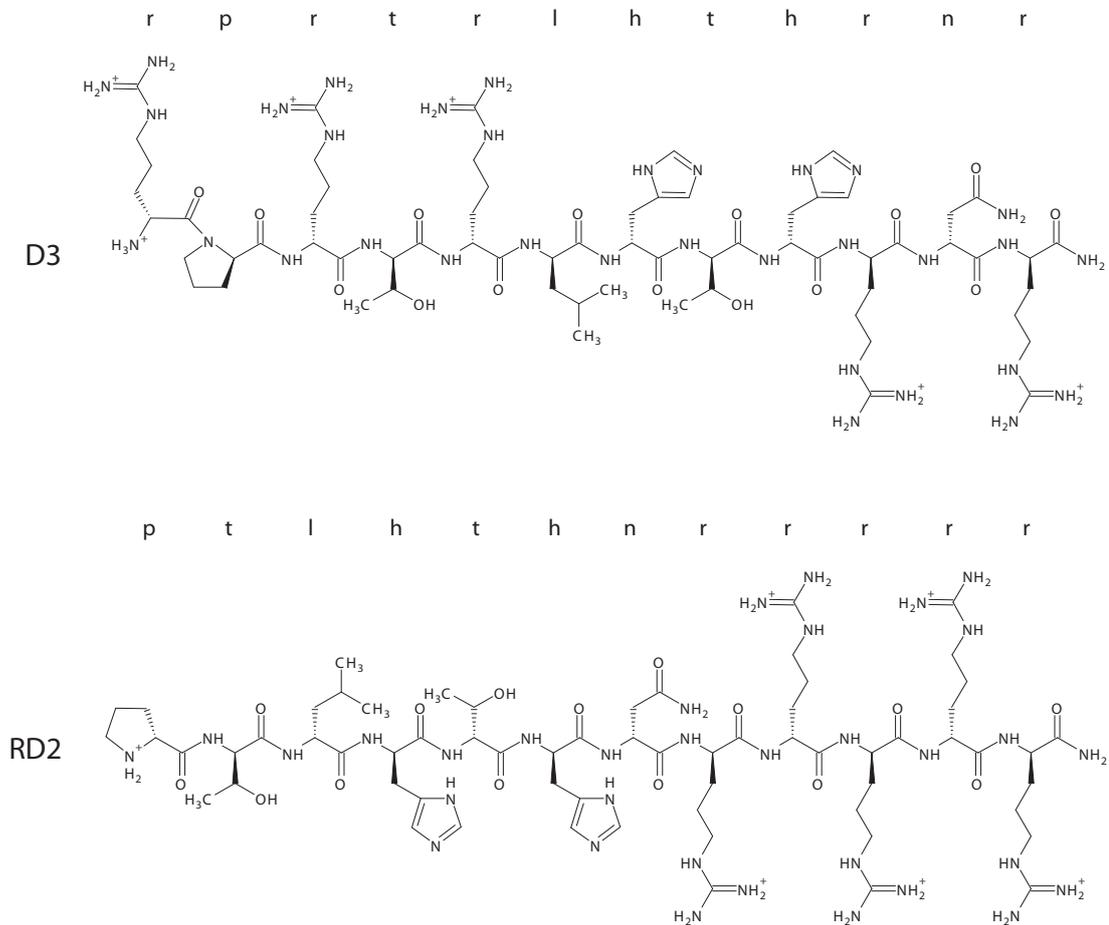


Abbildung 1.9: Strukturen der D-enantiomeren Peptide D3 (oben) und RD2 (unten). Beide D-Peptide setzen sich aus denselben D-Aminosäuren zusammen, welche jedoch in einer anderen Reihenfolge miteinander verknüpft sind. Abbildung modifiziert nach [115] und [119].

1.7 Fragestellung

Die Alzheimersche Demenz wird, bedingt durch die älter werdende Bevölkerung, zu einer immer größeren sozialen und ökonomischen Herausforderung für die Gesellschaft. Nach der Entdeckung, dass das zelluläre PrP an einer Weiterleitung des toxischen Signals vermittelt durch mit Alzheimer assoziierte A β -Oligomere beteiligt ist, ergibt sich ein neuer möglicher Ansatzpunkt zur Therapie der Alzheimerschen Demenz.

Das Ziel dieser Arbeit ist es diese Interaktion zwischen A β -Oligomeren und dem PrP zu untersuchen. Hierbei soll der Einfluss verschiedener PrP-Deletionsmutanten auf die Bindung von A β -Oligomeren charakterisiert und eine Stöchiometrie der beiden Bindungspartner ermittelt werden. Ebenfalls sollen strukturelle Charakteristika der entstandenen A β -PrP-Komplexe über Rasterkraftmikroskopie (AFM) und *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR)-Spektroskopie aufgedeckt werden.

Die genaue Erforschung der A β -PrP-Interaktion ist Voraussetzung dafür, dass nach Wirkstoffkandidaten gesucht werden kann, die diese Interaktion verhindern können. In dieser Arbeit sollten D-enantiomere Peptide, die in vorangegangenen Arbeiten mittels Spiegelbild-Phagendisplay selektiert wurden, A β -Oligomere binden und bereits intensiv in transgenen Mäusen untersucht wurden, analysiert werden, ob diese mit der A β -PrP-Interaktion kompetitiv interferieren können.

2 Material und Methoden

Inhaltsangabe

2.1	Material	26
2.2	Methoden	42

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acetonitril, AppliChem, VWR
Acrylamid 4x (40 % w/v), Serva
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5 : 1), Roth
Acrylamid/Bisacrylamid (19 : 1), Serva
Agar, Becton, Dickinson and Company (BD)
Ammoniumchlorid (^{14}N), VWR
Ammoniumchlorid (^{15}N), Cambridge Isotope Laboratories
Ammonium-Eisen-III-Citrat, Fluka, Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS), Roth
Ampicillin, Sigma-Aldrich
 β -Mercaptoethanol, Bio-Rad, Roth
Bicin, Sigma
Biotin, Sigma-Aldrich
Bis-Tris, AppliChem
Bis-Tris Propan, Calbiochem
Borsäure, AppliChem
Calciumchlorid, Acros Organics
Chicago Sky Blue 6B (CSB), Sigma
Chloramphenicol, Sigma
Cobaltchlorid, Sigma, Roth
Coomassie Brilliant Blue R-250 Färbelösung, Bio-Rad
Deuteriumoxid (D_2O), Deutero
Dikaliumhydrogenphosphat, Merck
Dinatriumhydrogenphosphat, Roth
Dithiothreitol (DTT), Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA), AppliChem
Essigsäure, VWR
Ethanol, Sigma, VWR
Formaldehyd, AppliChem
Glucose (^{12}C), Sigma-Aldrich
Glucose (^{13}C), Cambridge Isotope Laboratories
Glycerin, VWR

Glycin, VWR
Glycylglycin, AppliChem
Guanidinhydrochlorid, Roth
Hefeextrakt, BD
HEPES, AppliChem
Hexafluoroisopropanol (HFIP), Aldrich
Imidazol, Sigma
Iodixanol (OptiPrep), Axis-Shield
Isopropanol, VWR
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), AppliChem, Thermo Scientific
Kaliumchlorid, Roth
Kaliumdihydrogenphosphat, AppliChem
Kupferchlorid
Laemmler Auftragspuffer (4 x), Bio-Rad
Magnesiumchlorid, VWR
Magnesiumsulfat, Merck
Manganchlorid, Fluka
Methanol, Sigma
Natriumacetat, Merck
Natriumazid, Sigma
Natriumcarbonat, AppliChem
Natriumchlorid, Fisher Chemical
Natriumdihydrogenphosphat, AppliChem
Natriumdodecylsulfat (SDS), AppliChem
Natriummolybdat, Ferak Berlin
Natriumthiosulfat, AppliChem
Natronlauge, Chemsolute
Nickelchlorid, Grüssing
Nickelsulfat, Acros Organics
Proteaseinhibitortabletten, Roche
Saccharose, Roth
Salzsäure, Sigma
Silbernitrat, VWR
Tetramethylethyldiamin (TEMED), Roth
Thiamin, Sigma-Aldrich
Trichloressigsäure (TCA), Merck
Tricin, AppliChem

Trifluoressigsäure (TFA), Roth
 Tris, VWR
 Tris-Glycin-SDS (TGS, 10 x), Bio-Rad
 Trypton, BD
 Zinksulfat, Acros Organics
 Zitronensäure, AppliChem

2.1.2 *E. coli* Stämme

E. coli BL21(DE3)

$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3)

E. coli BL21(DE3) Rosetta 2

$F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm$ (DE3) pRARE2 (Cam^R)

2.1.3 Plasmide

pET302/NT-His-huPrP(23-144)

pET-11a-huPrP(23-230)

pET-11a-huPrP(90-230)

2.1.4 Peptide und Proteine

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete synthetische Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz	Größe (kDa)	Firma
A β (1-42)	DAEFRHDSGYEVH HQKLVFFAEDVGSN KGAIIGLMVGGVVIA	4,511	Bachem AG
PrP(23-111 Δ 41-94)	KKRPPKPGGWNTG GSRYPGTHSQWN KPSKPKTNMKH	3,975	peptides and elephants GmbH
RD2-FITC	ptlhthnrrrrr- Lys-(FITC)-NH ₂ , all-D	2,085	peptides and elephants GmbH
D3D3-FITC	rprrlhthnrrrprtrlhthnrr- Lys-(FITC)-NH ₂ , all-D	3,664	JPT Peptide Technologies GmbH
RD2D3-FITC	ptlhthnrrrrrprtrlhthnrr- Lys-(FITC)-NH ₂ , all-D	3,667	peptides and elephants GmbH

Die in dieser Arbeit verwendeten Prion-Proteine (mit Ausnahme des Konstruktes PrP(23-111Δ41-94)) wurden rekombinant in *E. coli* hergestellt und besitzen somit keine posttranslationalen Modifikationen wie Glycosylierungen oder einen GPI-Anker. Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Konstrukte sind nachfolgend aufgelistet und beziehen sich auf die Sequenz des humanen Prion-Proteins mit dem natürlichen Polymorphismus M129. Alle Konstrukte waren bereits vorhanden (beschrieben in [122] und [123]), sodass die Klonierung der Konstrukte nicht Bestandteil dieser Arbeit ist. Die verwendeten Peptide wurden synthetisch hergestellt und sind der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

PrP(23-230)

```

PrP(23-230)  MKKRPKPG30GWNTGGSRYPG40QGSPGGNRYPP50QGGGGWGQPH60
PrP(23-230)  GGGWGQPH70GGWGQPHGG80GGWGQPHGG90GGGTHSQWNK100
PrP(23-230)  PSKPKTNM110K120HMAGAAAAGAVVGGGLGGYML130GSAMSRPIIH140F
PrP(23-230)  GSDYEDRY150YREN160MHRYPNQ170VYYRPMDEYS180NQNNFVHDCVN
PrP(23-230)  ITIKQHTV190TTTTKGENFT200ETDVKMMERV210VEQMCITQYERE220
PrP(23-230)  SQAYYQRGS230

```

Abbildung 2.1: Aminosäuresequenz von humanem PrP(23-230). Die eigentliche PrP-Sequenz beginnt mit dem Lysin (AS 23). Das Methionin zu Beginn der Sequenz wird für die Translation benötigt. Größe: 22,878 kDa.

PrP(23-144)

Hexahistidintag und TEV-Schnittstelle: MHHHHHVNS LENLYFQ

PrP(23-144) GKKRPKPG³⁰WNTGGSRYPG⁴⁰QGSPGGNRYPP⁵⁰QGGGGWGQP⁶⁰H

PrP(23-144) GGGWGQP⁷⁰HGGWGQPHGG⁸⁰WGQPHGG⁹⁰WGQGGGTHSQW¹⁰⁰NK

PrP(23-144) PSKP¹¹⁰KTNM¹²⁰KHMAGAAAAG¹³⁰AVVGG¹⁴⁰LGGYMLGSAMSRPIIH¹⁴⁰F

PrP(23-144) GSD

Abbildung 2.2: Aminosäuresequenz von humanem PrP(23-144). Das Glycin zu Beginn verbleibt nach dem TEV-Schnitt vor der PrP-Sequenz. Größe: 14,387 kDa mit Tag; 12,224 kDa ohne Tag.

PrP(90-230)

PrP(90-230) M⁹⁰GQGGGTHSQW¹⁰⁰NKPSKP¹¹⁰KTNM¹²⁰KHMAGAAAAG¹²⁰AVVGG¹²⁰LG¹²⁰GY

PrP(90-230) M¹³⁰LG¹³⁰SAMSRPIIH¹⁴⁰FGSDYEDRY¹⁵⁰YRENM¹⁶⁰HRYPNQ¹⁶⁰VYYRPMDE

PrP(90-230) Y¹⁷⁰SNQNNFVHDC¹⁸⁰VNITIK¹⁹⁰QHTV¹⁹⁰T¹⁹⁰TTTKGENFT²⁰⁰ETDVKMMER

PrP(90-230) V²¹⁰VEQMCITQYER²²⁰ESQAYY²³⁰QRGS

Abbildung 2.3: Aminosäuresequenz von humanem PrP(90-230). Die eigentliche PrP-Sequenz beginnt mit dem Glycin (AS 90). Das Methionin zu Beginn der Sequenz wird für die Translation benötigt. Größe: 16,192 kDa.

TEV-Protease

Die TEV-Protease wurde rekombinant in *E. coli* hergestellt und von Reinhild Wurm zur Verfügung gestellt.

DNase I, Boehringer Ingelheim

Gel Filtration HMW Calibration Kit, GE Healthcare Life Sciences

2.1.5 Nährmedien

Lysogeny Broth (LB-Medium)

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

5 g/l NaCl

(Für Platten: + 15 g/l Agar)

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C

Terrific Broth (TB-Medium)

60 g Trypton

120 g Hefeextrakt

50 ml von 50 % Glycerin

ad 4,5 l ddH₂O

Nach dem Autoklavieren für 20 min bei 121 °C werden 500 ml steriler

10 x Phosphatpuffer (s.u.) hinzugefügt.

10 x Phosphatpuffer (0,89 M) für TB-Medium

0,17 M KH₂PO₄ (46,27 g)

0,72 M K₂HPO₄ (250,8 g)

ad 2 l ddH₂O

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C

2.1.5.1 Lösungen für M9-Minimalmedium

100 x Spurenelemente-Lösung (1 l)

ZnSO₄ · 7 H₂O: 0,10 g

MnCl₂ · 4 H₂O: 0,03 g

H₃BO₃: 0,30 g

CoCl₂ · 6 H₂O: 0,20 g

CuCl₂ · 2 H₂O: 0,01 g

NiCl₂ · 6 H₂O: 0,02 g

Na₂MoO₄ · 2 H₂O: 0,03 g

ad 1 l ddH₂O und mit einem 0,2 µm Filter steril filtrieren.

Glucose

20 % Glucose

Mit einem 0,2 µm Filter steril filtrieren.

10 x M9-Medium (1 l)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: 75 g

KH_2PO_4 : 30 g

NaCl : 5 g

NH_4Cl : 10 g, ^{14}N ; bzw. $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ wurde nach Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben.

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C

1 M CaCl_2 (50 ml)

$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$: 7,35 g

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C

1 M MgSO_4 (50 ml)

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$: 12,32 g

Autoklavieren für 20 min bei 121 °C

Ammonium-Eisen-III-Citrat

$\text{NH}_4\text{FeIII-Citrat}$: 20 mg/ml in ddH₂O

Immer frisch ansetzen und mit einem 0,2 µm Filter steril filtrieren.

Thiamin

Thiamin: 1 mg/ml in ddH₂O

Mit einem 0,2 µm Filter steril filtrieren, in 2 ml Aliquots aufteilen und bei -20 °C lagern.

Biotin

Biotin: 0,5 mg/ml in ddH₂O

Zum Lösen das Biotin leicht erwärmen. Mit einem 0,2 µm Filter steril filtrieren, in 2 ml Aliquots aufteilen und bei -20 °C lagern.

M9-Medium mit allen Komponenten (1 l)

M9-Medium: 100 ml aus 10 x Stock

Spurenelemente-Lösung: 10 ml aus 100 x Stock

Glucose: 20 ml aus 20 % (= 4 g; gilt auch für ^{13}C labelling)

1 mM MgSO_4 : 1 ml aus 1 M Stock

0,3 mM CaCl_2 : 0,3 ml aus 1 M Stock

1 mg Biotin: 2 ml aus 0,5 mg/ml Stock

1 mg Thiamin: 1 ml aus 1 mg/ml Stock

20 mg $\text{NH}_4\text{FeIII-Citrat}$: 1 ml aus 20 mg/ml Stock

Antibiotika (abhängig vom Konstrukt)

ad 1 l steriles ddH₂O (Wasser vorlegen, damit die Salze nicht ausfallen)

2.1.6 Lösungen und Puffer

Ampicillin (Amp)

Stammlösung: 50 mg/ml in ddH₂O

Mit einem 0,2 µm Filter steril filtrieren, in 1 ml Aliquots aufteilen und bei -20 °C lagern.

Chloramphenicol (Cam)

Stammlösung: 25 mg/ml in Ethanol

Mit einem 0,2 µm Filter steril filtrieren und bei 4 °C im Kühlschrank lagern.

IPTG

Stammlösung: 1 M in ddH₂O

Mit einem 0,2 µm Filter steril filtrieren, in 1 ml Aliquots aufteilen und bei -20 °C lagern.

Phosphate-Buffered Saline (PBS)

8 g/l NaCl

0,2 g/l KCl

1,42 g/l Na₂HPO₄

0,27 g/l KH₂PO₄

Aufschlusspuffer (100 ml)

20 mM MgCl₂

Spatelspitze DNase I

1 Tablette Proteaseinhibitor

in PBS-Puffer

2.1.6.1 Puffer für die Immobilisierte

Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)

Denaturierungspuffer

6 M Guanidinhydrochlorid

100 mM NaCl

30 mM Tris

pH 7,4 (Mit HCl einstellen)

Laufpuffer

30 mM Tris

pH 7,4 (Mit HCl einstellen)

Elutionspuffer

500 mM Imidazol

30 mM Tris

pH 7,4 (Mit HCl einstellen)

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

50 mM EDTA

pH 8,0

Nickelsulfat100 mM NiSO₄**2.1.6.2 Puffer für die Größenausschluss-Chromatographie (SEC)****Laufpuffer**

6 M Guanidinhydrochlorid

12,5 mM Tris

5 mM DTT

pH 8,0 (Mit HCl einstellen)

**2.1.6.3 Lösungen für die Dichtegradientenzentrifugation (DGZ)
mit Saccharose****Tabelle 2.2:** Saccharoselösungen für die DGZ

Saccharosekonzentration	Menge
5 % (w/w)	2,55 g
10 % (w/w)	5,19 g
15 % (w/w)	7,95 g
20 % (w/w)	10,81 g
25 % (w/w)	13,80 g
50 % (w/w)	30,74 g
60 % (w/w)	38,60 g

Die abgewogene Saccharose (siehe Tabelle 2.2, hergeleitet aus [124]) wird in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Jede Lösung wird mit 5 ml 300 mM Tris-HCl, pH 7,4 versetzt und mit ddH₂O auf 50 ml aufgefüllt. Die Endkonzentration des Tris-Puffers in den Saccharoselösungen beträgt somit 30 mM.

2.1.6.4 Puffer für die Tris-Glycin-SDS-PAGE

Trenngelpuffer

1,5 M Tris

pH 8,8 (Mit HCl einstellen)

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris

pH 6,8 (Mit HCl einstellen)

Acrylamidlösung (fertig, Roth)

37,5 % Acrylamid

1 % Bisacrylamid

Laufpuffer: 10 x TGS (fertig, Bio-Rad)

250 mM Tris

1,92 M Glycin

1 % (w/v) SDS

pH 8,3

4 x Laemmli Auftragspuffer (fertig, Bio-Rad)

277,8 mM Tris-HCl, pH 6,8

44,4 % (v/v) Glycerin

4,4 % LDS (Lithiumdodecylsulfat)

0,02 % Bromphenolblau

Coomassie Brilliant Blue R-250 Färbelösung (fertig, Bio-Rad)

Entfärbelösung

40 % Methanol

10 % Essigsäure

2.1.6.5 Puffer für die Tris-Tricin-SDS-PAGE

Gelpuffer

3 M Tris

0,3 % SDS

pH 8,45 (Vor SDS-Zugabe mit HCl einstellen)

Acrylamidlösung (1 l)

34,3 % Acrylamid: 335 ml aus einer 4 x Lösung (40 % w/v)

1,1 % Bisacrylamid: 550 ml aus einer 19:1 (Acrylamid- : Bisacrylamidlösung)

ad 1 l ddH₂O

10 x Anodenpuffer

2 M Tris

pH 8,9 (Mit HCl einstellen)

10 x Kathodenpuffer

1 M Tris

1 M Tricin

1 % SDS

pH 8,25 (Vor SDS-Zugabe mit HCl einstellen)

2 x Auftragspuffer

4 % SDS

12 % Glycerin

50 mM Tris-HCl, pH 7,4

2 % β-Mercaptoethanol

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

10 % APS in ddH₂O

In 200 µl Aliquots aufteilen und bei -20 °C lagern.

2.1.6.6 Lösungen für die Silberfärbung

Fixierer

30 % Ethanol

10 % Essigsäure

Inkubator

30 % Ethanol

0,2 % Natriumthiosulfat

0,5 % Natriumacetat

10 x Silbernitratlösung

1 % Silbernitrat

Entwickler

2,5 % Natriumcarbonat

Stop-Lösung

2,3 M Zitronensäure

2.1.6.7 Lösungen für die RP-HPLC*Lösungen für die semi-präparative Reinigung*

20 % ACN

20 % Acetonitril

0,1 % TFA in ddH₂O

30 % ACN

30 % Acetonitril

0,1 % TFA in ddH₂O

*Lösungen zur Analyse***Wasser**

0,1 % TFA in ddH₂O

80 % ACN

80 % Acetonitril

0,1 % TFA in ddH₂O

2.1.6.8 Pufferlösungen und Probenzusammensetzung für die Flüssig-NMR-Spektroskopie

Für die Flüssig-NMR-Spektroskopie wurden entweder 300 mM, 500 mM oder 1 M Pufferstammlösungen hergestellt.

Tris-HCl

300 mM, 500 mM oder 1 M Tris
pH 7,4 (Mit HCl einstellen)

Lag der pH-Wert innerhalb der Probe unterhalb von 7,4, so reichte die eingesetzte Pufferkonzentration nicht aus. Der pH-Wert der Probe kann den Abbildungsunterschriften im Ergebnisteil entnommen werden.

HEPES

500 mM oder 1 M HEPES
pH 6,5 oder pH 7,0

Natriumacetat-Puffer

500 mM oder 1 M Natriumacetat
500 mM oder 1 M Essigsäure
pH 4,5 oder pH 5,5

Die äquimolaren Stammlösungen von Natriumacetat und Essigsäure wurden so lange gegeneinander titriert, bis der gewünschte pH-Wert erhalten wurde.

Probenzusammensetzung

Zur Herstellung der jeweiligen NMR-Proben wurde entweder ^{15}N oder ^{13}C - ^{15}N markiertes PrP(23-230) oder PrP(23-144) bei Konzentrationen zwischen final 85 - 360 μM sowie Pufferkonzentrationen zwischen 10 - 50 mM verwendet. Zu jeder Probe wurden final 10 % D_2O hinzugegeben. Das Volumen der NMR-Proben betrug 280 - 352 μl . Gemessen wurde in 5 mm (äußerer Durchmesser) D_2O -matched BMS-005B Shigemi-Röhrchen.

Beispiel:

300 μl von 104 μM ^{13}C - ^{15}N PrP(23-144) (final ca. 88 μM)
17 μl einer 1 M Pufferlösung (final 50 mM)
35 μl D_2O (final 10 %)

2.1.7 Größenstandards

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific
Spectra Multicolor Low Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific

2.1.8 Säulen

Protino Ni-NTA 5 ml, Macherey-Nagel (für IMAC)

HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade, Amersham (für SEC)

Zorbax 300 SB-C8 Stable Bond Analytical, 4,6 x 250 mm, Agilent Technologies (für HPLC)

Zorbax 300 SB-C8 Semi-Preparative, 9,4 x 250 mm, Agilent Technologies (für HPLC)

2.1.9 Laborgeräte

ÄKTAprime plus, GE Healthcare Life Sciences

ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad

PowerPac Basic, Bio-Rad

Mini PROTEAN Tetra Cell, Bio-Rad

Thermomixer compact, Eppendorf

Thermomixer comfort, Eppendorf

Dri-Block DB-3, Techne

Agilent HPLC 1260 Infinity bestehend aus:

G1311B 1260 Quat Pump, G1329B 1260 ALS, G1316A 1260 TCC, G1365C 1260 MWD, G1328C 1260 Man. Inj., Agilent Technologies

Agilent HPLC 1260 Infinity bestehend aus:

G1311C 1260 Quat Pump VL, G1329B 1260 ALS, G1316A 1260 TCC, G1365C 1260 MWD, G1328C 1260 Man. Inj., Agilent Technologies

Sicherheitswerkbank Herasafe, Thermo Fisher Scientific

NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific

Eppendorf Research Pipetten, Eppendorf

Hamilton Spritzen (verschiedene Volumina), Hamilton

Cell Disruptor One Shot Model, Constant Systems

NanoWizard 3 (AFM), JPK AG

Sartorius Basic Meter PB-11, Sartorius

Waage Extend, Sartorius

Waage BP 4100 S, Sartorius

Spectropolarimeter J-815, Jasco

Spectrophotometer V-650, Jasco

SpeedVac (RVC 2-18) mit Kühlfalle LT-105, Christ

OD600 DiluPhotometer, Implen
Milli-Q Advantage mit Automatic Sanitization Module, Millipore
Autoklav VX-150, Systemec
Autoklav 3870 EL, Tuttnauer
Inkubationsschüttler Multitron Standard, Infors HT
Inkubationsschüttler Innova 40, New Brunswick Scientific
Inkubationsschüttler Innova 4330, New Brunswick Scientific
Magnetrührer IKAMAG RET-GS, IKA
Magnetrührer heat-stir CB162, Stuart
Magnetrührer stir CB161, Stuart
Überkopfmischer, VWR
Zentrifuge 5415 R, Eppendorf
Zentrifuge 5702 R, Eppendorf
Zentrifuge 5804 R, Eppendorf
Zentrifuge Avanti J-20, Beckman
Zentrifuge J2-21, Beckman
Hettich Mikro 22, Hettich Zentrifugen
Heraeus Megafuge 8R, Thermo Fisher Scientific
Ultrazentrifuge Optima L-80 XP, Beckman Coulter
Ultrazentrifuge TL-100, Beckman
Rotoren: TLA-55, TLS-55, 55.2 Ti, JA-10, alle Beckman
Festkörper-NMR-Spektrometer 14,1 Tesla (Protonenresonanzfrequenz: 600 MHz),
Varian
Festkörper-NMR-Spektrometer 14,1 Tesla (600 MHz), Oxford
Festkörper-NMR-Spektrometer AEON 18,8 Tesla (800 MHz), Bruker
3,2 mm Standard-Bore Triple-Resonanz-MAS-Probenkopf, Varian
3,2 mm Wide-Bore Triple-Resonanz-MAS-Probenkopf, Bruker
Festkörper-NMR-Rotoren: 3,2 mm dickwandig und dünnwandig, Varian (Agilent)
Festkörper-NMR-Rotor: 3,2 mm dickwandig, Bruker
NMR-Spektrometer 14,1 Tesla (Protonenresonanzfrequenz: 600 MHz), Bruker
NMR-Spektrometer 16,4 Tesla (700 MHz), Bruker
NMR-Spektrometer 18,8 Tesla (800 MHz), Varian
NMR-Spektrometer 21,1 Tesla (900 MHz), Varian

2.1.10 Software

OriginPro 9.0G, OriginLab

PyMOL, DeLano Scientific

Image Lab 5.0, Bio-Rad

JPKSPM Data Processing, JPK Instruments AG

SnapGene, GSL Biotech LLC

ChemSketch, ACD Labs

Agilent ChemStation Method and Run Control, Agilent Technologies

Agilent ChemStation Data Analysis, Agilent Technologies

Adobe Illustrator CS5, Adobe Systems

Microsoft Office 2013, Microsoft

Gwyddion 2.44 Grain Analyse, <http://gwyddion.net/>

PrimeView, GE Healthcare Life Sciences

PrimeView Evaluation, GE Healthcare Life Sciences

2.1.11 Spezielle Verbrauchsmaterialien

Protein LoBind Tubes: 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, Eppendorf

Zentrifugenröhrchen: 11 x 34 mm Polyallomer oder Polyclear, Seton

Zentrifugalkonzentrator (Centricon): 3 kDa Ausschlussgrenze Vivaspin 2, Sartorius

HPLC-Gefäße, Agilent Technologies, Zinsser Analytic

Glimmer-Scheiben „V1“, 10 mm, Plano

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von *E. coli* Glycerolstocks

Je 4 ml steriles LB-Medium mit 50 µg/ml Amp, 34 µg/ml Cam im Falle von *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2 mit pET-11a-PrP(23-230) bzw. 100 µg/ml Amp im Falle von *E. coli* BL21 (DE3) mit pET302/NT-His-huPrP(23-144) wurden inokuliert und über Nacht bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. Insgesamt 4 ml frisches LB-Medium mit den jeweiligen Antibiotika wurde mit 100 µl der Übernachtskultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,0 bei 180 rpm und 37 °C inkubiert. 500 µl der Kultur wurden mit 500 µl sterilem 70 %igem Glycerol in 1,5 ml Schraubgefäße überführt und konnten so bei -80 °C gelagert werden.

2.2.2 Expression von PrP(23-230) in *E. coli*

Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 100 ml steriles LB-Amp(50 µg/ml)-Cam(34 µg/ml)-Medium mit *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta 2 pET-11a-huPrP(23-230) inokuliert. Hierbei wurde entweder eine Einzelkolonie von einer Platte gepickt oder die Zellen direkt aus einem Glycerolstock entnommen. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert.

Für die Hauptkultur wurden 2 l steriles TB-Amp(50 µg/ml)-Cam(34 µg/ml)-Medium 1:100 mit der Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 160 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,7 - 0,8 inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 0,5 mM IPTG induziert, für weitere 3 h unter den oben angegebenen Bedingungen inkubiert und die Temperatur über Nacht auf 25 °C reduziert und die Zellen weiter wachsen gelassen. Für die Herstellung von isotopenmarkiertem PrP(23-230) wurde anstelle des TB-Mediums M9-Minimalmedium mit den gewünschten Isotopen (¹⁵N bzw. ¹⁵N und ¹³C) verwendet. Die Induktion erfolgte hier bei einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,5. Die *E. coli*-Zellen wurden bei 5000 x g für 15 min bei 4 °C geerntet, mit PBS-Puffer (ca. 125 ml für 30 g Zellen) für 30 min gewaschen und erneut zentrifugiert (s.o.). Im Anschluss wurden die Zellen in 3 ml Aufschlusspuffer pro Gramm Zellen aufgenommen und konnten so bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

2.2.3 Expression von PrP(23-144) in *E. coli*

50 ml steriles LB-Amp(100 µg/ml)-Medium wurden für eine Vorkultur mit *E. coli* BL21 (DE3) pET302/NT-His-huPrP(23-144) aus einem Glycerolstock inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 160 rpm inkubiert.

Für die Hauptkultur wurden 2 l steriles LB-Amp(100 µg/ml)-Medium 1:100 oder 1:50 mit der Vorkultur inokuliert. Die Kultur wurde bei 37 °C und 160 rpm inkubiert und bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 - 0,7 mit 1 mM IPTG induziert und über Nacht weiter inkubiert. Für die Herstellung von isopenmarkiertem PrP(23-144) wurde für die Hauptkultur M9-Minimalmedium mit entweder ¹⁵N oder ¹⁵N und ¹³C verwendet. Die Kultur wurde hierzu bevorzugt 1:50 inokuliert, um die Latenzphase der *E. coli*-Zellen zu verkürzen.

Die Zellernte erfolgte bei 5000 x g für 15 min und 4 °C. Die Zellen wurden in 3 ml Aufschlusspuffer pro Gramm Zellen aufgenommen und konnten so bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

2.2.4 Zellaufschluss von *E. coli* und Reinigung von *inclusion bodies*

Die *E. coli*-Zellsuspension wurde auf Eis aufgetaut und zweimal in den *Cell Disruptor* gegeben, um die Zellen bei 1,2 kbar aufzuschließen. Das Lysat wurde für 1 h bei 28.700 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Auf das Sediment wurden ca. 10 ml SEC-Laufpuffer (für PrP(23-230)) bzw. 10 ml IMAC-Denaturierungspuffer (für PrP(23-144)) gegeben, um das PrP aus den *inclusion bodies* zu lösen. Hierfür wurde das Sediment etwas gelöst und über Nacht bei 4 °C auf einem Überkopfmischer gedreht bevor es erneut bei 28.700 x g und 4 °C für 1 h zentrifugiert wurde. Mit dem Überstand wurden entweder eine IMAC (siehe 2.2.5) oder eine SEC (siehe 2.2.7) durchgeführt.

2.2.5 Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)

Die Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) wird dazu genutzt ein bestimmtes Protein spezifisch aus einer Lösung bestehend aus vielen verschiedenen Proteinen zu selektieren. Hierzu wird das Zielprotein mit einem

Polyhistidin-Tag (meist Hexa- oder Decahistidin) fusioniert. Dieser wird für die Bindung an die Chromatographiesäule benötigt. An die Matrix der Säule ist der Komplexbildner Nitrilotriessigsäure (NTA) kovalent gebunden. Nach Bindung eines zweiwertigen Metallions, z.B. Ni^{2+} oder Co^{2+} , an NTA können Proteine über ihren Polyhistidin-Tag an die Metallionen koordiniert werden, während nicht-getaggte Proteine die Säule direkt wieder verlassen. Das Zielprotein kann durch Zusatz von Imidazol in den Laufpuffer wieder von der Säule entfernt werden, da das Imidazol ebenfalls eine hohe Affinität zu der Säule aufweist und die Histidine wieder verdrängt.

In dieser Arbeit wurden für die Reinigung von PrP(23-144) zwei 5 ml Ni-NTA-Säulen hintereinander geschraubt und zunächst mit Denaturierungspuffer, in dem sich auch die Probe (siehe 2.2.4) befand, äquilibriert. Zu der Probe wurden 5 - 10 mM Imidazol hinzugefügt, um schwache, unspezifische Bindungen an die Säule zu minimieren bevor die Probe mit einer Flussrate von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen wurde. Es wurde so lange mit Denaturierungspuffer gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm wieder die Grundlinie erreichte. Danach wurde so lange mit Laufpuffer gewaschen, bis die Leitfähigkeit wieder die Grundlinie erreichte. Dieser Schritt wurde durchgeführt, um das Guanidinhydrochlorid zu entfernen, da dieses bei der Entfernung des Histidin-Tags durch die TEV-Protease (siehe 2.2.6) stören würde. Mit einem Gradienten von 0 % auf 100 % Elutionspuffer innerhalb von 150 ml bei einer Flussrate von 2 ml/min wurde das PrP(23-144) wieder von der Ni-NTA-Säule gewaschen. Es wurden Fraktionen mit 6 ml Volumen aufgefangen.

Zur Reinigung und Regenerierung der Ni-NTA-Säule wurden jeweils fünf Säulenvolumina der folgenden Lösungen nacheinander über die Säule gepumpt:

- a) 6 M Guanidinhydrochlorid mit 30 mM Tris-HCl, pH 7,4
- b) ddH₂O
- c) 50 mM EDTA
- d) ddH₂O
- e) 100 mM Nickelsulfat
- f) ddH₂O

2.2.6 TEV-Protease-Verdau

Zur Entfernung des Hexahistidin-Tags wurde das PrP(23-144) mittels *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease verdaut. Hierfür wurden alle PrP(23-144) enthaltenden IMAC-Fraktionen vereinigt, mit TEV-Protease versetzt und über Nacht bei 4 °C auf einem

Taumelrollenmischer gedreht. In dieser Arbeit erwiesen sich ca. 23 µg TEV-Protease pro Milliliter Eluat als effizient. Dies wurde vorher in kleinem Maßstab getestet und mit Hilfe einer SDS-PAGE verifiziert. Anschließend wurde das PrP(23-144) mittels RP-HPLC wieder von der TEV-Protease getrennt (siehe 2.2.9).

2.2.7 Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Die Größenausschluss-Chromatographie (SEC) ist ein Verfahren, um Proteine nach ihrem hydrodynamischen Volumen zu trennen. Je kleiner ein Protein ist, umso mehr interagiert es mit der stationären Phase der Säule, wodurch die Retentionszeit verlängert wird. Im Gegensatz dazu können größere Proteine kaum in das poröse Säulenmaterial eindringen, weshalb sie schneller von der Säule eluieren.

In dieser Arbeit wurde eine HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade Säule zur Reinigung von PrP(23-230) verwendet. Vor Verwendung der Säule wurde diese mit einem Säulenvolumen (ca. 340 ml) des Laufpuffers äquilibriert bevor 5,5 - 6 ml der Probe (siehe 2.2.4) auf die Säule aufgetragen wurden. Die Chromatographie erfolgte bei einer Flussrate von 2,4 ml/min oder 2,5 ml/min und einer Temperatur von 12 °C. Die Absorption bei 280 nm wurde verfolgt und das Eluat in 5 ml Fraktionen aufgefangen. Nach ca. 2,5 h, spätestens jedoch nach 400 ml Volumen wurde die Chromatographie gestoppt.

Zur Überprüfung des Proteingehalts in den einzelnen Fraktionen wurden diese mittels SDS-PAGE analysiert (siehe 2.2.13). Hierzu mussten die Proteine zunächst mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt werden (siehe 2.2.8), da das Guanidinhydrochlorid des Laufpuffers bei der SDS-PAGE stört.

2.2.8 Proteinfällung mit Trichloressigsäure (TCA)

Zur Fällung von Proteinen aus einer Lösung wurde Trichloressigsäure (TCA) verwendet. Dies war nötig, um Proben aus SEC-Läufen (siehe 2.2.7) mittels SDS-PAGE (siehe 2.2.13) untersuchen zu können. Hierzu wurden 100 µl der zu untersuchenden SEC-Fractionen mit 400 µl ddH₂O verdünnt. Nach Hinzufügen von 500 µl kalter, 20 %iger TCA wurde die Lösung für 20 min auf Eis inkubiert bevor sie für 15 min bei 4 °C und 13.200 rpm zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abgenommen, verworfen und das Pellet getrocknet. Um das Guanidinhydrochlorid vollständig zu entfernen, wurde das Sediment insgesamt zweimal mit je 500 µl kaltem Ethanol

gewaschen und wie oben beschrieben zentrifugiert. Das Sediment wurde getrocknet, bevor es in 70 μ l 50 mM Tris-HCl, pH 7,4 aufgenommen wurde und mittels SDS-PAGE analysiert werden konnte.

2.2.9 Semi-präparative *reversed-phase high-performance liquid chromatography* (RP-HPLC)

Nach IMAC- bzw. SEC-Reinigung wurden PrP(23-144) bzw. PrP(23-230) enthaltende Proben mittels RP-HPLC von noch vorhandenen Verunreinigungen getrennt. Hierfür wurden maximal 2,5 ml der zu reinigenden Probe auf einen 5 ml Loop aufgetragen. Chromatographiert wurde mit einem 1260 infinity System und einer semi-präparativen C8-Säule (beides Agilent) bei 80 °C und einer Flussrate von 4 ml/min. Der dafür verwendete Gradient ist Tabelle 2.3 zu entnehmen. Die Detektion erfolgte durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 214 nm. PrP enthaltendes Eluat wurde pro Lauf manuell aufgefangen und nach allen Läufen vereinigt.

Tabelle 2.3: Acetonitrilgradient zur Reinigung von PrP(23-144) und PrP(23-230) mittels RP-HPLC

Zeit [min]	80 % ACN [%]	20 % ACN [%]	30 % ACN [%]
0	0	100	0
15	0	0	100
25	0	0	100
25,1	100	0	0
30	100	0	0
30,1	0	100	0
35	0	100	0

2.2.10 Lyophilisierung von gereinigtem PrP

PrP enthaltendes HPLC-Eluat wurde in einen Rundkolben überführt, 2 - 3 ml für analytische Zwecke entnommen, der Rest mit flüssigem Stickstoff eingefroren und der Kolben an einer Gefriertrocknungsanlage befestigt. Der Trocknungsprozess ist abhängig von dem Volumen in dem Kolben und konnte bis zu zwei Tage dauern. Das Lyophilisat wurde entweder trocken bei Raumtemperatur gelagert oder in Reinstwasser gelöst, die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.2.11), in LoBind-Eppis aliquotiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.11 Bestimmung von Proteinkonzentrationen mittels Photometer

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einer Probe wurde diese in einer Quarzküvette (QS High Precision Cell, SUPRASIL, 10 mm, Centre 15, Hellma Analytics) photometrisch untersucht. Hierbei wurde die Lichtabsorption durch die aromatischen Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Hierzu wurde ein Spektrum von 190 nm bis 340 nm aufgenommen. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnte die Proteinkonzentration aus der Absorbanz berechnet werden (siehe 2.1).

$$A = \epsilon * c * d \quad (2.1)$$

Hierbei steht A für die Absorbanz, ϵ für den molaren Extinktionskoeffizienten (in $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), c für die molare Konzentration und d für die Weglänge des Lichtstrahls (in cm) durch die Probe (dies entspricht der Schichtdicke der verwendeten Küvette). Für die in dieser Arbeit verwendeten PrP-Konstrukte wurden die folgenden Extinktionskoeffizienten angewandt:

PrP(23-230): $\epsilon = 57995 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

PrP(90-230): $\epsilon = 22015 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

PrP(23-111 Δ 41-94): $\epsilon = 12490 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

PrP(23-144) vor TEV-Schnitt: $\epsilon = 44460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

PrP(23-144) nach TEV-Schnitt: $\epsilon = 42970 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Diese wurden zuvor online mit Hilfe des Dienstes ProtParam berechnet (<http://web.expasy.org/protparam/>).

2.2.12 Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie von Proteinen

Mit Hilfe der CD-Spektroskopie kann der Anteil und die Art der Sekundärstrukturelemente in Proteinen gemessen werden. Es wurden je 6 μM PrP(23-230), PrP(90-230) oder PrP(23-144) in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 untersucht, sowie eine Probe des 10 mM Tris-HCl-Puffers als Referenz. Es ist besonders wichtig, dass die zu untersuchende Probe luftblasenfrei in die Küvette (110-QS, 1 mm, Hellma Analytics) überführt wird. Die Spektren wurden in einem Wellenlängenbereich von 180 nm bis 280 nm

bei einer Scangeschwindigkeit von 50 nm/min aufgenommen. Von jeder Probe wurden 10 Spektren aufgenommen und diese akkumuliert. Zur Darstellung der y-Achse in molarer Elliptizität wurde die folgende Formel (2.2) angewandt.

$$\Theta = \frac{\text{Wert (Probe)} - \text{Wert (Referenz)}}{(\text{AS} - 1) * 10 * c * d} \quad (2.2)$$

Θ beschreibt die molare Elliptizität (*mean residual ellipticity* (MRE)) in $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$, AS die Anzahl der Aminosäuren des gemessenen Proteins, c die molare Konzentration der Probe und d die Schichtdicke der Küvette, in unserem Fall 0,1 cm.

2.2.13 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Glycin

Die denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird dazu verwendet Peptide und Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes voneinander zu trennen. In dieser Arbeit wurden 15 %ige Trenn- sowie 7 %ige Sammelgele verwendet (siehe Tabelle 2.4). Diese wurden mit Hilfe einer Gießapparatur der Firma Bio-Rad selbst hergestellt. Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit etwas Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation (ca. 30 min) des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt, das Gel mehrfach mit ddH₂O gewaschen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Final wurde ein Kamm zur Ausformung von 10 oder 15 Geltaschen eingesteckt. Nach Polymerisation des Sammelgels konnte das Gel verwendet werden oder für einige Tage, jedoch nicht länger als eine Woche, bei 4 °C im Kühlschrank verwahrt werden.

Die zu untersuchenden Proben wurden mit 4 x Laemmli-Auftragspuffer (final 1 x in jeder Probe) versetzt und für 10 min bei 95 °C bis 98 °C inkubiert. Wurden Ganzzellysate analysiert, wurden zuvor 1 ml der *E. coli*-Zellen abzentrifugiert und mit 30 μl 30 mM Tris-HCl, pH 7,4 pro 0,5 OD₆₀₀ versetzt. Von dieser Probe wurden 16 μl entnommen, 4 μl Laemmli Auftragspuffer hinzugefügt und wie oben beschrieben aufgekocht. Die Proben (meist 15 oder 20 μl) wurden immer mit 4 μl eines Größenstandards auf das Gel aufgetragen, der zum Vergleich des Molekulargewichts mit bekannten Proteinen dient. Vor Verwendung wurde der 10 x TGS-Laufpuffer (Bio-Rad) mit ddH₂O 1 : 10 verdünnt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 120 - 140 V für ca. 60 min.

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Tris-Glycin-SDS-PAGE

Trenngel (15 %)		Sammelgel (7 %)	
ddH ₂ O	7,2 ml	ddH ₂ O	10 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	15 ml	Acrylamid/Bisacrylamid	4,6 ml
Trenngelpuffer	7,5 ml	Sammelgelpuffer	5 ml
TEMED	30 µl	TEMED	20 µl
10 % APS	100 µl	10 % APS	100 µl

2.2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit Tricin

Die SDS-PAGE mit Tricin im Laufpuffer eignet sich besonders für die Analyse von Peptiden und kleinen Proteinen, da mit dieser im Bereich unter 20 kDa eine höhere Auflösung erreicht wird als mit einer Tris-Glycin-SDS-PAGE [125]. Deshalb wurden A β oder D-Peptid enthaltende Proben sowie alle DGZ-Proben immer mit diesem System nach Schägger und von Jagow [125] untersucht.

In dieser Arbeit wurden 20 %ige Trenn- sowie 5,6 %ige Sammelgele verwendet (siehe Tabelle 2.5). Die Herstellung der Gele erfolgte analog der Beschreibung unter 2.2.13. Die Gele wurden vor Verwendung nicht länger als einen Tag bei 4 °C im Kühlschrank verwahrt, da sonst die Qualität der Gele nachlässt.

Die zu untersuchenden Proben wurden mit 2 x Auftragspuffer vermennt, für 10 min bei 95 °C bis 98 °C inkubiert und 15 µl sowie ein Größenstandard in die Geltaschen pipettiert. Vor Verwendung wurde der 10 x Anoden- bzw. Kathodenpuffer mit ddH₂O 1 : 10 verdünnt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 40 mA pro Gel für ca. 120 - 150 min.

Tabelle 2.5: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Tris-Tricin-SDS-PAGE

Trenngel (20 %)		Sammelgel (5,6 %)	
100 % Glycerin	3,2 ml	ddH ₂ O	6,2 ml
Acrylamid/Bisacrylamid	17 ml	Acrylamid/Bisacrylamid	2 ml
Gelpuffer	10 ml	Gelpuffer	4,17 ml
TEMED	50 µl	TEMED	30 µl
10 % APS	100 µl	10 % APS	100 µl

2.2.15 Nachweis von fluoreszenzmarkierten D-Peptiden in SDS-Gelen

Wurden Proben mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten D-Peptiden über SDS-PAGE aufgetrennt, so kann die Fluoreszenz vor Färbung des Gels detektiert werden. Hierbei erfolgte die Aufnahme in einer Geldokumentationsanlage der Firma Bio-Rad bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm (Filter: 470/30) und einer Emission von 530 nm (Filter: 530/28). Zur Aufnahme des Markers wurde das Gel unter Anwendung der Einstellung „*white epi illumination*“ aufgenommen. Alternativ wurden die Markerbanden bei verschiedenen Wellenlängen angeregt.

2.2.16 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Eine Methode zum Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen ist die Färbung mit Coomassie-Brilliant-Blau. In dieser Arbeit wurde eine Lösung mit Coomassie-Brilliant-Blau R-250 von der Firma Bio-Rad verwendet.

Nach Durchführung einer SDS-PAGE wurden die Gele zunächst für 5 min in ddH₂O gewaschen. Danach wurde das Wasser dekantiert, die Coomassie-Lösung auf die Gele gegeben und für 30 - 60 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Zum Entfärben der Gele wurde die Coomassie-Lösung zunächst dekantiert und die Gele mit ddH₂O bedeckt. Danach wurden die Gele mit dem Wasser in eine Mikrowelle gestellt und für ca. 10 min erwärmt. Der Prozess wird so lange mit frischem ddH₂O wiederholt, bis Proteinbanden in den Gelen erkennbar sind. Zwischendurch können die erwärmten Gele mit einem saugfähigen Tuch (z.B. Kleenex) versetzt und geschüttelt werden. Das Tuch dient zur Entfernung des Farbstoffs aus der Lösung. Alternativ kann zur schnelleren Entfärbung der Gele eine Entfärbelösung, bestehend aus 40 % Methanol und 10 % Essigsäure, verwendet werden. Hierbei wird etwas von der Lösung über die Gele gegeben und so lange unter Schütteln inkubiert bis die Gele entfärbt sind. Detektiert wurden die Gele unter der Geräteeinstellung „*white transillumination*“ in einer Geldokumentationsanlage der Firma Bio-Rad.

2.2.17 Silberfärbung von SDS-Gelen

Die Silberfärbung ist eine weitere Methode zum Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen. Sie ist sensitiver als die Coomassie-Färbung [126] und somit bei Arbeiten mit

kleinen Proteinen bzw. geringen Proteinmengen der Coomassie-Färbung zu bevorzugen. Das verwendete Protokoll basiert auf dem Protokoll nach Heukeshoven und Dernick [127].

In dieser Arbeit wurden alle SDS-Gele, welche Proben von DGZ-Fractionen enthalten, mittels Silberfärbung untersucht. Hierfür wurden die folgenden Schritte nacheinander durchgeführt (siehe Tabelle 2.6). Das Formaldehyd wurde der Silbernitrat- bzw. Entwicklerlösung immer erst kurz vor Verwendung hinzugefügt. Die Gele wurden analog der Beschreibung unter 2.2.16 detektiert.

Tabelle 2.6: Durchführung einer Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelelen

Lösung	Zeit
Fixierer	10 min
Inkubator	10 min
3 x ddH₂O	Je 10 min
Silbernitratlösung	10 min
1 : 10 verdünnt in 50 ml + 35 µl Formaldehyd	
ddH₂O	< 1 min
Entwickler	Bis Banden sichtbar sind
+ 35 µl Formaldehyd (in 50 ml)	
Stop-Lösung	Bis keine Luftblasen
1/10 Volumen zu der Entwicklerlösung	mehr sichtbar sind

2.2.18 Herstellung von A β -Lyophilisaten

Ein Röhrchen mit 1 mg A β (1-42) (Bachem) wird mit 700 µl HFIP versetzt, wieder verschlossen, mit Parafilm abgedichtet und kurz gemischt. Das Röhrchen wird in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben und dieses ebenfalls mit Parafilm abgedichtet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am folgenden Tag wird der Inhalt des Röhrchens in ein HPLC-Gefäß aus Glas überführt und bis auf eine kleine Öffnung mit Parafilm abgedichtet, um das Verdampfen des HFIP auf ein Minimum zu reduzieren. Je 25,2 µl oder 75,6 µl der Lösung (dies entspricht 36 µg bzw. 108 µg A β (1-42)) werden mit einer in einen Adapter gespannten Hamilton-Spritze zügig in 1,5 ml LoBind Tubes (Eppendorf) überführt. Alle erhaltenen Aliquots werden für 30 - 60 min in der SpeedVac getrocknet. Die Lagerung der A β -Stocks erfolgt in einer mit Parafilm abgedichteten Glasflasche bei Raumtemperatur.

2.2.19 Angepasster QIAD Assay zur Bestimmung von Proteinverteilungen und -konzentrationen

Der *quantitative determination of interference with A β aggregate size distribution assay*, kurz QIAD *assay*, wurde von Brener et al. dazu entwickelt, um Substanzen auf ihren Einfluss auf die A β -Aggregation zu untersuchen [128]. Der Assay ist eine Kombination aus Dichtegradientenzentrifugation und RP-HPLC und erlaubt somit die quantitative Analyse der eingesetzten Substanzen.

In dieser Arbeit wurde diese Methode auf die hier untersuchte Fragestellung angepasst. Neben der Quantifizierung verschiedener A β -Spezies wurden ebenfalls die dem A β hinzugefügten Komponenten, insbesondere PrP, quantifiziert. Der Assay beinhaltet die folgenden Schritte:

2.2.19.1 Probenvorbereitung

Die Probenvorbereitung unterscheidet sich etwas, je nachdem, ob zwei (A β und PrP) oder drei (A β , PrP und D-Peptide) Komponenten untersucht werden. Zunächst wurde ein 36 μ g A β (1-42)-Lyophilisat in 30 mM Tris-HCl Puffer, pH 7,4, für 2 h bei 22 °C und unter Schütteln bei 600 rpm inkubiert. Dieser Vorinkubationsschritt ist so konzipiert, dass oligomere A β (1-42)-Spezies entstehen, größere Aggregate bzw. A β (1-42)-Fibrillen auf Grund der zu kurzen Inkubationszeit aber noch ausbleiben. Während dieser Inkubationszeit wurden alle benötigten PrP-Stocklösungen vor Verwendung für 30 min bei 4 °C und 100.000 x g zentrifugiert.

Nach 2 h Vorinkubation wurden Endkonzentrationen von entweder 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M oder 20 μ M PrP(23-230), PrP(23-144) oder PrP(90-230) hinzugefügt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. PrP(23-144) wurde zusätzlich mit Konzentrationen von 40 μ M und 60 μ M untersucht. Das Gesamtvolumen aller Proben beträgt 100 μ l bei einer finalen A β -Konzentration von 80 μ M, bezogen auf die Monomere.

Wurden insgesamt drei Komponenten untersucht, so wurde entweder PrP oder das D-Peptid während der A β -Inkubation zu der Lösung hinzugefügt, die jeweils andere Komponente erst nach 2 h für weitere 30 min. Alternativ wurde A β vorinkubiert, eine Komponente nach 2 h hinzugefügt und die dritte Komponente nach insgesamt 2,5 h für weitere 30 min. Die gesamte Inkubationszeit beträgt folglich 3 h. Welche der beiden Vorbereitungsarten angewandt wurde, ist dem jeweiligen Experiment zu entnehmen.

2.2.19.2 Dichtegradientenzentrifugation (DGZ)

Die Proben wurden jeweils auf einen diskontinuierlichen, mit 30 mM Tris-HCl, pH 7,4 gepufferten Saccharosegradienten aufgetragen. Der Gradient beinhaltet Saccharosekonzentrationen von 5 % (oben) bis 60 % (unten) (siehe Tabelle 2.7).

Tabelle 2.7: Zusammensetzung des Saccharosegradienten für die DGZ. Der Gradient wird von unten (60 %) nach oben (5 %) geschichtet und die zu untersuchende Probe zuletzt aufgetragen.

Saccharosekonzentration	Volumen
Probe	100 μ l
5 % (w/w)	150 μ l
10 % (w/w)	150 μ l
15 % (w/w)	400 μ l
20 % (w/w)	400 μ l
25 % (w/w)	200 μ l
50 % (w/w)	200 μ l
60 % (w/w)	300 μ l

In dem Ausschwingrotor TLS-55 konnten maximal vier Gradienten gleichzeitig untersucht werden. Jeder Gradient wurde in einem 11 x 34 mm Polyallomer oder Polyclear Zentrifugenröhrchen (Seton) geschichtet. Das Gesamtvolumen jedes Gradienten beträgt 1900 μ l, die Probe miteinbezogen. Die Zentrifugation erfolgte für 3 h bei 4 °C und 55.000 rpm (dies entspricht 259.000 x g).

Nach der Zentrifugation wurde jeder Gradient von oben nach unten in 13 x 142 μ l Fraktionen aufgeteilt. Zu der restlichen Lösung (rein rechnerisch 54 μ l) wurden 80 μ l 30 mM Tris-HCl, pH 7,4 hinzugefügt. Zusammen ergibt diese Lösung die Fraktion 14. Für Rechnungen mit dieser Fraktion wird ein Verdünnungsfaktor von 2,48 verwendet. Das Gesamtvolumen dieser Fraktion beträgt 134 μ l.

2.2.19.3 analytische *reversed-phase high-performance liquid chromatography* (RP-HPLC)

Jede der erhaltenen Fraktionen wurde mittels Tris-Tricin-SDS-PAGE (siehe 2.2.14) sowie RP-HPLC untersucht. Hierzu wurden ca. 65 μ l jeder Fraktion in abgeschnittene 0,5 ml LoBind Reaktionsgefäße (Eppendorf), welche sich in HPLC-Gefäßen befanden, überführt. Mittels Autosampler wurden 20 μ l aus den Gefäßen entnommen (Nadelhöhe: 25 mm) und auf eine Zorbax 300 SB-C8 Stable Bond Analytical

Säule (4,6 x 250 mm, Agilent) aufgetragen und in einem Agilent 1260 infinity System gemessen. Alle Komponenten in der Lösung wurden über einen 10 - 40 %igen Acetonitrilgradienten mit 0,1 % TFA in ddH₂O (siehe Tabelle 2.8) bei 80 °C und einer Flussrate von 1 ml/min getrennt. Der Druck lag während der gesamten Messung zwischen 60 und 70 bar. Diese harschen Konditionen sind notwendig, um zum einen die Komplexe bestehend aus A β und PrP (und ggf. D-Peptiden) zu lösen, aber auch, um die verschiedenen A β -Spezies zu monomerisieren, damit nur ein Peak für A β gemessen wird.

Die Detektion der einzelnen Komponenten erfolgte durch UV-Absorption bei einer Wellenlänge von 214 nm. Für die Auswertung der Signale wurden von allen untersuchten Substanzen Kalibriergeraden erstellt. Hierzu wurden bekannte Konzentrationen dieser unter denselben Parametern mittels RP-HPLC untersucht wie die zu analysierenden Proben. Die Auftragung von der erhaltenen Peakfläche gegen die Proteinkonzentration ermöglichte die Kalibrierung der Säule und somit die Berechnung von Proteinkonzentrationen in den Dichtegradientenfraktionen. Datenaufnahme sowie Integration der Peaks erfolgte mit dem Programm ChemStation von Agilent. Histogramme wurden mit OriginPro 9.0 erstellt.

Tabelle 2.8: Acetonitrilgradient zur Trennung von A β , PrPs und D-Peptiden aus Dichtegradientenfraktionen mittels RP-HPLC

Zeit [min]	Wasser [%]	80 % ACN [%]
0	87,5	12,5
3	87,5	12,5
28	50	50
32	50	50
32,1	87,5	12,5
38	87,5	12,5

2.2.19.4 Berechnung von A β /PrP-Verhältnissen

Die A β -PrP-Komplexe wurden in allen Versuchen innerhalb der Gradientenfraktionen 11 bis 14 verifiziert. Deshalb wurde in diesen Fraktionen das Verhältnis von A β zu PrP berechnet. Hierfür wurde die Stoffmenge von A β in den Fraktionen 11 bis 14 summiert und durch die Stoffmenge von PrP derselben Fraktionen geteilt. Somit wurde für jedes Experiment ein A β /PrP-Verhältnis erhalten. Für den Fall, dass in einer der Fraktionen 11 bis 14 lediglich eins der beiden Proteine vorlag, da das andere beispielsweise unterhalb des Detektionslimits der HPLC lag, wurde diese Fraktion bei der Berechnung nicht berücksichtigt. Zur Berechnung des Mittelwertes

und der Standardabweichung der Verhältnisse wurde jedes Experiment mindestens dreimal durchgeführt. Zur Berechnung der Standardabweichung wurde Formel 2.3 verwendet.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{n}} \quad (2.3)$$

2.2.20 Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) mit Iodixanol

Bevor das Dichtegradientenmaterial durch Luis Macorano im Rahmen seiner Bachelorarbeit auf Saccharose umgestellt wurde (siehe [129]), wurden die ersten Analysen in der vorliegenden Arbeit mit Iodixanol als Gradientenmaterial durchgeführt (nach [128]). Dies betrifft die unter Kapitel 3.4 gezeigten Ergebnisse, bei denen nach einem geeigneten Puffer zur Oligomerisierung von A β gesucht wurde.

Ein 36 μ g A β -Aliquot wurde in 100 μ l des zu untersuchenden 10 mM Puffers (Natriumphosphat (NaPi) pH 7,4; Tris-HCl pH 7,4; Bis-Tris Propan pH 7,4; Tricin pH 7,4; Bis-Tris pH 7,4; Glycylglycin pH 7,4; Bicin pH 7,4 oder HEPES pH 7,6) gelöst und für 4 h bei 22 °C und 600 rpm schüttelnd inkubiert. Gegen Ende der Inkubation wurde der Iodixanolgradient angefertigt. Hierfür wurde die 60 %ige Stammlösung, die unter dem Namen OptiPrep (Axis-Shield) erhältlich ist, auf die benötigte Konzentration (siehe Tabelle 2.9) verdünnt und hierbei 10 mM der zu untersuchenden Puffersubstanz hinzugefügt.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung des Iodixanolgradienten für die DGZ. Der Gradient wird von unten (50 %) nach oben (5 %) geschichtet und die zu untersuchende Probe zuletzt aufgetragen.

Iodixanolkonzentration	Volumen
Probe	100 μ l
5 % (v/v)	100 μ l
10 % (v/v)	260 μ l
20 % (v/v)	780 μ l
30 % (v/v)	260 μ l
40 % (v/v)	260 μ l
50 % (v/v)	260 μ l

Die Zentrifugation erfolgte für 3 h bei 4 °C und 259.000 \times g. Der Gradient wurde in 14 \times 140 μ l Fraktionen aufgeteilt. Zu dem Rest (rechnerisch 60 μ l) wurden 60 μ l 6 M Guanidinhydrochlorid hinzugefügt und für 10 min aufgekocht. Diese Lösung entspricht der Fraktion 15 des Gradienten. Die Fraktionen 1 bis 14 wurden mittels

Tris-Tricin-SDS-PAGE analysiert sowie alle Fraktionen über RP-HPLC untersucht. Abweichend zu der Beschreibung unter 2.2.19 wurden die Proben nicht über einen Autosampler, sondern manuell über ein Injektionsventil auf die Säule aufgetragen. Die Messungen erfolgten isokratisch bei 30 % Acetonitril mit 0,1 % TFA für 16 min.

2.2.21 Atomic Force Microscopy (AFM)

Für strukturelle Untersuchungen der A β -PrP-Komplexe wurden diese unter anderem über Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy*) (AFM) untersucht. Vor Verwendung des PrP(23-144) wurde die Stammlösung (ca. 100 μ M PrP(23-144) gelöst in ddH₂O) bei 42.000 rpm (ca. 100.000 \times g) bei 4 °C für 30 min zentrifugiert und mit dem Überstand weitergearbeitet. Zur Herstellung von A β -PrP-Komplexen wurde ein 36 μ g A β (1-42)-Lyophilisat in 30 mM Tris-HCl Puffer, pH 7,4, für 2 h bei 22 °C unter Schütteln bei 600 rpm inkubiert. Nach diesen 2 h wurden 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M oder 40 μ M PrP(23-144) für weitere 30 min hinzugefügt. Die A β -Konzentration beträgt in allen Proben 80 μ M und das Probenvolumen insgesamt 100 μ l. Die Komplexe wurden bei 16.100 \times g und 4 °C für 30 min abzentrifugiert, das Sediment insgesamt zweimal mit je 100 μ l 30 mM Tris-HCl Puffer gewaschen und nach jedem Waschschrift erneut für 30 min zentrifugiert. Das Sediment (= die Komplexe) wurden in 100 μ l 30 mM Tris-HCl Puffer aufgenommen.

Zur Untersuchung der A β -Oligomere wurden diese unter denselben Bedingungen wie die A β -PrP-Komplexe hergestellt, mit dem Unterschied, dass kein PrP hinzugefügt wurde, sondern die Oligomere insgesamt 2,5 h inkubierten. Die A β -Oligomere wurden bei 16.100 \times g und 4 °C für 30 min zentrifugiert und mit dem Überstand (= den löslichen Oligomeren) weitergearbeitet. Ebenfalls wurde das zentrifugierte PrP(23-144) (s.o.) untersucht und dafür in 30 mM Tris-HCl Puffer (pH 7,4) auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die jeweils gemessene Konzentration ist der Abbildungsunterschrift im Ergebnisteil zu entnehmen.

50 μ l der A β -Oligomere wurden für 3 min, bzw. je 25 μ l von PrP(23-144) oder der resuspendierten A β -PrP-Komplexe wurden für 30 min auf einem frisch geschnittenen Glimmerkristall (Mica) inkubiert. Alle AFM-Proben wurden danach dreimal mit je 100 μ l ddH₂O gewaschen und mit Stickstoffgas getrocknet. Die Proben wurden im NanoWizard 3 (JPK AG, Berlin) im intermittierenden Modus (Englisch: *intermittent contact mode*) bei Auflösungen von 512 oder 1024 Pixeln und einer Geschwindigkeit von einer Reihe pro Sekunde gemessen. Es wurde ein *Cantilever* aus Silizium mit einem Spitzenradius von 7 nm und einer Federkonstante von 26 N/m verwendet

(Olympus OMCL-AC160TS). Aufgrund der Beschaffenheit der Komplexe bezüglich Festigkeit, Perforation und auch der Adhäsion zur *Cantilever*-Spitze (insbesondere bei Proben mit hohem PrP(23-144)-Gehalt) mussten die Parameter bei jeder Messung etwas angepasst werden. Auch der *Cantilever* musste regelmäßig gewechselt werden, da dieser durch die Probeneigenschaften schnell verschmutzte.

Bei gezeigten Bildern wurde die Fläche mit der JPK Data Processing Software geglättet. Im Falle der Auswertung der A β -Oligomere (Anzahl und Größe) wurde die Gwyddion 2.44 Grain Analyse verwendet. Nach Ebenen der Fläche wurden die einzelnen Oligomere markiert und ein Schwellenwert von 13 % eingestellt. Die maximale Höhe jedes einzelnen Oligomers wurde durch Subtraktion des Minimalwerts korrigiert. Da die AFM-Messungen lateral durch die Breite der Spitze des *Cantilevers* beeinflusst werden, wurde die Breite der gemessenen Partikel (A β -Oligomere) unter Anwendung der Formel 2.4, beschrieben in [130], korrigiert. Hierbei steht r_{tip} für den Radius der Spitze und h für die Höhe des Partikels. Alle AFM-Messungen sowie die Auswertung der A β -Oligomere erfolgten durch Elke Reinartz.

$$\Delta = r_{tip} * \cos \left[\arcsin \left(\frac{r_{tip} - h}{r_{tip}} \right) \right] \quad (2.4)$$

2.2.22 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)-Spektroskopie

2.2.22.1 liquid state NMR-Spektroskopie

Zur NMR-spektroskopischen Untersuchung von PrP(23-230) oder PrP(23-144) (Probenzusammensetzung siehe 2.1.6.8 bzw. Bildunterschrift im Ergebnisteil) wurde eine Reihe von 2D [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektren [131] von Philipp Neudecker aufgenommen. Hierfür wurde an Bruker 600 MHz, Bruker 700 MHz, Varian 800 MHz oder Varian 900 MHz NMR-Spektrometern, die mit inversen Kryo-Probenköpfen mit aktiv abgeschirmten z-Gradientenspulen ausgestattet sind, gemessen. Die Proben temperatur wurde durch Referenzierung mit Methanol-d $_4$ [132] eingestellt und in der indirekten ^{15}N -Dimension wurden mindestens 256 komplexe Datenpunkte für eine spektrale Weite von mindestens 24,0 ppm aufgenommen. Die Prozessierung der NMR-Spektren erfolgte durch Philipp Neudecker mit dem Softwarepaket NMRPipe [133] und die Analyse über NMRViewJ 8.0.3 [134]. Zur Verbesserung der Auflösung wurde der *free induction decay* (FID) in der ^{15}N -Dimension durch Linear Prediction [135] auf maximal die doppelte Länge extrapoliert. Nach Apodisierung

durch Multiplikation mit einer um 60° bis 90° verschobenen Sinusquadratfunktion wurde der FID in allen Dimensionen durch einfaches bis doppeltes Zero-Filling verlängert, fouriertransformiert und phasenkorrigiert [136]. Die Korrektur der Basislinie in der direkten Dimension erfolgte mit dem modellfreien Median-Algorithmus [137]. Über die $^1\text{H}_2\text{O}$ -Resonanz von 4,964 ppm bei 5°C (4,821 ppm bei 20°C) relativ zu 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat (DSS) in D_2O als externer Standard sind die chemischen Verschiebungen der ^1H -Kerne referenziert. Die Referenzierung der anderen Kerne erfolgte indirekt über die relativen Nullpunktsfrequenzen 0,251449530 für ^{13}C -Kerne bzw. 0,101329118 für ^{15}N -Kerne [138].

2.2.22.2 Festkörper-NMR-Spektroskopie

Zur Untersuchung der $\text{A}\beta$ -PrP-Komplexe wurden insgesamt vier verschiedene Festkörper-NMR-Proben hergestellt. Bei allen wurde zunächst $\text{A}\beta$ inkubiert und anschließend das PrP hinzugefügt. Nachfolgend wird die Herstellung jeder einzelnen Probe aufgeführt, da es bei jeder Probe leichte Unterschiede gab. Isotopenmarkiertes $\text{A}\beta(1-42)$ wurde durch Lothar Gremer hergestellt, nicht-isotopenmarkiertes $\text{A}\beta(1-42)$ wurde, wie bei allen anderen Versuchen auch, von der Firma Bachem bezogen.

Komplexe aus 240 μM $\text{A}\beta(1-42)$ / 60 μM ^{13}C - ^{15}N PrP(23-230)

8 x 108 μg $\text{A}\beta$ Aliquots wurden mit je 100 μl 30 mM Tris-HCl, pH 7,4, versetzt und für 2 h bei 22°C unter 600 rpm Schütteln inkubiert. Alle $\text{A}\beta$ -Stocks wurden vereinigt und 60 μM ^{13}C - ^{15}N PrP(23-230) sowie 0,03 % Natriumazid hinzugefügt. Die entstandenen Komplexe wurden in einen Rotor überführt und gemessen. Diese Probe wird nachfolgend Probe 1 genannt.

Komplexe aus 240 μM $\text{A}\beta(1-42)$ / 40 μM ^{13}C - ^{15}N PrP(23-144)

14 x 108 μg $\text{A}\beta$ Aliquots wurden mit je 100 μl 30 mM Tris-HCl, pH 7,4, versetzt und für 2 h bei 22°C unter 600 rpm Schütteln inkubiert. Alle $\text{A}\beta$ -Stocks wurden vereinigt, 40 μM ^{13}C - ^{15}N PrP(23-144) hinzugefügt und für weitere 30 min inkubiert. Nach Hinzufügen von 0,03 % Natriumazid wurden die $\text{A}\beta$ -PrP-Komplexe für 2 min bei $16.100 \times g$ zentrifugiert und das Sediment (= die Komplexe) zweimal mit je 500 μl 30 mM Tris-HCl, 0,03 % Natriumazid, pH 7,4 gewaschen. Das Sediment wurde in 300 μl 30 mM Tris-HCl, 0,03 % Natriumazid, pH 7,4 aufgenommen und konnte so über Nacht bei 4°C gelagert werden, bevor die Komplexe in den Rotor überführt wurden. Diese Probe wird nachfolgend Probe 2 genannt.

Komplexe aus 320 μM ^{13}C - ^{15}N A β (1-42)/ 40 μM PrP(23-144)

2 mg ^{13}C - ^{15}N A β (1-42) wurden in einem 2 ml LoBind Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit 1,4 ml 30 mM Tris-HCl, pH 7,4, versetzt und für 2 h bei 22 °C unter 600 rpm Schütteln inkubiert. Nach Hinzufügen von 40 μM PrP(23-144) und 0,03 % Natriumazid wird die Probe weitere 30 min inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 16.100 x g wurde das Sediment zweimal mit je 1 ml 30 mM Tris-HCl, 0,03 % Natriumazid, pH 7,4 gewaschen und der Überstand bis auf einen kleinen Rest abgenommen, bevor die Probe in einen Rotor gefüllt wurde. Diese Probe wird nachfolgend Probe 3 genannt.

Komplexe aus 156,51 μM ^{13}C - ^{15}N A β (1-42)/ 78,25 μM PrP(23-144)

2 x 1,25 mg ^{13}C - ^{15}N A β (1-42) wurden je in einem 2 ml LoBind Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit je 1,775 ml 30 mM Tris-HCl, pH 7,4 versetzt und für 2 h bei 22 °C unter 600 rpm Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 78,25 μM PrP(23-144) für weitere 30 min hinzugefügt. Die Probe wurde dreimal mit 30 mM Tris-HCl, 0,03 % Natriumazid, pH 7,4 gewaschen. Diese Probe wird nachfolgend Probe 4 genannt.

Durchführung

Die Proben 1, 2 und 3 wurden an einem 14,1 Tesla (Protonenresonanzfrequenz = 600 MHz) Varian Festkörper-NMR-Spektrometer, Proben 2 und 3 zusätzlich an einem Oxford 14,1 Tesla (= 600 MHz) Festkörper-NMR-Spektrometer mit Hilfe eines 3,2 mm Standard-Bore Triple-Resonanz-MAS-Probenkopfes gemessen (MAS = *magic angle spinning*). Die Messung von Probe 4 erfolgte an einem Bruker 18,8 Tesla (= 800 MHz) Festkörper-NMR-Spektrometer des Typs AEON mit 3,2 mm Wide-Bore Triple-Resonanz-MAS-Probenkopf. Als Rotoren kamen entweder dickwandige (für die Proben 1, 2 und 4) oder dünnwandige (für Probe 3) 3,2 mm Rotoren von Varian (Agilent) oder Bruker zum Einsatz. Die Proben wurden entweder mit etwas 30 mM Tris-HCl, pH 7,4 „aufgeschlämmt“ und unter Zuhilfenahme einer Hamilton-Spritze in den Rotor überführt oder mit Hilfe eines selbst gefertigten Zentrifugationswerkzeugs direkt in den Rotor zentrifugiert.

^{13}C -Seitenketten- und -Rückgrat-Resonanzen wurden mit Hilfe von *Proton-Driven Spin Diffusion* (PDS)-Experimenten [139] mit Mischzeiten zwischen 10 ms und 300 ms bestimmt, wobei bei 10 - 50 ms hauptsächlich intraresiduale und bei 100 - 300 ms zusätzlich interresiduale Korrelationen auftreten. Die in Kapitel 3.7.7 dargestellten PDS-Spektren wurden bei einer Rotationsfrequenz von 11 kHz, einer nominalen Temperatur von -10 °C (Proben 1, 3 und 4) oder -16 °C (Probe 2) und einer Mischzeit von 30 ms (Proben 1, 2 und 3) oder 50 ms (Proben 3 und 4) gemessen. Weiterhin wurden homonukleare Doppelquanten-Korrelationsexperimente mit

SPC5-Wiedereinkopplung [140] zur Zuordnung der Signale zum Aminosäure-Typ verwendet. Interresiduale Korrelationen und eine umgebungsspezifische Aminosäurezuordnung über ^{15}N - ^{13}C -Korrelationen wurden mit Hilfe des sogenannten SPECIFIC-CP-Transfers [141] erhalten, bei welchem ein frequenzselektiver Polarisationstransfer von ^{15}N entweder nach $^{13}\text{C}\alpha$ oder ^{13}CO erfolgt. Anschließend erfolgt das *Dipolar Assisted Rotational Resonance* (DARR)-Mixing [142], um die Magnetisierung auf die Seitenketten-Kohlenstoffe zu verteilen. Für die sequenzielle Verknüpfung der AS im Protein-Rückgrat wurden zwei- und dreidimensionale NCA-, NCACX-, NCO- und NCOCX-Experimente gemessen.

Während aller Aufnahme- und Evolutionszeiten erfolgte eine Hochleistungsbreitband-Protonen-Entkopplung mit SPINAL-Phasenmodulation [143] mit Feldstärken zwischen 71 und 91 kHz. Alle Spektren wurden mit der Software NMRPipe [133] prozessiert und mit einer quadratischen Sinusfunktion mit Beginn bei $0,35$ oder $0,4 \pi$ (Proben 1, 3 und 4) oder einer Gaußfunktion (Probe 2) geglättet. Alle chemischen Verschiebungen wurden mit der Software CCPN [144] zugeordnet. ^{13}C -chemische Verschiebungen wurden extern mit Adamantan referenziert, dessen CH-Signal auf $31,4$ ppm in Referenz zu DSS gesetzt wurde, während ^{15}N -chemische Verschiebungen indirekt über ^{13}C referenziert wurden. Sekundäre chemische Verschiebungen wurden zu *random coil* Verschiebungen von Wishart et al. referenziert [145].

Für die Zuordnung der Peaks zu den einzelnen AS wurden mehrere multidimensionale homo- und heteronukleare Korrelationsexperimente durchgeführt. Für Probe 2 erfolgte eine AS-spezifische Zuordnung vieler Peaks, die AS der Octarepeats ausgenommen. Bei Probe 3 konnte eine sequenzspezifische Zuordnung aller AS mit Ausnahme der drei Histidine und des Methionins erfolgen. Einige Peaks geringer Intensität konnten nicht zugeordnet werden; dabei handelt es sich um Anteile minderer Spezies. Die Histidine konnten aufgrund der Imin-Enamin-Tautomerie ihrer Imidazolring-Stickstoffe, die bei einem pH-Wert von $7,4$ ihre Protonen auf einer Zeitskala ähnlich des Magnetisierungstransfers zwischen den Kernen austauschen, nicht identifiziert werden. Die Auflösung in den zweidimensionalen Spektren beträgt $0,9$ ppm für ^{13}C in Probe 1; 1 ppm für ^{13}C und $3,4$ ppm für ^{15}N in Probe 2; $0,9$ ppm für ^{13}C sowie $3,3$ ppm für ^{15}N für Probe 3 und $0,8$ ppm für ^{13}C in Probe 4 und wurde anhand der Peak-Halbwertsbreite in eindimensionalen Ausschnitten aus PDSD-Spektren bestimmt. Alle Festkörper-NMR-Messungen und Auswertungen erfolgten durch Anna König.

3 Ergebnisse

Inhaltsangabe

3.1	Reinigung von PrP(23-230)	62
3.2	Reinigung von PrP(23-144)	64
3.3	Überprüfung der gereinigten PrP-Konstrukte	69
3.4	Pufferoptimierung zur Oligomerisierung von A β	70
3.5	Anpassung des QIAD Assays und DGZ von Standardproteinen .	71
3.6	Charakterisierung der Ausgangsmaterialien	74
3.7	Charakterisierung der A β -PrP-Interaktion	83
3.8	Einfluss des Inhibitors Chicago Sky Blue auf die A β -PrP- Interaktion	108
3.9	Einfluss von D-Peptiden auf die A β -PrP-Interaktion	111

3.1 Reinigung von PrP(23-230)

In dieser Arbeit soll die Interaktion zwischen A β -Oligomeren und dem humanen PrP charakterisiert werden. Das zu untersuchende PrP musste zunächst gereinigt werden. Hierfür wurden die verwendeten PrP-Varianten rekombinant in *Escherichia coli* (*E. coli*) hergestellt. Die dafür benötigten Plasmide waren bereits im Institut vorhanden (beschrieben in [122] und [123]), weshalb die Klonierung der Konstrukte nicht Bestandteil dieser Arbeit ist. Im Folgenden werden die Reinigungen von dem Volllängenkonstrukt PrP(23-230) sowie dem N-terminalen PrP(23-144) gezeigt, beginnend mit PrP(23-230). Darüber hinaus wurde mit dem C-terminalen PrP(90-230) gearbeitet. Dieses wurde durch Elke Reinartz, Lothar Gremer und Florian Schmitz hergestellt, weshalb die Reinigung hier nicht weiter gezeigt wird.

Die *E. coli* BL21(DE3) Rosetta 2 Zellen wurden wie unter 2.2.2 beschrieben angezogen und erreichten eine Optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von ca. 8. Ein Teil der Zellen (ca. 13 g Zellen in 40 ml Aufschlusspuffer) wurde aufgeschlossen, das PrP(23-230) aus den *inclusion bodies* gelöst (siehe 2.2.4) und der Überstand mittels Größenausschluss-Chromatographie (SEC) weiter gereinigt (siehe 2.2.7 und 3.1.1). Mit ^{15}N markiertem PrP(23-230) wurde eine OD_{600} von 4,6 und mit ^{13}C - ^{15}N markiertem PrP(23-230) eine OD_{600} von 1,3 erhalten. Für die weitere Reinigung standen hier 7 g bzw. 3,3 g Zellen zur Verfügung.

3.1.1 Größenausschluss-Chromatographie (SEC)

Für die Reinigung von PrP(23-230) wurde eine Größenausschluss-Chromatographie (SEC) durchgeführt, da dieses Prion-Konstrukt keinerlei Tag besitzt und somit keine Affinitäts-Chromatographien angewandt werden konnten. Für die SEC wurde eine HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade Säule verwendet und insgesamt für ca. 2,5 h bei einer Flussrate von 2,4 - 2,5 ml/min chromatographiert. Da maximal 6 ml auf die Säule aufgetragen werden konnten, um eine bestmögliche Trennung der in der Lösung befindlichen Proteine zu gewährleisten, wurden bis zu drei Läufe hintereinander durchgeführt, um die gesamte aufgeschlossene Probe zu reinigen. Jede zweite SEC-Fraktion wurde einer TCA-Fällung unterzogen (siehe 2.2.8) und mittels SDS-PAGE untersucht.

In dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel ist eine prominente Bande unterhalb der 25 kDa Markerbande zu erkennen (siehe Abbildung 3.1 B, roter Pfeil). Diese entspricht dem SEC-Peak, der nach ca. 170 - 195 ml Volumen von der Säule eluiert

(siehe Abbildung 3.1 A, roter Pfeil). Hierbei handelt es sich um das ca. 23 kDa große PrP(23-230). Auf eine weitere Untersuchung mittels Western Blot wurde verzichtet, da das Protokoll zur Reinigung von PrP am Institut bereits etabliert war. Neben der PrP(23-230)-Bande sind noch weitere Proteinbanden in den Elutionsfraktionen zu erkennen, weshalb das PrP(23-230) einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen wurde (siehe 3.1.2).

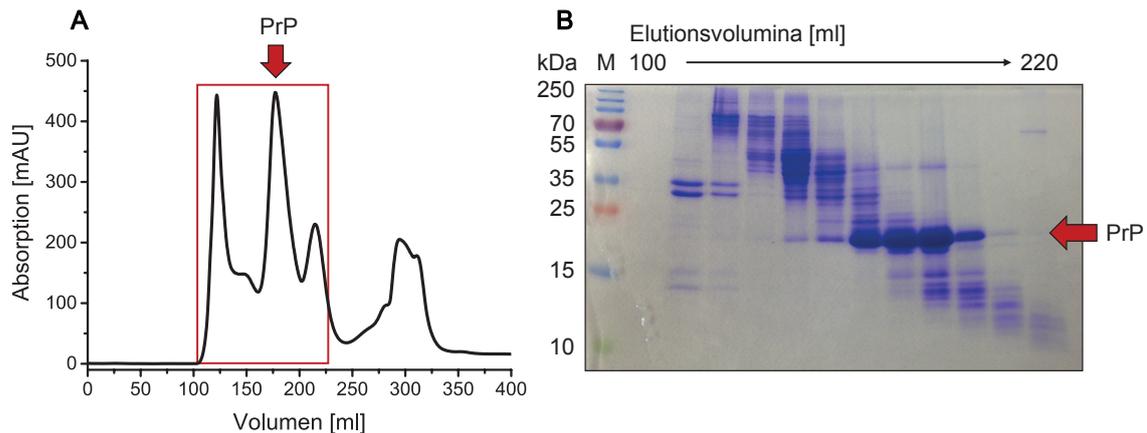


Abbildung 3.1: Chromatogramm eines SEC-Laufes zur Reinigung von PrP(23-230) und korrespondierende SDS-PAGE. In A ist ein typisches Chromatogramm einer PrP(23-230) enthaltenden aus *inclusion bodies* gewonnenen Probe gezeigt. Die Elutionsfraktionen des rot umrahmten Bereiches wurden über ein 15 %iges Tris-Glycin-SDS-Gel analysiert, dargestellt in B. Das ca. 23 kDa große PrP(23-230) konnte identifiziert werden und ist in A und B mit einem roten Pfeil markiert.

3.1.2 Semi-präparative *reversed-phase high-performance liquid chromatography* (RP-HPLC)

Alle PrP(23-230) enthaltenden SEC-Fractionen wurden über eine semi-präparative *reversed-phase high-performance liquid chromatography* (RP-HPLC) weiter aufgereinigt (siehe 2.2.9). In dem Chromatogramm (siehe Abbildung 3.2 A) sind mehrere Peaks zu erkennen. Nach Analyse mittels SDS-PAGE (siehe Abbildung 3.2 B) konnte der Peak, der nach ca. 17 min und einer apparenten Acetonitrilkonzentration von 30 % eluiert, als der PrP(23-230) enthaltende Peak verifiziert werden. Neben PrP(23-230) in Spur 2 (siehe Abbildung 3.2 B) sind keine weiteren Proteinbanden zu erkennen, was für eine hohe Reinheit des Prion-Proteins spricht.

Alle PrP(23-230) enthaltenden RP-HPLC-Eluate wurden in einem Rundkolben vereinigt, Proben für analytische Zwecke entnommen, mit flüssigem Stickstoff einge-

froren und lyophilisiert. Insgesamt wurden hierbei etwa 29 mg PrP(23-230) (nicht isotopenmarkiert) aus einem Liter Medium erhalten. Mit ^{15}N PrP(23-230) wurde eine Ausbeute von 37 mg/l und mit ^{13}C - ^{15}N eine Ausbeute von 22,3 mg/l erhalten. Das Lyophilisat wurde entweder trocken bei Raumtemperatur gelagert oder in Reinstwasser gelöst und die Konzentration der Lösung photometrisch bei 280 nm ermittelt. Das PrP wurde in Wasser und nicht in Puffer gelöst, da zu Beginn der Arbeit noch nicht feststand, in welchem Puffersystem final gearbeitet wird. Eine detaillierte Beschreibung hierzu ist dem Kapitel 3.4 zu entnehmen. PrP(23-230) wurde in Konzentrationen von 140 - 180 μM in Aliquots aufgeteilt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

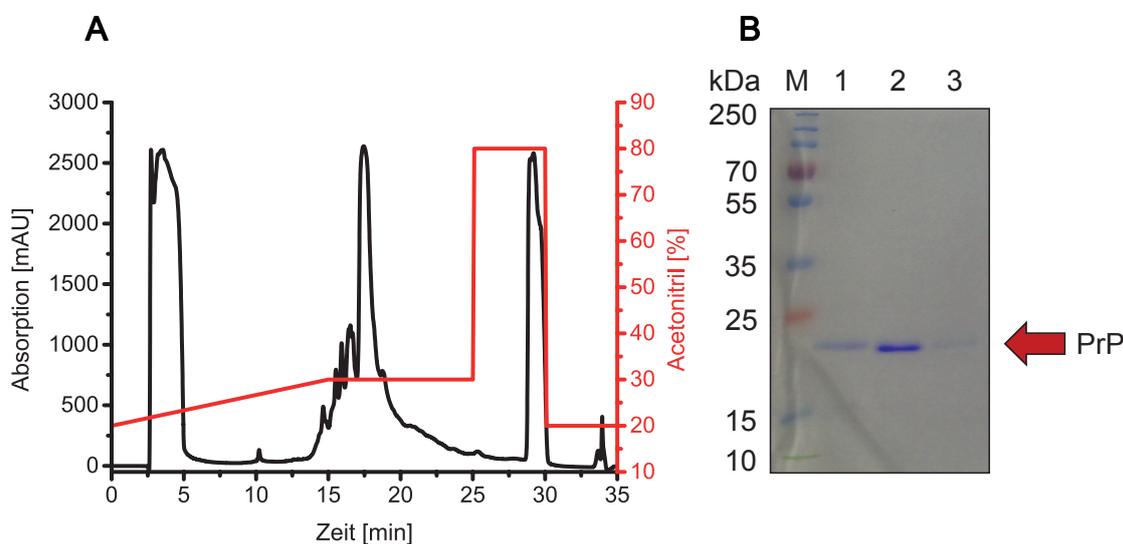


Abbildung 3.2: Chromatogramm eines RP-HPLC-Laufes zur Reinigung von PrP(23-230) und korrespondierende SDS-PAGE. Das Chromatogramm (A) zeigt einen typischen HPLC-Lauf einer PrP(23-230) enthaltenden Probe, nachdem diese zuvor mittels SEC getrennt wurde. In rot ist der dazugehörige Acetonitrilgradient gezeigt. In B sind Proben, die während des HPLC-Laufes entnommen wurden, über ein 15 %iges Tris-Glycin-SDS-Gel analysiert worden. Probe 1 wurde kurz vor Elution des Peaks nach 17 min entnommen, Probe 2 während Elution des Peaks und Probe 3 kurz danach. Insbesondere in Probe 2 ist eine prominente Bande knapp unterhalb von 25 kDa zu erkennen, die PrP(23-230) entspricht.

3.2 Reinigung von PrP(23-144)

Neben PrP(23-230) ist auch die Reinigung von PrP(23-144) Bestandteil dieser Arbeit. Das pET302/NT-His-huPrP(23-144)-Plasmid wurde von Wolfgang Hoyer und Aziz

Gauhar zur Verfügung gestellt. PrP(23-144) wurde bereits durch Aziz Gauhar hergestellt und mittels *gravity flow* gereinigt. Das Reinigungsprotokoll soll dahingehend optimiert werden, dass PrP(23-144) mittels *fast protein liquid chromatography* (FPLC) gereinigt werden kann. Die Zellanzucht erfolgte wie unter 2.2.3 beschrieben. Die *E. coli*-Zellen verschiedener Anzuchten erreichten eine OD₆₀₀ von 2,4 - 3,8. Die erhaltenen 6 g Zellen aus einem Liter Medium wurden in 18 ml Aufschlusspuffer aufgeschlossen und das PrP(23-144) aus den entstandenen *inclusion bodies* gelöst (siehe 2.2.4). Dieser Reinigungsschritt ist erforderlich, da sich das PrP(23-144) nicht im Überstand befindet.

Das aus den *inclusion bodies* gelöste PrP(23-144) wurde über eine Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) weiter gereinigt (siehe 3.2.1). Bei der ersten Reinigung von nicht-markiertem ¹⁴N PrP(23-144) wurde das Volumen der PrP(23-144) enthaltenden IMAC-Fraktionen nach Schneiden durch die *Tobacco Etch Virus* (TEV)-Protease mittels Zentrifugalkonzentrator (Centricon) mit einer Ausschlussgrenze von 3 kDa eingengt, um das PrP(23-144) zu konzentrieren. Hierbei fiel jedoch ein Teil des Proteins aus der Lösung aus, weshalb dieser Schritt bei der Reinigung von ¹⁵N PrP(23-144) nicht mehr durchgeführt wurde. Ebenfalls bei der Dialyse Guanidinhydrochlorid-haltiger PrP(23-144)-Lösung gegen 30 mM Tris-HCl mit 100 mM NaCl, pH 7,4 fiel Protein aus der Lösung aus. Im Folgenden wird die Reinigung von ¹⁵N PrP(23-144) gezeigt, bei der die oben aufgeführten Schritte wegen des Ausbeuteverlustes nicht mehr angewendet wurden. Bei allen Chromatogrammen und SDS-Gelen ist ¹⁵N markiertes PrP(23-144) gezeigt.

3.2.1 Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie (IMAC)

Nach Aufschluss der *E. coli*-Zellen und Lösen des PrP(23-144) aus den *inclusion bodies* (siehe 2.2.4) wurde die Guanidinhydrochlorid-haltige Probe über eine IMAC gereinigt. Da nach erfolgter IMAC der Hexahistidin-Tag entfernt werden soll, ist es nötig das 6 M Guanidinhydrochlorid aus der Probe zu eliminieren, damit die TEV-Protease nicht denaturiert und folglich inaktiviert wird. Deshalb wurde das Guanidinhydrochlorid nach Probenauftrag auf der Säule entfernt, indem mit Laufpuffer (30 mM Tris-HCl, pH 7,4) gewaschen wurde. Erkennbar ist dies an der sinkenden Leitfähigkeit (Abb. 3.3, blau). Erst nachdem die Leitfähigkeit die Basislinie erreichte, wurde ein Imidazolgradient (bis 500 mM) über die Säule gegeben (Abb. 3.3, rot), um das Hexahistidin-getaggte PrP(23-144) von der Säule zu eluieren.

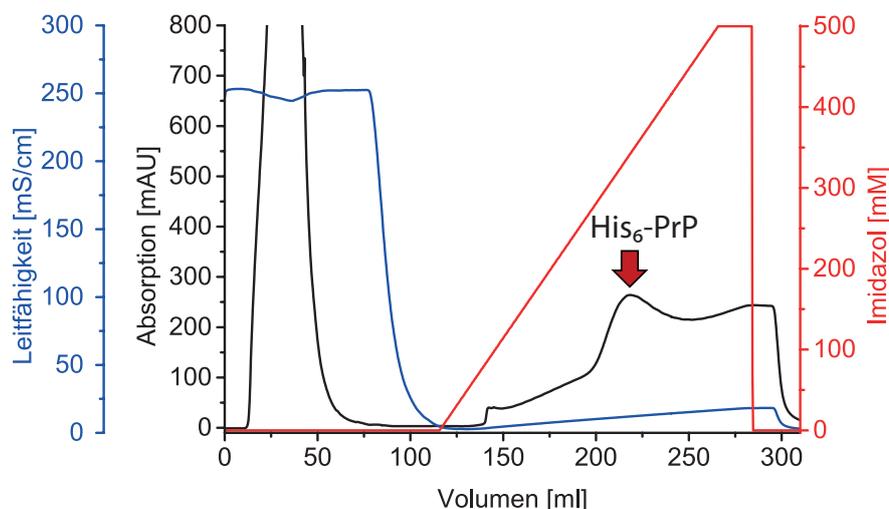


Abbildung 3.3: Chromatogramm eines IMAC-Laufes zur Reinigung von PrP(23-144). Gezeigt ist ein typisches Chromatogramm einer PrP(23-144) enthaltenden aus *inclusion bodies* gewonnenen Probe. Dargestellt sind die Absorption bei 280 nm (schwarz), die Leitfähigkeit (blau) und die Imidazolkonzentration im Elutionspuffer (rot). Nach Probenauftrag und Abnahme der Absorption wurde mit Laufpuffer gewaschen bis die Leitfähigkeit die Basislinie erreichte, um das Guanidinhydrochlorid aus der Probe zu entfernen. PrP(23-144) (roter Pfeil) eluiert ab einer apparenten Imidazolkonzentration von ca. 280 mM.

Bei apparenten Imidazolkonzentrationen von etwa 280 - 450 mM kann ein Absorptionsspeak beobachtet werden (Abb. 3.3, schwarz). Die korrespondierenden Fraktionen wurden mit einer SDS-PAGE auf ihren Proteingehalt überprüft (Abb. 3.4 A, links). Bei allen untersuchten Fraktionen kann eine Proteinbande unterhalb der 15 kDa Markerbande nachgewiesen werden, welche mit der Größe von PrP(23-144) mit Hexahistidin-Tag (ca. 14,4 kDa) übereinstimmt. Neben der PrP(23-144)-Bande ist lediglich in manchen Fraktionen eine schwache Bande auf Höhe der 15 kDa Markerbande zu erkennen. Ansonsten weist das Protein nach diesem Reinigungsschritt bereits einen hohen Reinheitsgrad auf.

Durch Hinzufügen verschiedener Mengen an TEV-Protease zu je 1 ml einer PrP(23-144) enthaltenden IMAC-Fraktion wurde die optimale Menge für das Entfernen des Hexahistidin-Tags bestimmt (Abb. 3.4 A, rechts). 22,5 µg/ml TEV-Protease erwiesen sich als effizient, um den Hexahistidin-Tag der gesamten Probe zu entfernen. Das resultierende vom Hexahistidin-Tag befreite PrP(23-144) kann im 15 %igen SDS-Gel eindeutig von dem nicht mit TEV geschnittenen PrP(23-144) unterschieden werden (Abb. 3.4 A, rechts).

Nach diesem Test wurden alle PrP(23-144) enthaltenden IMAC-Fractionen vereinigt, mit 22,5 µg/ml TEV-Protease geschnitten und das Resultat mit einer SDS-PAGE verifiziert (Abb. 3.4 B). Der Hexahistidin-Tag konnte erfolgreich von PrP(23-144) entfernt werden.

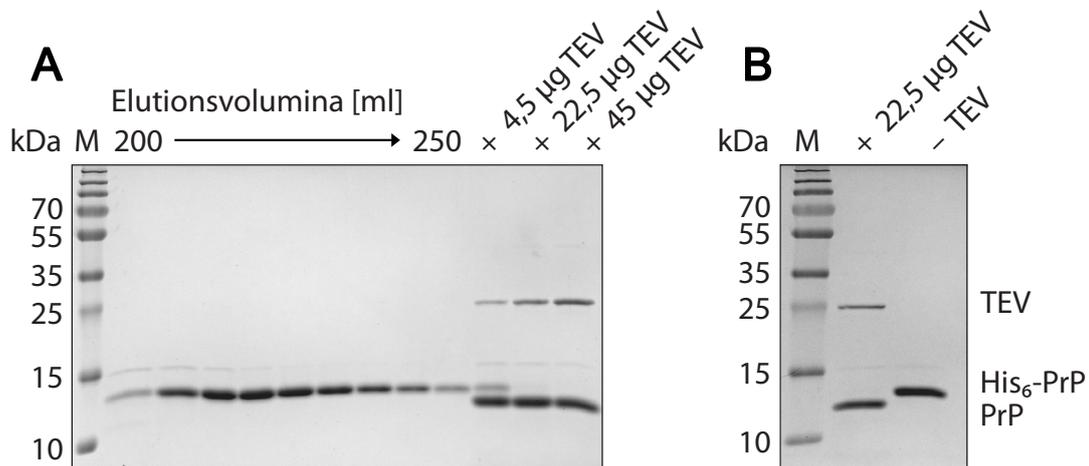


Abbildung 3.4: SDS-PAGE zur Analyse der IMAC-Elutionsfraktionen und Überprüfung des TEV-Schnitts. Die IMAC-Fractionen nach 200 - 250 ml Elutionsvolumen wurden mit einem 15 %igen Tris-Glycin-SDS-Gel untersucht. In allen Fraktionen, in denen bei der IMAC ein Absorptionsanstieg erhalten wurde, ist eine PrP(23-144)-Bande zu erkennen (A, links). Die SDS-PAGE zeigt einen optimalen Schnitt von PrP(23-144) mit 22,5 µg/ml TEV-Protease (ca. 25 kDa) (A, rechts). Die vereinigten IMAC-Fractionen wurden erfolgreich geschnitten (B).

3.2.2 Semi-präparative *reversed-phase high-performance liquid chromatography* (RP-HPLC)

Die mit TEV-Protease verdaute Probe wurde einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen, um das Imidazol sowie die TEV-Protease wieder zu entfernen. Hierfür wurde die Probe über eine semi-präparative RP-HPLC gereinigt (siehe 2.2.9). In dem Chromatogramm kann der Peak bei einer Retentionszeit von etwa 15 min dem PrP(23-144) zugewiesen werden (Abb. 3.5 A). Der Peak bei 29 min korrespondiert wahrscheinlich mit der TEV-Protease; dies wurde jedoch nicht weiter überprüft. Kurz vor Beginn, während und nach Elution des Hauptpeaks bei 15 min wurde die Probe aufgefangen und mittels SDS-PAGE auf Protein untersucht (Abb. 3.5 B). Nur bei den Proben, die während Elution des Peaks entnommen wurden (Abb. 3.5 B, Spuren 2, 3 und 4), wird eine Bande knapp unterhalb der 15 kDa Markerbande erhalten, welche mit der Größe von PrP(23-144) übereinstimmt. Weder vor (Abb. 3.5 B,

Spur 1) noch nach (Abb. 3.5 B, Spuren 5 und 6) Elution des Peaks ist Protein in der Probe enthalten.

Alle PrP(23-144) enthaltenden Eluate wurden vereinigt, in einen Rundkolben überführt und nach Entnahme von wenigen Millilitern für analytische Zwecke mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Lyophilisierung (siehe 2.2.10) wurde das PrP(23-144) in Reinstwasser aufgenommen und die Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Nach Aliquotieren des Proteins wurde dieses mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Insgesamt konnten aus einem Liter *E. coli*-Kultur 3,9 mg ^{15}N PrP(23-144) gewonnen werden. Ohne Isotopenmarkierung wurden 5,3 mg PrP(23-144) aus zwei Litern *E. coli*-Kultur nach zwei Reinigungen gewonnen. Diese noch geringere Ausbeute lässt sich durch die erste Reinigung erklären, bei der nach Einengung des Volumens der PrP(23-144) enthaltenden IMAC-Fractionen das Protein ausgefallen ist. Die erhaltenen Ausbeuten sind jedoch auch mit dem verbesserten Protokoll gering, weshalb dieses durch Luis Macorano im Rahmen seiner Masterarbeit optimiert wurde [146]. Hierbei wurde PrP(23-144) in 6 M Guanidinhydrochlorid von der IMAC-Säule eluiert, welches in einem weiteren Reinigungsschritt wieder entfernt werden musste. Doppelt markiertes ^{13}C - ^{15}N PrP(23-144) wurde von Lothar Gremer und Reinhild Wurm hergestellt.

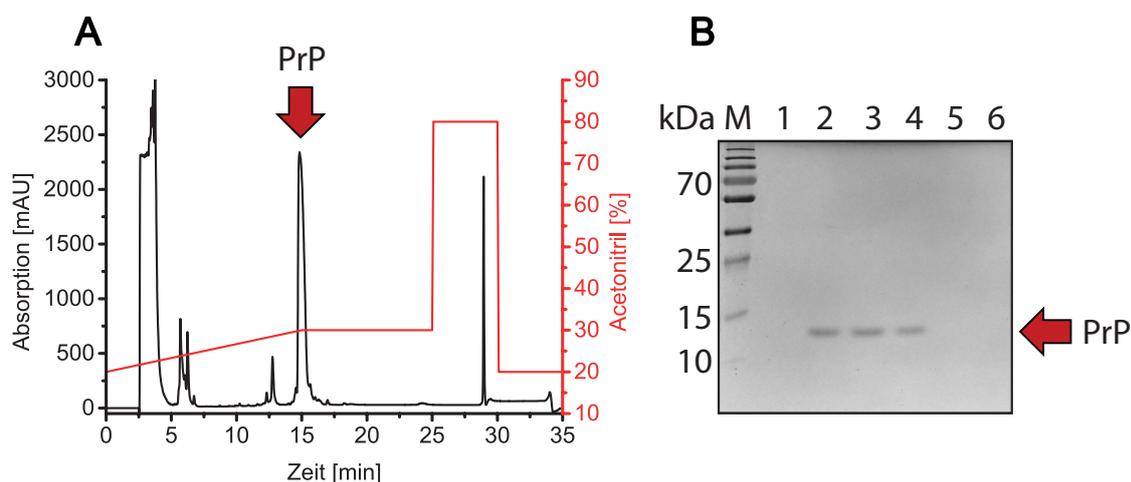


Abbildung 3.5: Chromatogramm eines RP-HPLC-Laufes zur Reinigung von PrP(23-144) und korrespondierende SDS-PAGE. PrP(23-144) eluiert nach etwa 15 min bei einer apparenten Acetonitrilkonzentration von 30 % von der HPLC-Säule (A, roter Pfeil). Proben vor (B, 1), während (B, 2 - 4) und nach (B, 5 und 6) Elution des PrP-Peaks nach einem HPLC-Lauf wurden über ein 15 %iges Tris-Glycin-SDS-Gel analysiert. Nur in den Proben, die während der Elution des Peaks entnommen wurden, ist PrP(23-144) enthalten (B, roter Pfeil).

3.3 Überprüfung der gereinigten PrP-Konstrukte

Zur Übersicht der gereinigten PrP-Konstrukte wurden PrP(23-230), PrP(23-144) und das durch Elke Reinartz, Lothar Gremer und Florian Schmitz gereinigte PrP(90-230) durch SDS-PAGE und RP-HPLC analysiert (Abb. 3.6). Die gezeigten PrP-Konstrukte sind nicht isotopenmarkiert. In jeder Spur der SDS-PAGE kann eine prominente Bande des jeweiligen PrP-Konstrukts beobachtet werden (Abb. 3.6 A). Lediglich bei PrP(23-144) ist knapp oberhalb der PrP-Bande eine schwache weitere Bande erkennbar, vermutlich nicht-geschnittenes PrP(23-144). Nach HPLC-Analyse von je 1 μM PrP ist jeweils nur ein Peak zu erkennen (Abb. 3.6 B). Alle PrP-Konstrukte eluieren nach 22 - 23 min von der analytischen C8-Säule. Insgesamt kann gezeigt werden, dass alle in dieser Arbeit verwendeten PrP-Konstrukte einen hohen Reinheitsgrad haben. PrP(23-111 Δ 41-94) wurde nicht selbst gereinigt, sondern synthetisch hergestellt.

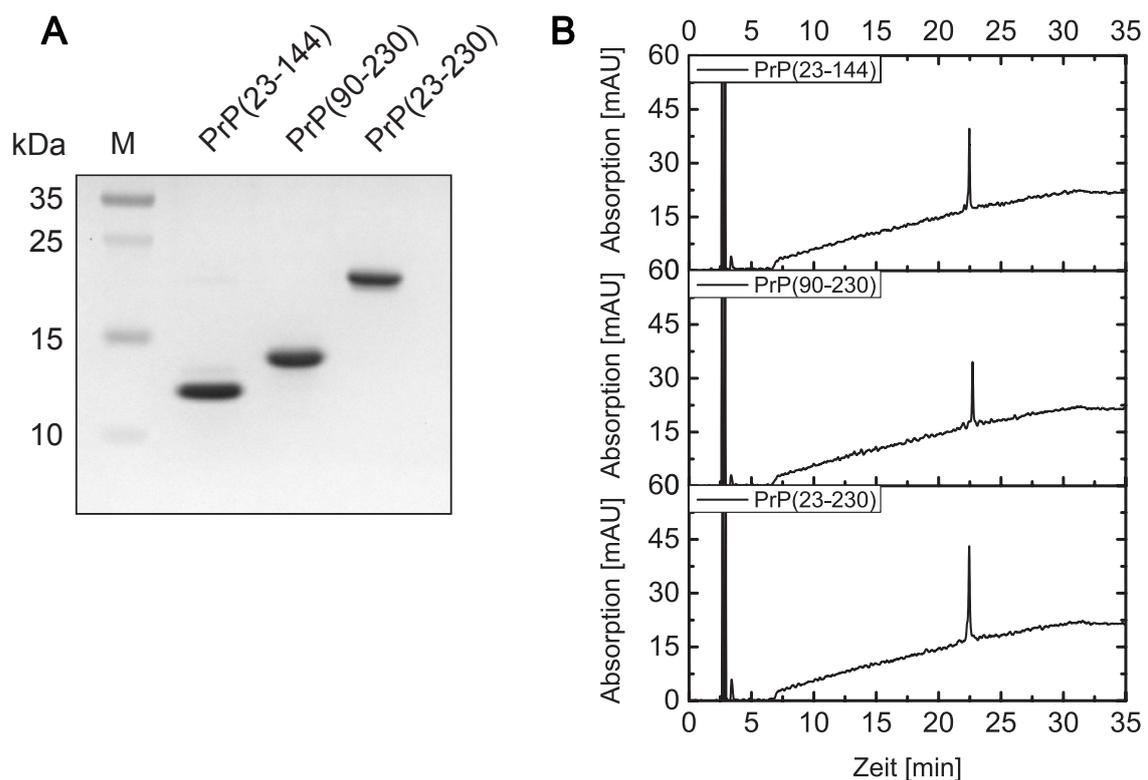


Abbildung 3.6: SDS-PAGE und RP-HPLC Chromatogramme von gereinigtem PrP(23-144), PrP(90-230) und PrP(23-230). Je 5 μg des angegebenen PrP-Konstrukts wurden über ein 15 %iges Tris-Glycin-SDS-Gel getrennt (A). In jeder Spur ist eine prominente Bande erkennbar. Je 1 μM PrP wurde über RP-HPLC analysiert (B). In jedem Chromatogramm ist jeweils ein Peak nach 22 - 23 min erkennbar. Alle PrP-Konstrukte weisen einen hohen Reinheitsgrad auf.

3.4 Pufferoptimierung zur Oligomerisierung von A β

Die Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) ist eine Methode zur Trennung von verschiedenen Molekülen, in unserem Falle Proteinen und Proteinkomplexen, nach ihrer Dichte und Form. An dem Institut für Physikalische Biologie (HHU Düsseldorf) ist die DGZ mit Iodixanol zur Trennung verschiedener A β -Spezies etabliert. Im Jahr 2015 erschien eine Publikation von Brener et al. über einen Assay, genannt QIAD (*quantitative determination of interference with A β aggregate size distribution*) [128], der eine Quantifizierung von A β -Spezies verschiedener Größen erlaubt und somit das Potential eines möglichen Wirkstoffs gegen A β bestimmen kann.

Basierend auf dem QIAD Assay sollte die Methode in dieser Arbeit insofern angepasst werden, dass neben A β auch alle PrP-Varianten quantifiziert werden können, um final die Stöchiometrie zwischen A β und PrP zu bestimmen. Hierbei musste zunächst folgendes Hindernis überwunden werden: Für die Oligomerisierung von A β wird Phosphatpuffer verwendet. Dieser ist jedoch nicht für das Arbeiten mit dem Prion-Protein geeignet, da Phosphatpuffer verwendet wird, um PrP(23-144) zu fibrillieren [52, 147], was für die vorliegende Arbeit jedoch unerwünscht ist. Folglich musste ein Puffersystem gefunden werden, das gleichzeitig für die Oligomerisierung von A β geeignet ist, das Prion-Protein aber löslich bleibt. Hierbei bestand die größere Herausforderung darin einen Puffer zu finden, in dem ein ähnliches Aggregationsverhalten von A β erzielt wird wie in Phosphatpuffer.

Hierfür wurden die Puffersubstanzen (10 mM, pH 7,4) Tris-HCl, Bis-Tris Propan, Tricin, Bis-Tris, Glycylglycin, Bicin, HEPES (pH 7,6) und auch Natriumphosphat (NaPi) als Kontrolle untersucht. Jeweils 36 μ g HFIP-vorbehandeltes, monomeres A β wurde in 100 μ l der Puffer gelöst, für 4 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert und entstandene A β -Spezies mittels Iodixanol-DGZ (siehe 2.2.20) aufgetrennt. Alle erhaltenen Fraktionen wurden mittels analytischer RP-HPLC untersucht (Abb. 3.7). Im Idealfall sollen möglichst viele A β -Oligomere, hauptsächlich zu sehen in den Fraktionen 4 bis 6, gebildet werden, der Gehalt an hochmolekularen Aggregaten und A β -Fibrillen aber so gering wie möglich sein (Fraktionen 11 bis 15).

Im Falle von Bis-Tris (gelb) und HEPES (hellblau) ist zu erkennen, dass insbesondere in den Fraktionen 11 und 12, in denen entweder A β -Fibrillen oder ungelöstes A β gefunden werden, viel A β nachgewiesen werden konnte, weshalb diese Puffer ausscheiden. Bis-Tris Propan (blau), Tricin (violett), Glycylglycin (dunkelblau) und Bicin (orange) zeigen eine weite Verteilung und lediglich geringe Mengen von A β über den gesamten Gradienten auf, weshalb diese Puffer ebenfalls ungeeignet sind. Lediglich mit Tris-HCl (rot) wird ein ähnliches Verteilungsmuster von A β

im Gradienten erhalten wie mit NaPi (schwarz). Aus diesen Gründen wurde für alle weiteren Versuche Tris-HCl, pH 7,4 verwendet. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass dieses Puffersystem ebenfalls für alle PrP-Konstrukte geeignet ist (siehe Kapitel 3.6).

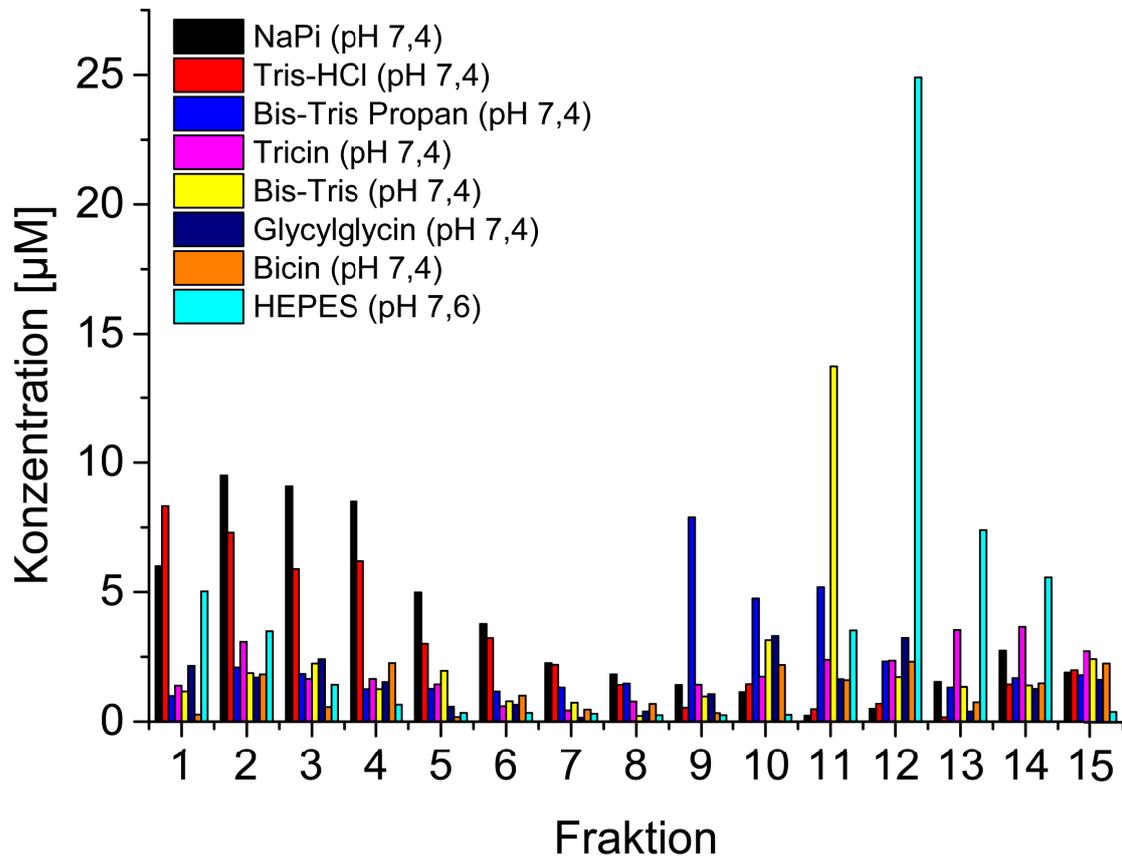


Abbildung 3.7: A β -Verteilung in einem Iodixanolgradienten bei Verwendung verschiedener Puffersysteme. Je 36 μg A β wurden in 100 μl der folgenden Puffer (10 mM, pH 7,4, für HEPES: pH 7,6) inkubiert, mittels DGZ getrennt und via RP-HPLC analysiert: Natriumphosphat (NaPi, schwarz), Tris-HCl (rot), Bis-Tris Propan (blau), Tricin (violett), Bis-Tris (gelb), Glycylglycin (dunkelblau), Bicin (orange), HEPES (hellblau). Mit dem Puffer Tris-HCl wird eine ähnliche A β -Verteilung -und somit ein ähnliches Aggregationsverhalten- erzielt wie mit dem sonst verwendeten NaPi-Puffer.

3.5 Anpassung des QIAD Assays und DGZ von Standardproteinen

Nachdem ein geeigneter Puffer für die weiteren Arbeitsschritte gefunden werden konnte, musste auch der Dichtegradient angepasst werden. Iodixanol zeigt einen

breiten Absorptionspeak in den RP-HPLC-Chromatogrammen (Abb. 3.8 A), welcher insbesondere bei der Analyse von mehreren Komponenten störend ist. Da in dieser Arbeit neben A β auch verschiedene PrP-Konstrukte sowie D-Peptide quantifiziert werden sollen, ist die Verwendung von Iodixanol als Dichtegradientenmaterial ungeeignet. Insbesondere die D-Peptide würden zusammen mit dem Iodixanol von der HPLC-Säule eluieren, was eine Auswertung der Peptide unmöglich macht. Somit wurde das Dichtegradientenmaterial Iodixanol durch Saccharose substituiert. Dies wurde von Luis Macorano im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt und etabliert [129]. Ebenfalls wurde der HPLC-Gradient verändert, auf 10 - 40 % Acetonitril, 0,1 % TFA innerhalb von 25 min, statt zuvor isokratisch bei 30 % für 16 min, um die verschiedenen Substanzen zu trennen (Abb. 3.8).

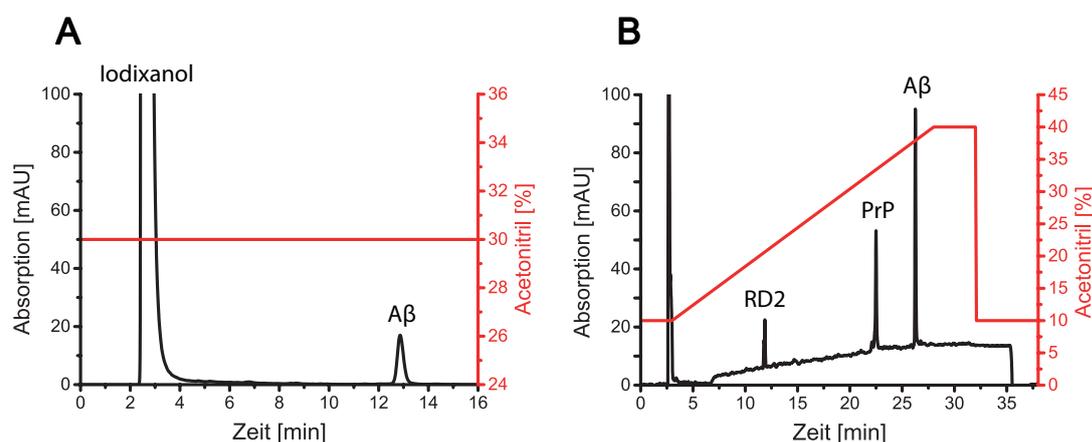


Abbildung 3.8: Vergleich der RP-HPLC-Chromatogramme einer Fraktion nach Iodixanol-DGZ und Saccharose-DGZ. Das Dichtegradientenmaterial Iodixanol resultiert in einem ca. 2 min langen Absorptionspeak. Der HPLC-Lauf erfolgte hierbei isokratisch bei 30 % Acetonitril, 0,1 % TFA (A). Bei Verwendung von Saccharose als Dichtegradientenmaterial ist das breite Signal nicht vorhanden. Alle Analyten (A β , PrP (hier: PrP(23-144)), D-Peptide (hier: RD2-FITC)) können durch einen 10 - 40 %igen Acetonitrilgradienten getrennt werden (B).

Gezeigt sind die dritte Fraktion eines Iodixanolgradienten (Abb. 3.8 A) sowie die elfte Fraktion eines Saccharosegradienten (Abb. 3.8 B). Das Iodixanol eluiert auch bei geringen Konzentrationen (gezeigt sind in etwa 5 - 10 %) in einem breiten Peak nach ca. 2 - 4 min von der Säule, das A β eluiert nach ca. 13 min. Mit Saccharose bleibt dieses breite Signal aus; zudem können mit dem 10 - 40 %igen Acetonitrilgradienten alle Komponenten, also A β , PrP und D-Peptide optimal getrennt werden. Beispielhaft dargestellt sind -neben A β (1-42)- PrP(23-144) und das D-Peptid RD2-FITC. Die Retentionszeiten der anderen PrP-Konstrukte -mit Ausnahme von

PrP(23-111 Δ 41-94), welches nach ca. 9 min eluiert- und der anderen D-Peptide sind analog zu den hier aufgeführten.

Zur Kalibrierung des Saccharosegradienten und zur Abschätzung der Größe aller auftretenden Proteinaggregate der folgenden Experimente (siehe Kapitel 3.6.3 - 3.9) wurden die folgenden Standardproteine eines *Gel Filtration HMW Calibration Kit* von GE untersucht: Ovalbumin, Conalbumin, Aldolase, Apoferritin und Thyroglobulin. Die Fraktionen jedes Gradienten wurden mittels SDS-PAGE untersucht und anhand der Verteilung der oben genannten Proteine konnte ein Übersichtsbild erstellt werden (Abb. 3.9). Hier ist zu erkennen, dass das größte Referenzprotein, Thyroglobulin, mit einem Molekulargewicht von 669 kDa bis einschließlich Fraktion 10 gefunden werden kann. Alles, was in höheren Fraktionen nachgewiesen werden kann, sollte folglich größer als ungefähr 670 kDa sein.

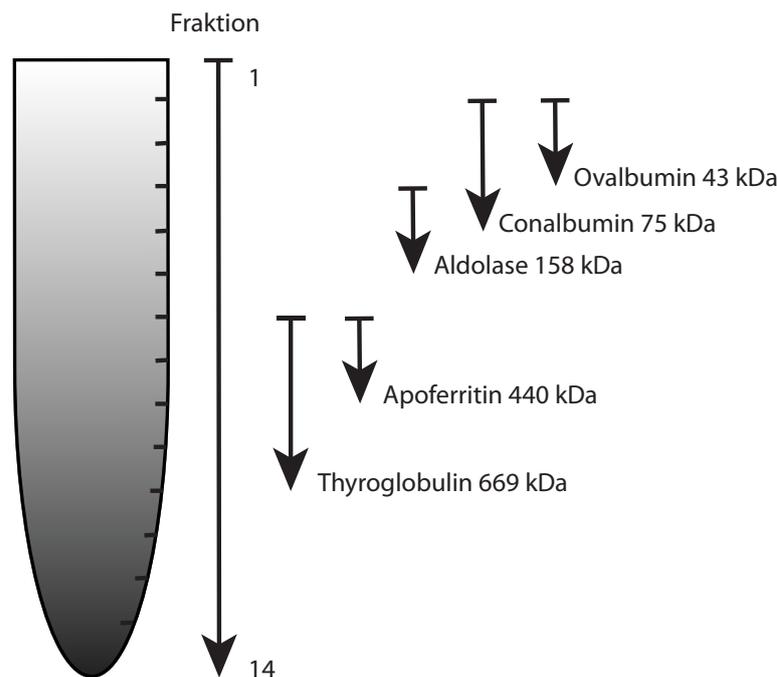


Abbildung 3.9: Verteilung von Standardproteinen in einem Saccharosedichte-Gradienten. Verteilung der Proteine Ovalbumin, Conalbumin, Aldolase, Apoferritin und Thyroglobulin nach Saccharose-DGZ. Die Untersuchung dieser Standardproteine dient der Kalibrierung des Gradienten.

3.6 Charakterisierung der Ausgangsmaterialien

Bevor die Interaktion zwischen A β und PrP untersucht werden konnte, wurden A β und PrP zunächst einzeln über unterschiedliche Methoden charakterisiert. Nachfolgend sind die verschiedenen PrP-Konstrukte dargestellt, welche in dieser Arbeit analysiert wurden (siehe Abb. 3.10). Sowohl das Volllängenkonstrukt PrP(23-230) als auch das N-terminale PrP(23-144) beinhalten zum einen beide Bindestellen für A β -Oligomere (AS 23 - 27 und AS 95 - 110 [57, 59–62], Abb. 3.10 blaue Kästen) und zum anderen die Octarepeat-Region (Abb. 3.10, gelber Kasten, OR). Dem C-terminalen PrP(90-230) fehlen hingegen die vordere A β -Bindestelle (AS 23 - 27) sowie die Octarepeats. PrP(23-111 Δ 41-94), das kleinste untersuchte Prion-Konstrukt dieser Arbeit, besteht lediglich aus 35 AS und beinhaltet beide A β -Bindestellen (Abb. 3.10, unten).

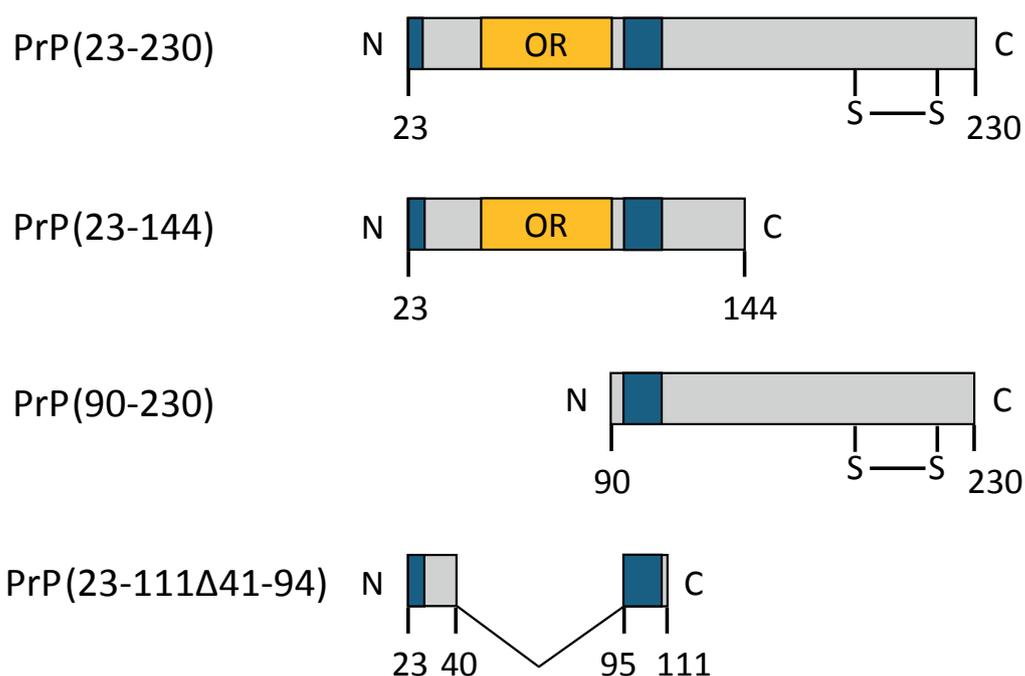


Abbildung 3.10: Schema der in dieser Arbeit verwendeten PrP-Konstrukte. Das Volllängen-PrP, PrP(23-230), und das N-terminale PrP(23-144) besitzen beide A β -Bindestellen (blaue Kästen) sowie die Octarepeats (gelber Kasten, OR). Das C-terminale PrP(90-230) beinhaltet nur die hintere A β -Bindestelle und PrP(23-111 Δ 41-94) enthält beide A β -Bindestellen, aber keine Octarepeats. Innerhalb von PrP(23-230) und PrP(90-230) befindet sich eine Disulfidbrücke.

3.6.1 Analyse der PrP-Konstrukte über Circular dichroismus (CD)

Zur Untersuchung der Sekundärstrukturelemente wurden je 6 μM PrP(23-230), PrP(23-144) und PrP(90-230) in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 über Circular dichroismus (CD) analysiert (siehe Abb. 3.11). Für PrP(23-230) (Abb. 3.11 schwarz) und PrP(90-230) (Abb. 3.11 blau) wurden Spektren erhalten, die zeigen, dass beide Proteine überwiegend α -helikal gefaltet sind. Diese Ergebnisse entsprechen den Erwartungen, da in der Literatur gezeigt wurde, dass das PrP ab AS 125 - 228 in einer überwiegend α -helikalen Struktur vorliegt und lediglich ein kurzes β -Faltblatt beinhaltet [40], sofern das PrP nicht in der infektiösen PrP^{Sc}-Form vorliegt.

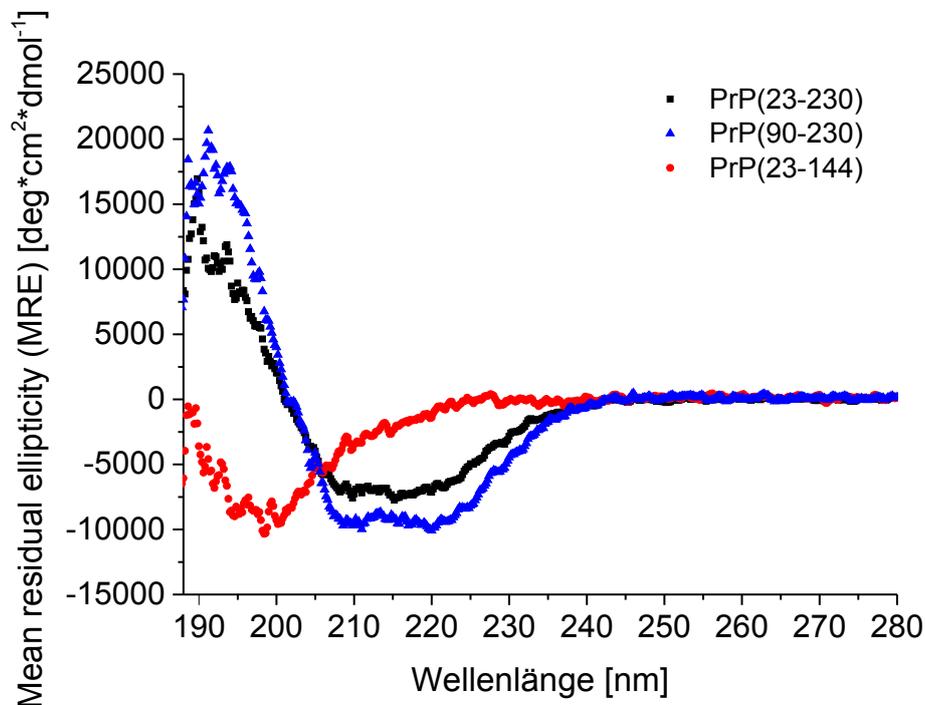


Abbildung 3.11: CD-Spektren von PrP(23-230), PrP(23-144) und PrP(90-230). Je 6 μM der gereinigten PrP-Varianten wurden in 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 untersucht. PrP(23-230) sowie PrP(90-230) weisen eine überwiegend α -helikale Struktur auf, während PrP(23-144) ungefaltet vorliegt.

PrP(23-144), welches dem flexiblen N-Terminus des PrPs entspricht, ist hingegen -wie angenommen- ungefaltet. Dieses Ergebnis zeigt, dass PrP(23-144) nicht zu β -faltblattthaltigen Fibrillen aggregiert ist, was es potentiell könnte (vgl. [51, 147]), sondern unter den eingesetzten Bedingungen löslich bleibt.

3.6.2 Analyse von PrP(23-230) und PrP(23-144) über NMR

Die beiden Hauptproteine dieser Arbeit, PrP(23-230) und PrP(23-144), wurden über *liquid state Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) untersucht (Spektren aufgenommen von Philipp Neudecker), um einen Einblick bezüglich struktureller Eigenschaften zu erhalten. Zunächst wurde PrP(23-230) analysiert (Abb. 3.12). Gezeigt sind ein ^1H - ^{15}N *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC)-Spektrum von ca. 100 μM PrP(23-230) Met¹²⁹ in 10 mM Tris-HCl und 10 % D₂O, pH 6,0 bei 20 °C und 900 MHz (Abb. 3.12 A) sowie eine Überlagerung der HSQC-Spektren von dem zuvor genannten und ca. 200 μM PrP(23-230) Met¹²⁹ in 10 mM Natriumacetat und 10 % D₂O, pH 4,5 bei 20 °C und 900 MHz (Abb. 3.12 B).

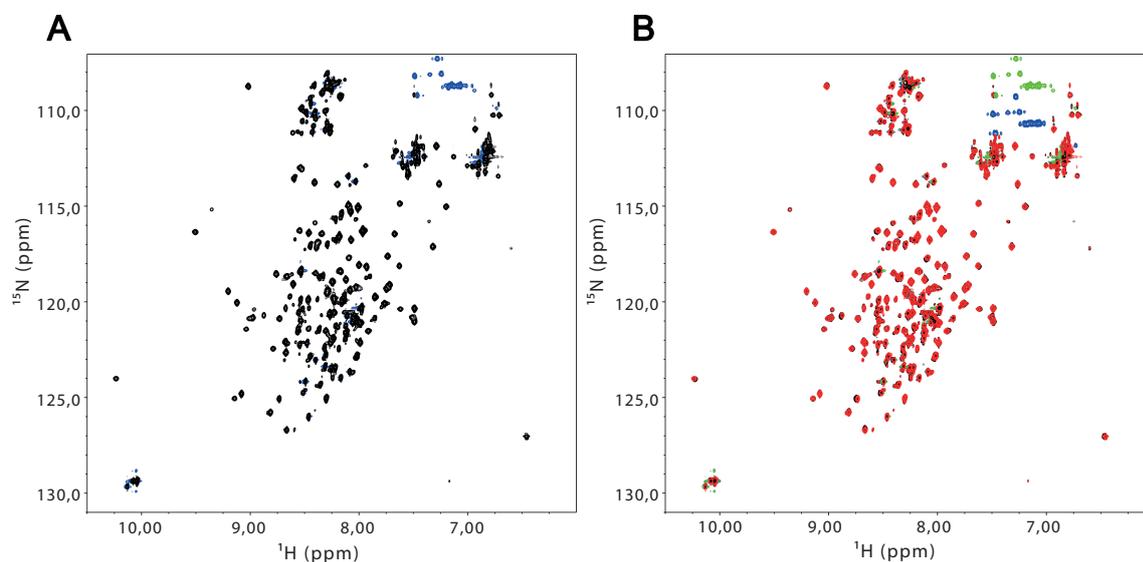


Abbildung 3.12: ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren von PrP(23-230). Spektrum von ca. 100 μM PrP(23-230) Met¹²⁹ in 10 mM Tris-HCl und 10 % D₂O, pH 6,0 bei 20 °C und 900 MHz (A), sowie eine Überlagerung von A (B, rot, grün) mit 200 μM PrP(23-230) Met¹²⁹ in 10 mM Natriumacetat und 10 % D₂O, pH 4,5 bei 20 °C und 900 MHz (B, schwarz, blau). Bei den Signalen der Argininseitenketten (oben rechts: blau, grün) kommt es zu einer Verschiebung der Signale. Die chemischen Verschiebungen sind gleich derer aus der Literatur [40] und PrP(23-230) folglich nativ gefaltet.

Mit Ausnahme der Signale, die von den Aminosäuren der Octarepeat-Region verursacht werden, wurden hochaufgelöste Spektren erhalten. Eine Zuordnung der Signale (außer der Octarepeats) ist anhand bereits hinterlegter Zuordnungen durch Zahn et al. möglich [40]. Die Signale innerhalb der Octarepeats weisen durch eine sehr ähnliche chemische Umgebung ähnliche chemische Verschiebungen auf und können somit nicht unterschieden und zugeordnet werden. Dies betrifft Glycine, Tryptophane, Histidine und Glutamine.

Der C-terminale Bereich des PrP(23-230) liegt gefaltet vor, wie in der Literatur bereits beschrieben [40]. Durch Veränderung des pH-Wertes kommt es zur Verschiebung einiger Signale. Insbesondere bei den Argininseitenketten (Abb. 3.12 blau und grün) ist die Verschiebung deutlich erkennbar. Diese Signale sind in anderen Farben dargestellt, da sie außerhalb des aufgenommenen Bereiches (in der ^{15}N -Dimension) liegen und somit in dem Spektrum als negativ erscheinen. Festzuhalten bleibt, dass das PrP(23-230) unter den hier untersuchten Bedingungen unabhängig vom pH-Wert löslich und „richtig“ gefaltet vorliegt. Dies ist Grundvoraussetzung für die Erforschung der Interaktion zwischen PrP(23-230) und A β (1-42).

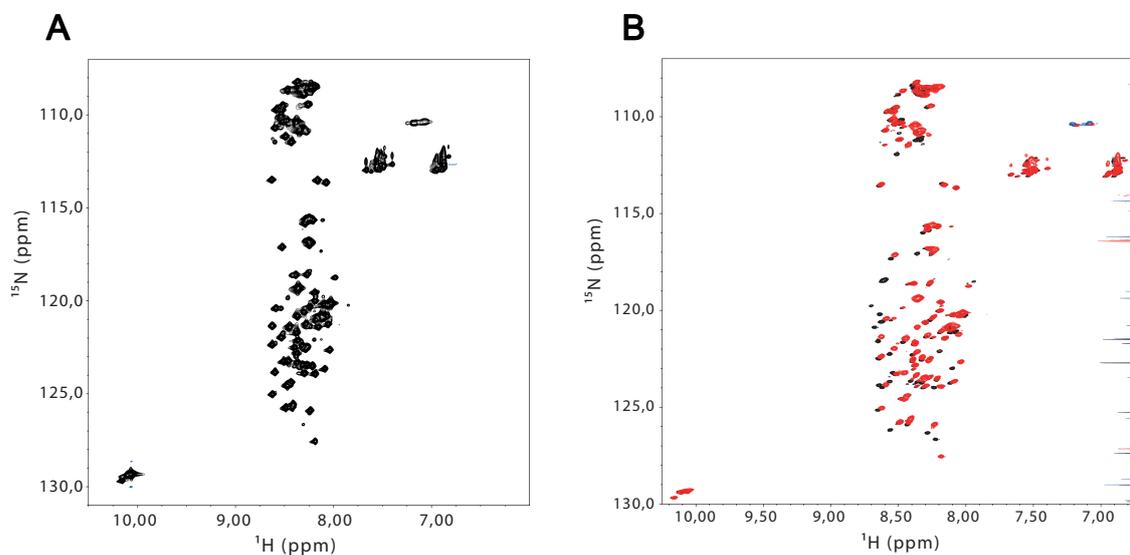


Abbildung 3.13: ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren von PrP(23-144) bei unterschiedlichen pH-Werten. ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum von ca. 85 μM PrP(23-144) Met¹²⁹ in 30 mM HEPES und 10 % D_2O , pH 6,5 bei 5 °C und 700 MHz (A) und Überlagerung der ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren von 360 μM PrP(23-144) in 50 mM HEPES und 10 % D_2O , pH 7,0 bei 5 °C und 800 MHz (B, rot) mit 305 μM PrP(23-144) in 50 mM Natriumacetat und 10 % D_2O , pH 4,5 bei 5 °C und 600 MHz (B, schwarz). Die Änderung des pH-Wertes resultiert in der Verschiebung einiger Resonanzen; PrP(23-144) bleibt aber bei den untersuchten pH-Werten ungefaltet.

Ebenfalls wurde PrP(23-144) mittels NMR untersucht. Hierbei wurden ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren bei verschiedenen pH-Werten und unterschiedlichen Temperaturen aufgenommen. Dargestellt ist ein ^1H - ^{15}N HSQC-Spektrum von ca. 85 μM PrP(23-144) Met¹²⁹ in 30 mM HEPES und 10 % D_2O , pH 6,5 bei 5 °C und 700 MHz (Abb. 3.13 A). Anhand der deutlich niedrigeren Verteilung der Resonanzen in der ^1H -Dimension (verglichen mit den PrP(23-230) ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren), ist zu erkennen, dass das PrP(23-144) nicht gefaltet ist (Abb. 3.13 A). Auch im Falle von PrP(23-144) resultieren die Aminosäuren der Octarepeats in einer Vielzahl über-

lappender Signale, die nicht voneinander unterscheidbar sind. Abbildung 3.13 B zeigt die Überlagerung zweier ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren von PrP(23-144): zum einen von ca. 360 μM PrP(23-144) in 50 mM HEPES und 10 % D_2O , pH 7,0 bei 5 °C und 800 MHz (Abb. 3.13 B rot), zum anderen von ca. 305 μM PrP(23-144) in 50 mM Natriumacetat und 10 % D_2O , pH 4,5 bei 5 °C und 600 MHz (Abb. 3.13 B schwarz). Der pH-Unterschied resultiert in einer teilweise deutlichen Verschiebung einiger Resonanzen, insbesondere der Histidine. PrP(23-144) bleibt in beiden Fällen über mehrere Tage stabil, löslich und zeigt keine Bildung von β -faltblatthaltigen Fibrillen. Im Gegensatz zur Arbeitsgruppe um W. K. Surewicz und C. P. Jaronec [51–56] gibt es keinen Hinweis auf eine Konversion zu Fibrillen. Möglicherweise liegt dies daran, dass in der vorliegenden Arbeit kein phosphathaltiger Puffer verwendet wurde.

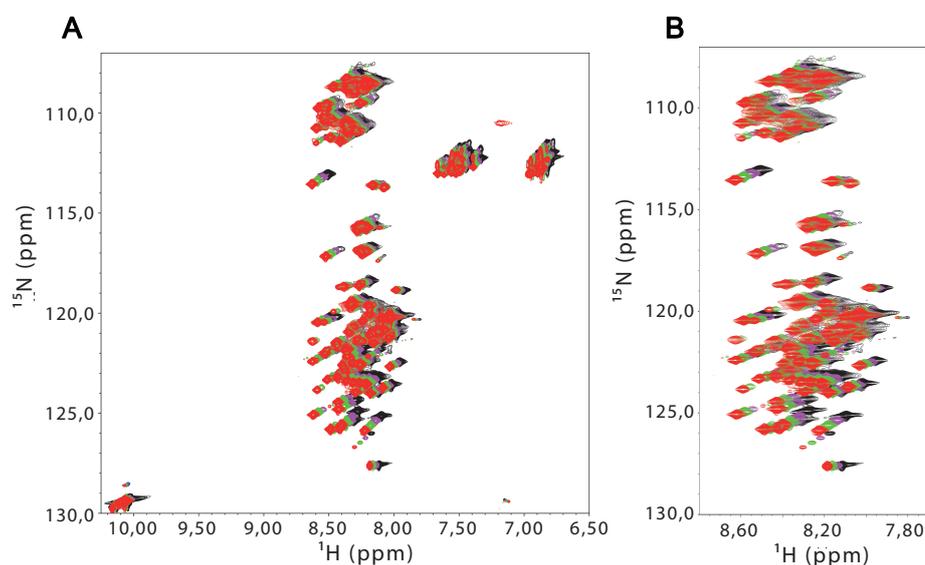


Abbildung 3.14: ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren von PrP(23-144) bei verschiedenen Temperaturen. Gezeigt ist jeweils ca. 85 μM PrP(23-144) Met¹²⁹ in 50 mM HEPES und 10 % D_2O , pH 7,0 bei 600 MHz bei 5 °C (rot), 10 °C (grün), 15 °C (magenta) oder 20 °C (schwarz). Erhöhung der Temperatur führt zur Signalverbreiterung und zum Verschwinden mancher Resonanzen. Unabhängig von der Temperatur liegt PrP(23-144) in allen Fällen nicht gefaltet vor. B ist ein Zoom von A. Vergleiche auch die Temperaturreihe bei pH 4,5 gezeigt in [148].

Das Verhalten einer Probe mit ca. 85 μM PrP(23-144) Met¹²⁹ in 50 mM HEPES und 10 % D_2O , pH 7,0 bei 600 MHz wurde bei unterschiedlichen Temperaturen charakterisiert (Abb. 3.14). Aufgenommen wurden ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren bei 5 °C (Abb. 3.14 rot), 10 °C (Abb. 3.14 grün), 15 °C (Abb. 3.14 magenta) und 20 °C (Abb. 3.14 schwarz). Bedingt durch die Temperatur kommt es zur Verschiebung der Resonanzen und zu einer Signalverbreiterung und -abnahme bei höheren Temperaturen. So sind manche Resonanzen beispielsweise nur bei 5 °C oder 10 °C zu erkennen

(z.B. Abb. 3.14 B links). Dies lässt sich durch den Austausch der Amidprotonen mit dem umgebenden Wasser erklären. Dieser erfolgt bei höheren Temperaturen umso schneller und ist insbesondere bei ungefalteten Proteinen zu beobachten, da die Protonen hier nicht durch Wasserstoffbrückenbindungen in Sekundärstrukturelementen stabilisiert werden. Dieser Effekt ist ebenfalls pH-Wert abhängig. Folglich werden bei niedrigerem pH-Wert und niedrigeren Temperaturen Spektren mit höherer Qualität erhalten. Da in dieser Arbeit die Analysen und Interaktionen von A β mit PrP bei pH 7,4 und bei Raumtemperatur erfolgen, ist es wichtig die ^1H - ^{15}N HSQC-Spektren unter oder nahezu diesen Bedingungen aufzunehmen, obwohl die Qualität geringer ist, um zu überprüfen wie sich das PrP(23-144) bei diesen Bedingungen verhält. Trotz einiger Verschiebungen und Signalverbreiterungen ist zu erkennen, dass PrP(23-144) bei neutralem pH-Wert und 20 °C ungefaltet vorliegt, wie es bereits bei den CD-Messungen gezeigt werden konnte (siehe 3.6.1).

3.6.3 Verteilung von A β (1-42)-Oligomeren im Dichtegradienten

Das Hauptziel dieser Arbeit besteht darin die A β -PrP-Interaktion zu charakterisieren. Hierfür wurde ein angepasster QIAD Assay (siehe 2.2.19), also eine Verknüpfung aus einer Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) mit Saccharose als Gradientenmaterial und anschließender quantitativer RP-HPLC-Analyse, verwendet. Zusätzlich wurde jede einzelne DGZ-Fraktion mittels Tris-Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt (Abb. 3.15).

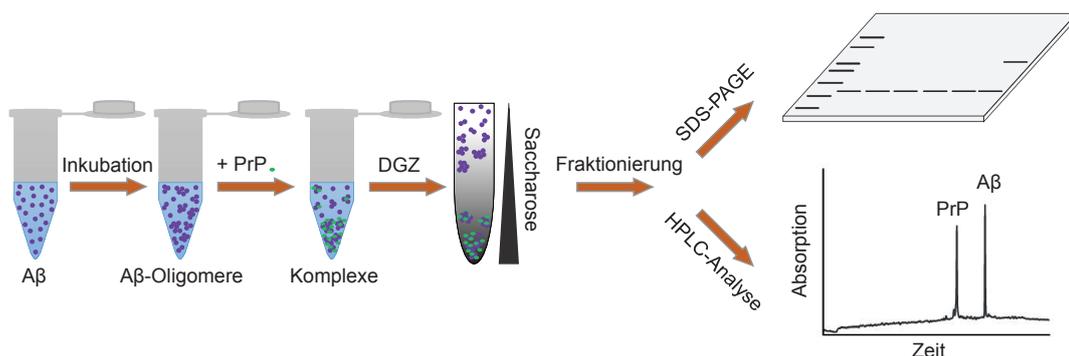


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung des angepassten QIAD Assays. Zur Charakterisierung der A β -PrP-Interaktion wurde A β (1-42) zunächst für 2 h unter Schütteln inkubiert, um A β -Oligomere zu generieren. Zu diesen wurde eines der in Abb. 3.10 dargestellten PrP-Konstrukte hinzugefügt. Nach weiterer 30 minütiger Inkubation wurde die Probe über einen Saccharosedichtegradienten aufgetrennt, fraktioniert und mittels SDS-PAGE und quantitativer RP-HPLC untersucht.

Für die Probenvorbereitung vor der DGZ wurde das A β für 2 h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert bevor eines der PrP-Konstrukte für weitere 30 min hinzugefügt wurde. Vor der gemeinsamen Untersuchung von A β mit PrP mussten zunächst alle Ausgangsmaterialien jeweils allein im Dichtegradienten charakterisiert werden.

Zunächst wurde A β (1-42) analysiert. Dazu wurden 100 μ l einer 80 μ M A β (1-42) Lösung für 2,5 h inkubiert und wie oben beschrieben untersucht. Das mit Silber gefärbte Gel und das dazugehörige Histogramm nach quantitativer RP-HPLC-Analytik sind in Abbildung 3.16 gezeigt. Es wird ein breites Spektrum verschiedener A β -Spezies unterschiedlicher Größen erhalten, die sich über fast den gesamten Dichtegradienten verteilen. Die A β (1-42)-Monomere sind hierbei hauptsächlich in der ersten Fraktion zu finden. Kleinere Oligomere in den Fraktionen 2 und 3 und etwas größere Oligomere, die in dieser Arbeit von Interesse sind, werden überwiegend in den Fraktionen 4 bis 6 gefunden (vgl. auch hierzu [118, 128]). Sehr große Oligomere bis protofibrilläre Strukturen sind ab Fraktion 7 vorhanden und Fibrillen ab ca. Fraktion 11.

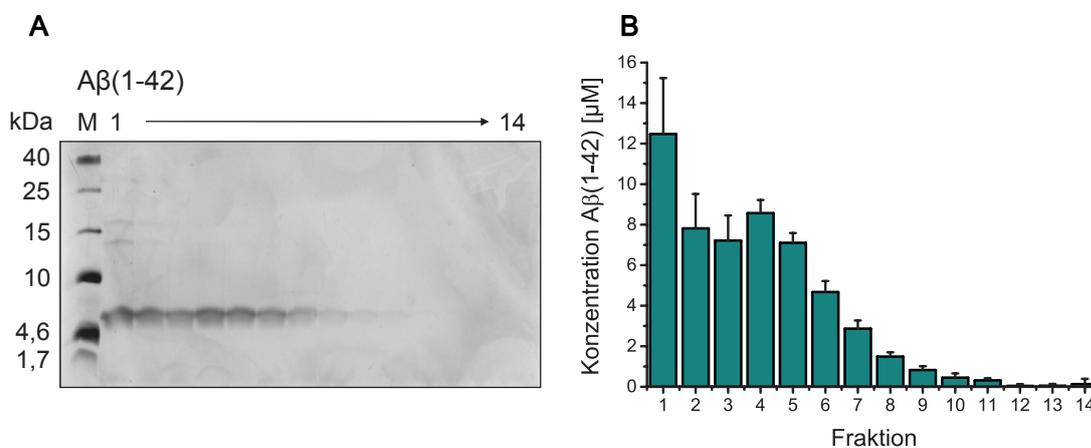


Abbildung 3.16: Verteilung von inkubiertem A β im Saccharosedichtegradienten. Die A β -Verteilung kann mittels Tris-Tricin-SDS-PAGE visualisiert (A) sowie mittels RP-HPLC quantifiziert werden (B). A β läuft im Gel knapp oberhalb der 4,6 kDa Markerbande. Die Fraktionen sind von 1 (kleine Strukturen, oben im Gradienten) bis 14 (große Strukturen und Fibrillen, unten im Gradienten) von links nach rechts aufgetragen. Von besonderem Interesse sind die A β (1-42)-Oligomere in den Fraktionen 4 - 6.

Die Inkubationszeit von 2,5 h ist ideal, um genügend der Oligomere in den Fraktionen 4 bis 6 zu generieren (ca. 35 - 40 %), große fibrilläre Strukturen aber noch

ausbleiben. Da für die Analyse der A β -PrP-Interaktion insbesondere die Fraktionen 11 bis 14 von Interesse sind (siehe Kapitel 3.7.1 - 3.7.4), ist es wichtig, dass bei der Inkubation von A β allein so wenig A β wie möglich in diesen Fraktionen erhalten wird, um keinen Hintergrund zu haben, was hier mit den gewählten Bedingungen der Fall ist.

3.6.4 Verteilung der verschiedenen PrP-Konstrukte im Dichtegradienten

Ebenfalls die in dieser Arbeit verwendeten PrP-Konstrukte PrP(23-230), PrP(23-144), PrP(90-230) und PrP(23-111 Δ 41-94) wurden ohne die Zugabe von A β untersucht. Hierbei wurde für PrP(23-111 Δ 41-94) eine Ausgangskonzentration von 40 μ M verwendet, für alle anderen PrP-Konstrukte je 10 μ M. Der Grund für die höhere Konzentration im Falle von PrP(23-111 Δ 41-94) ist, dass dieses nur 35 AS lange Konstrukt bei einer Konzentration von 10 μ M nicht mittels SDS-PAGE und Silberfärbung visualisiert werden kann, trotz der hohen Sensitivität der Silberfärbung. Mit allen vier Konstrukten ist zu erkennen, dass sich die Hauptmenge in den oberen Fraktionen 1 bis 3, in denen kleinere Moleküle nachgewiesen werden, befindet (Abb. 3.17 A - D). Das lediglich 4 kDa große PrP(23-111 Δ 41-94) konnte ausschließlich in den ersten beiden Fraktionen nachgewiesen werden (Abb. 3.17 D). Bei den drei anderen Prion-Konstrukten ist eine Konzentrationsabnahme von Fraktion 1 bis 5 zu beobachten. Hier sind die Konstrukte mit 12 kDa (PrP(23-144)) bis 23 kDa (PrP(23-230)) größer, wodurch sich die Verteilung erklären lässt. Ebenfalls in den unteren Fraktionen 11 bis 14 konnte PrP, wenn auch nur in geringen Konzentrationen, nachgewiesen werden. Im Falle von PrP(23-144) (Abb. 3.17 B) ist dies nahe am Detektionslimit der HPLC und somit vernachlässigbar gering.

Ebenfalls bei PrP(90-230) (Abb. 3.17 C) ist die Konzentration an Prion in den unteren Fraktionen niedrig, mit Ausnahme von Fraktion 14. Hier wurde in manchen Versuchen entweder kein PrP(90-230) nachgewiesen oder bis zu 0,9 μ M, dargestellt durch den hohen Fehlerbalken. Bei dem Volllängenkonstrukt PrP(23-230) (Abb. 3.17 A) wurde in allen Messungen konstant 0,1 μ M bis maximal 0,4 μ M des Proteins in den Fraktionen 11 bis 14 nachgewiesen. Dies könnte möglicherweise durch mehrere Tau-Gefrierzyklen des Proteins zu erklären sein.

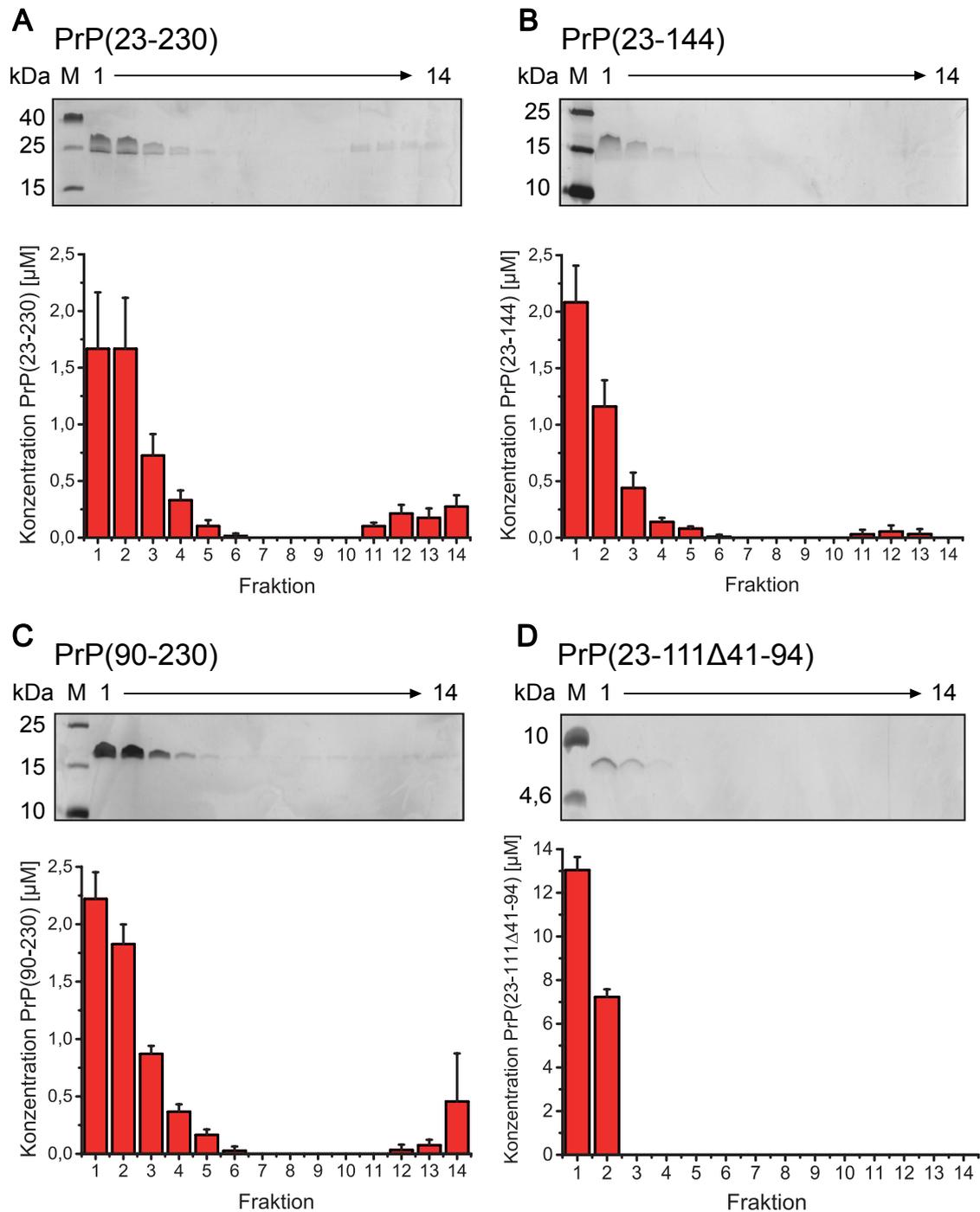


Abbildung 3.17: Verteilung aller PrP-Konstrukte im Saccharosedichtegradienten. Verteilung von PrP(23-230) (A), PrP(23-144) (B), PrP(90-230) (C) und PrP(23-111 Δ 41-94) (D) nach Tris-Tricin-SDS-PAGE und quantitativer RP-HPLC-Analyse. Bei A - C wurden jeweils 10 μ M PrP untersucht, bei D 40 μ M PrP. Die höchsten Konzentrationen wurden bei allen PrP-Konstrukten in den Fraktionen 1 - 3 nachgewiesen.

3.7 Charakterisierung der A β -PrP-Interaktion

Die unter Kapitel 3.6 beschriebene Charakterisierung der Ausgangsmaterialien hat gezeigt, dass alle PrP-Konstrukte löslich und nicht fibrillär vorliegen. Dies ist eine Grundvoraussetzung, damit die Interaktion von A β -Oligomeren mit löslichem PrP untersucht werden kann. Auch die A β -Inkubationszeit ist ideal, um Oligomere, aber keine Fibrillen zu generieren. Letztere würden ebenfalls die quantitative Charakterisierung der A β -PrP-Interaktion stören.

3.7.1 Verteilung von A β (1-42) mit PrP(23-230)

Nachdem A β (1-42) sowie alle PrP-Konstrukte jeweils einzeln untersucht wurden, konnte die Interaktion von A β mit PrP charakterisiert werden. Hierfür wurde das Volllängenkonstrukt PrP(23-230) als erstes charakterisiert. Nach Inkubation von 80 μ M A β (1-42) für 2 h wurde PrP(23-230) hinzugefügt und für weitere 30 min inkubiert. Insgesamt wurden vier verschiedene Konzentrationen analysiert: 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M und 20 μ M PrP(23-230). Mit steigender PrP-Konzentration konnte beobachtet werden, dass sich ein weißer Niederschlag in dem Reaktionsgefäß gebildet hat. Nach Saccharose-DGZ der Proben wurden alle erhaltenen DGZ-Fractionen mittels SDS-PAGE sowie RP-HPLC untersucht (Abb. 3.18).

Es ist zu erkennen, dass insbesondere die A β (1-42)-Konzentration in den Fraktionen 4 bis 8 mit zunehmender PrP-Zugabe abnimmt und bei einer Konzentration von 20 μ M PrP(23-230) in der Ausgangslösung in diesen Fraktionen gar nicht mehr nachweisbar ist (Abb. 3.18 D und E). Damit einhergehend ist eine Zunahme von A β in den Fraktionen 11 bis 14 zu beobachten (Abb. 3.18 A - E). Besonders in den Fraktionen 12 bis 14 können bei Zugabe von insgesamt 20 μ M PrP(23-230) A β -Konzentrationen von 20 μ M bis 40 μ M pro Fraktion erreicht werden (Abb. 3.18 E). Beim Vergleich mit der Verteilung von verschiedenen großen Standardproteinen im Saccharosedichtegradienten (Abb. 3.9) wird deutlich, dass sich hochmolekulare Strukturen im Megadaltonbereich aus A β (1-42) und PrP(23-230) gebildet haben müssen, nachfolgend Komplexe genannt.

Neben der Abnahme der A β -Oligomere in den Fraktionen 4 bis 6 kann auch eine A β -Abnahme in den Fraktionen 1 bis 3 beobachtet werden (Abb. 3.18 E). Diese lässt sich durch das Gleichgewicht zwischen A β -Monomeren und Oligomeren erklären; werden die Oligomere durch PrP-Zugabe aus dem Gleichgewicht genommen, bilden sich aus den Monomeren neue.

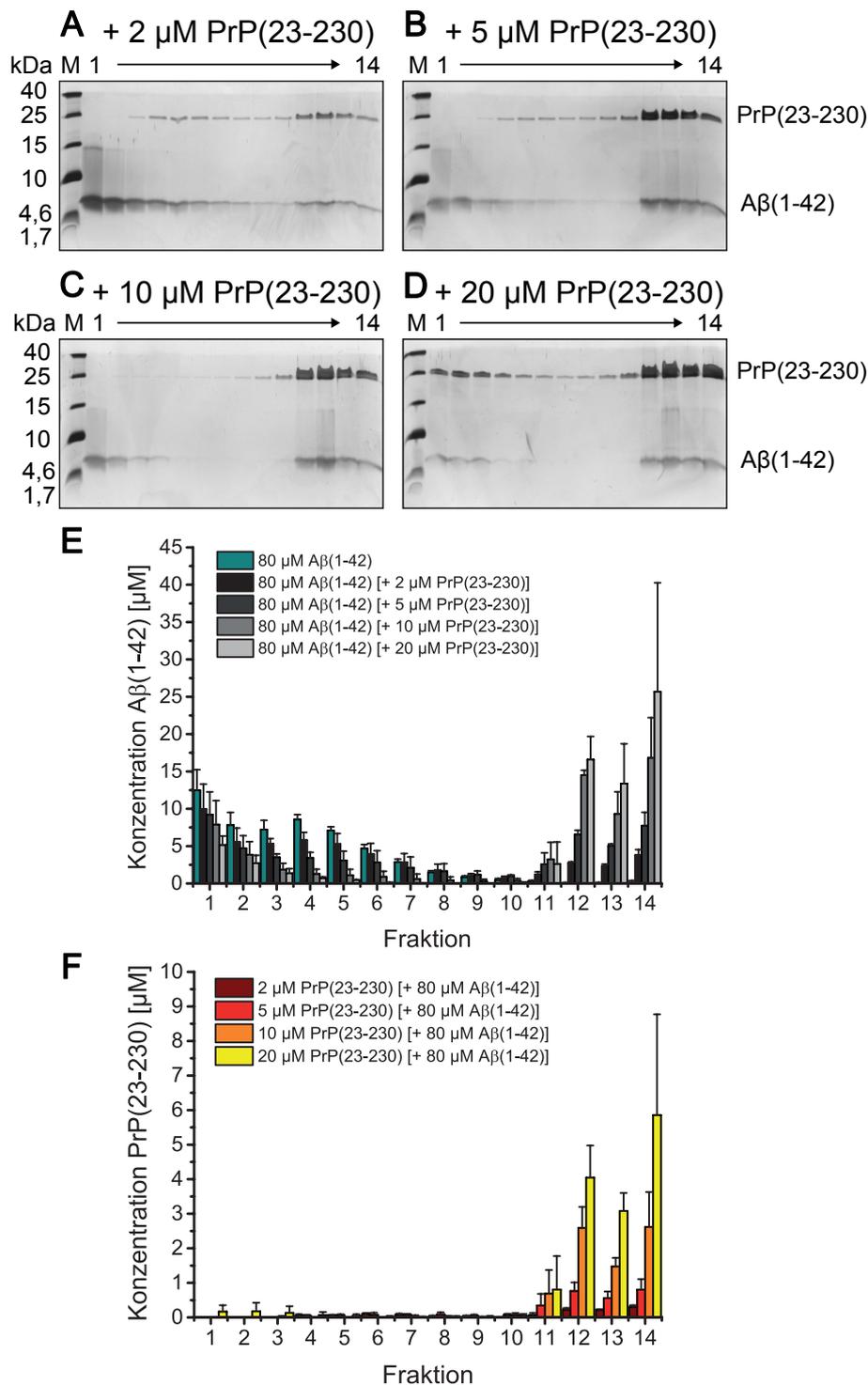


Abbildung 3.18: Verteilung von PrP(23-230) mit A β (1-42) im Saccharosedichte-gradienten. Verteilung von A β mit 2 μM (A), 5 μM (B), 10 μM (C) oder 20 μM PrP(23-230) (D), analysiert durch Tris-Tricin-SDS-PAGE. RP-HPLC-Analysen der A β -Verteilungen sind in E, PrP-Verteilungen in F dargestellt. Mit zunehmender PrP-Menge wird eine Abnahme der A β -Oligomere (Fraktionen 4 - 6) und eine A β -Zunahme in den Fraktionen 11 - 14 beobachtet. PrP(23-230) kann fast ausschließlich in den Fraktionen 11 - 14 nachgewiesen werden.

Bei Betrachtung der PrP-Verteilung ist zu erkennen, dass mit allen untersuchten PrP-Konzentrationen das meiste PrP ebenfalls in den Fraktionen 11 bis 14 nachgewiesen werden kann (Abb. 3.18 F). Dies ist ein deutlicher Unterschied verglichen mit der Kontrolle (Abb. 3.17 A), bei der PrP(23-230) hauptsächlich in den Fraktionen 1 bis 3 vorliegt. Nach 20 μ M PrP(23-230)-Zugabe liegen die Konzentrationen in den Fraktionen 11 bis 14 zwischen 4 μ M und 9 μ M. Zusätzlich können hier PrP-Banden in den oberen Fraktionen (ca. 1 bis 3) beobachtet werden (Abb. 3.18 D und F). Gleichzeitig ist in diesen Fraktionen ebenfalls A β enthalten. Dieses „Übrigbleiben“ von A β bestätigt, dass PrP die A β -Oligomere und nicht die Monomere bindet, sowie die Tatsache, dass PrP(23-230) bei einer eingesetzten Konzentration von 20 μ M im Überschuss vorliegt und die Bindung zwischen A β und PrP definiert ist.

Im Falle von 10 μ M PrP(23-230)-Zugabe werden erstmalig keine PrP-Banden in den Fraktionen 1 bis 9 erhalten, was ein Hinweis darauf ist, dass alles PrP an A β gebunden ist (Abb. 3.18 C). Nach Hinzufügen von 2 μ M bzw. 5 μ M PrP(23-230) zu A β -Oligomeren können schwache PrP-Banden in den mittleren Fraktionen 4 bis 10 beobachtet werden, die mit ebenfalls schwachen A β -Banden einhergehen (Abb. 3.18 A und B). Die Banden in diesem Bereich könnten durch die Bildung von zunächst kleineren Komplexen erklärt werden, welche sich durch Zugabe höherer PrP-Mengen zu den hochmolekularen Komplexen in den Fraktionen 11 bis 14 verknüpfen. Diese Annahme wird in dem Kapitel 3.7.6 genauer untersucht.

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass sich durch Zugabe von PrP(23-230) zu vorinkubiertem A β hochmolekulare Komplexe bilden, die mittels RP-HPLC quantifiziert werden können. Dies ermöglicht eine Berechnung der Stöchiometrien zwischen A β und PrP(23-230) innerhalb der Komplexe, welche dem Kapitel 3.7.5 zu entnehmen sind.

3.7.2 Verteilung von A β (1-42) mit PrP(23-144)

Es ist bekannt, dass die für die Bindung wichtigen Regionen für A β -Oligomere auf der PrP-Aminosäuresequenz in den Bereichen 23 - 27 und ca. 95 - 110 liegen [57, 59–62]. Ein PrP-Konstrukt, welches diese beiden Binderegionen enthält, ist das N-terminale PrP(23-144), welches auch häufig als Y145Stop Prion-Protein bezeichnet wird (vgl. Kapitel 1.4.3). Dieses C-terminal verkürzte Konstrukt wird mit einer Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom ähnlichen Krankheit assoziiert und soll hier ebenfalls untersucht werden. In dieser Arbeit ist es dabei von besonderem Interesse, ob mit diesem Konstrukt ähnliche Eigenschaften und A β /PrP-

Stöchiometrien erzielt werden können wie mit dem Vollängenkonstrukt PrP(23-230). Die Durchführung erfolgte analog zu den Versuchen mit PrP(23-230). Es wurden entweder 2 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM oder 60 μM PrP(23-144) zu jeweils 80 μM A β (1-42) hinzugefügt. Die Messung mit 60 μM wird hier nicht gezeigt, da sie der Untersuchung mit 40 μM PrP(23-144) sehr ähnlich ist; die Stöchiometrien dieser Messung werden aber in Kapitel 3.7.5 dargestellt und die Verteilung von A β und PrP(23-144) im Dichtegradienten ist dem Anhang zu entnehmen (Abb. 5.5). Hinzufügen von PrP(23-144) zu vorinkubiertem A β führte wie auch bei PrP(23-230) zu einer Trübung der Lösung, welche mit zunehmender PrP-Konzentration stärker war. Mit steigenden PrP(23-144)-Konzentrationen in der Ausgangslösung kann hauptsächlich eine A β -Abnahme in den Oligomer enthaltenden Fraktionen 4 bis 6 und eine A β -Zunahme in den Fraktionen 11 bis 14 nachgewiesen werden (Abb. 3.19). Hierbei werden Konzentrationen von 15 μM bis 25 μM A β in den unteren Fraktionen 11 bis 14 nach Hinzufügen von 10 μM oder 20 μM PrP(23-144) erhalten (Abb. 3.19 D, E und G). Eine Abnahme der A β -Monomere (Abb. 3.19 G) lässt sich -wie schon in Kapitel 3.7.1 erwähnt- durch das Gleichgewicht zwischen Monomeren und Oligomeren erklären. Mit Ausnahme der Probe, die 40 μM PrP(23-144) enthält, kann bei allen anderen Proben beobachtet werden, dass das PrP ausschließlich in den Fraktionen 11 bis 14 vorliegt (Abb. 3.19 B - F, H). Erst nach Hinzufügen von 40 μM PrP(23-144) werden ca. 10 % des PrP(23-144) in den oberen Gradientenfraktionen 1 bis 3 erhalten, da das PrP bei diesen Mengen im Überschuss vorliegt. Die PrP(23-144)-Konzentration in den Fraktionen 11 bis 14 liegt bei bis zu 22 μM . Nach Zugabe von 20 μM PrP(23-144) werden Werte von maximal 7 μM in den unteren Fraktionen erhalten (Abb. 3.19 H).

Höhere Fehlerbalken -insbesondere bei den Fraktionen 11 bis 14, in denen sich die Komplexe befinden- lassen sich durch die manuelle Fraktionierung der Dichtegradienten erklären. Hierbei passiert es, dass beispielsweise bei einem Experiment die größte Menge der Komplexe in Fraktion 12, beim nächsten Experiment aber in Fraktion 13 nachgewiesen wird. Deshalb liegt der Fokus auch nicht darauf, in welcher einzelnen Fraktion die A β -PrP-Komplexe nachgewiesen werden, sondern die Fraktionen 11 bis 14 werden als eine Einheit betrachtet und dies auch bei der Berechnung der Stöchiometrien so berücksichtigt (siehe Kapitel 3.7.5).

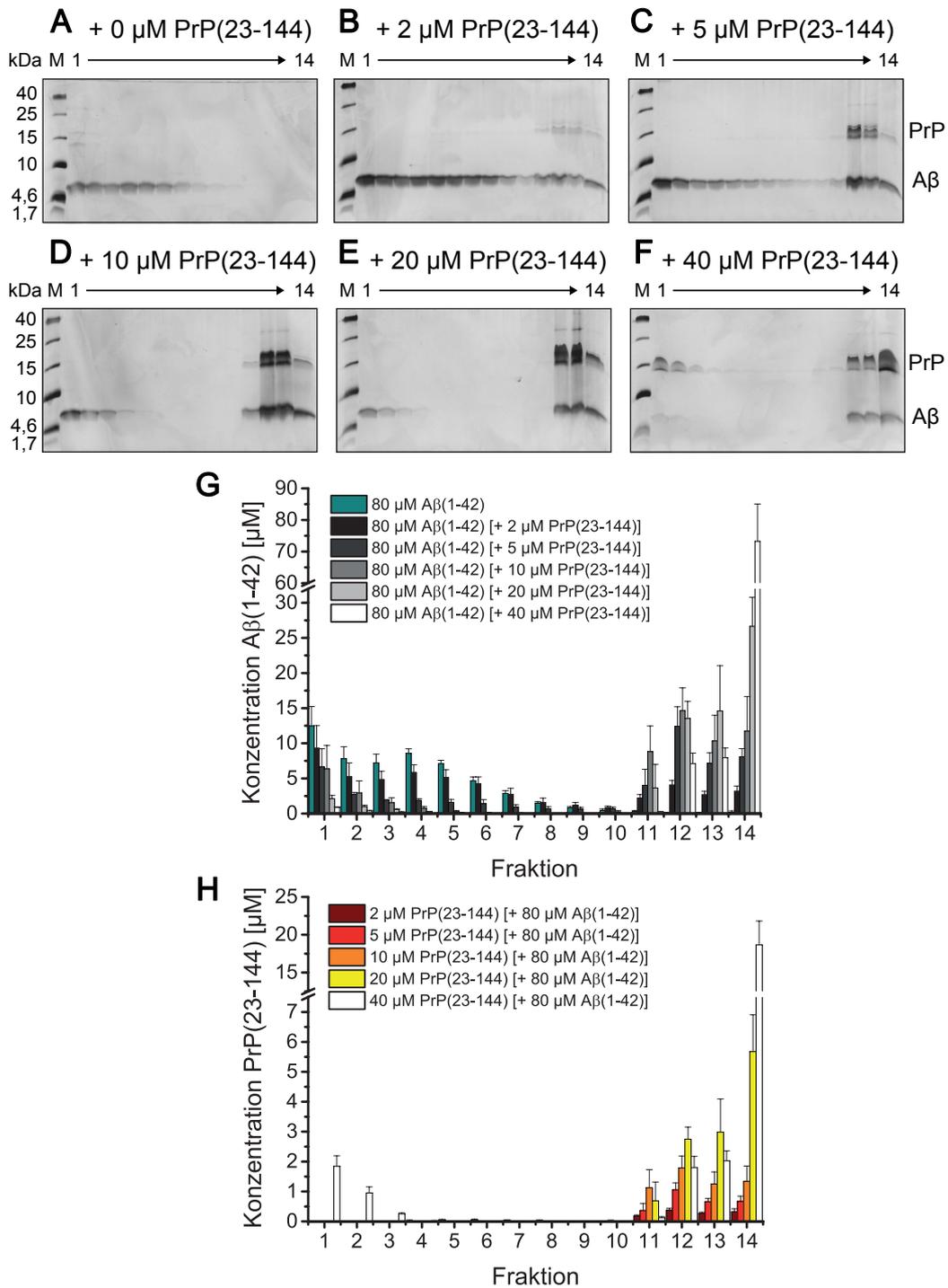


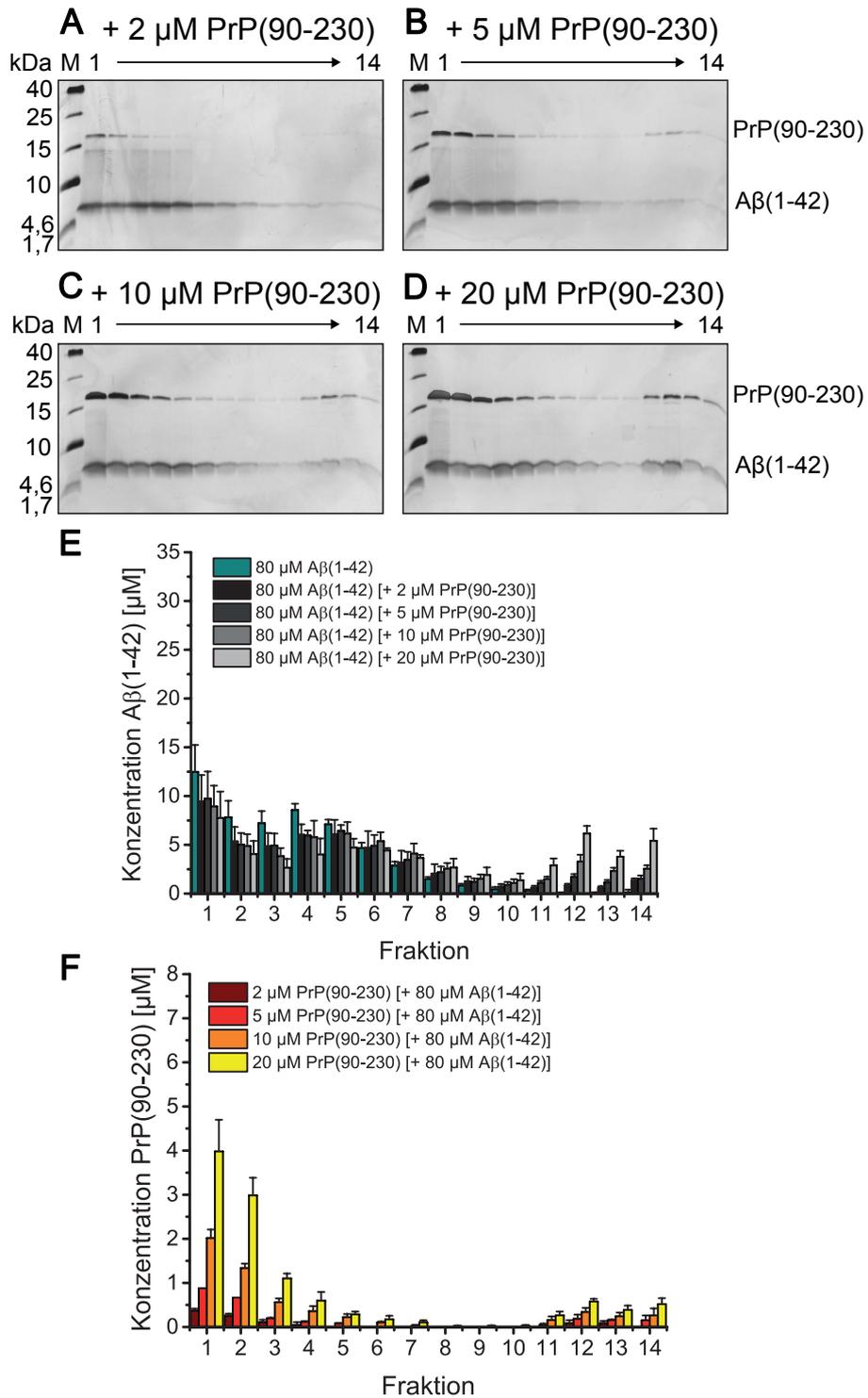
Abbildung 3.19: Verteilung von PrP(23-144) mit A β (1-42) im Saccharosedichtegradienten. Verteilung von A β allein (A) oder mit 2 μM (B), 5 μM (C), 10 μM (D), 20 μM (E) oder 40 μM PrP(23-144) (F), analysiert durch Tris-Tricin-SDS-PAGE. A β -Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen sind in G, PrP-Konzentrationen in H dargestellt. Mit zunehmender PrP-Menge wird eine Abnahme der A β -Oligomere (Fraktionen 4 - 6) und eine A β -Zunahme in den Fraktionen 11 - 14 beobachtet. PrP(23-144) kann in den Fraktionen 11 - 14 nachgewiesen werden, bei Zugabe von 40 μM auch in den Fraktionen 1 - 3.

3.7.3 Verteilung von A β (1-42) mit PrP(90-230)

Ein weiteres in dieser Arbeit untersuchtes PrP-Konstrukt ist das C-terminale PrP(90-230). Dieses Konstrukt beinhaltet die Bindestelle für A β -Oligomere an Position 95 - 110, die vorderste Bindestelle bei den Aminosäuren 23 - 27 fehlt jedoch (vgl. Kapitel 3.6). Jeweils 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M oder 20 μ M PrP(90-230)-Zugabe zu 80 μ M inkubiertem A β wurden untersucht (Abb. 3.20). Bei allen eingesetzten PrP(90-230)-Konzentrationen kann beobachtet werden, dass PrP(90-230) überwiegend in den oberen Gradientenfraktionen 1 bis 5 nachgewiesen werden kann (Abb. 3.20). Diese Verteilung ähnelt sehr stark der Verteilung der PrP(90-230)-Kontrolle (Abb. 3.17 C). Selbst bei PrP(90-230)-Zugabe von 20 μ M werden weniger als 1 μ M PrP(90-230) pro Fraktion in den Fraktionen 11 bis 14 erhalten (Abb. 3.20 F). Dies entspricht etwa 14 - 18 % der eingesetzten PrP(90-230)-Menge. In den Fraktionen 1 und 2 können hingegen noch maximal 4,5 μ M bzw. 3,5 μ M PrP(90-230) nach Zugabe von 20 μ M PrP(90-230) nachgewiesen werden.

Bei steigender PrP(90-230)-Zugabe ist lediglich eine leichte A β -Abnahme in den Oligomer enthaltenden Fraktionen 4 bis 6 und eine A β -Zunahme in den Fraktionen 11 bis 14 zu beobachten (Abb. 3.20 A - E). Hierbei werden 4 - 7 μ M A β in den Fraktionen 11 bis 14 nach Hinzufügen von 20 μ M PrP(90-230) erhalten (Abb. 3.20 E). Diese Mengen entsprechen lediglich 25 - 35 % des nachgewiesenen A β (vgl. hierzu Kapitel 3.7.5). Insgesamt erinnert die A β -Verteilung selbst bei maximaler PrP(90-230)-Zugabe von 20 μ M an die A β -Verteilung ohne PrP. Lediglich die Konzentration von A β pro Fraktion ist etwas niedriger.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch mit PrP(90-230) leicht erhöhte Proteinmengen, sowohl A β als auch PrP(90-230), in den Fraktionen 11 bis 14 nachgewiesen werden können, verglichen mit den Kontrollen, jedoch weniger als mit den anderen untersuchten PrP-Konstrukten.



**Abbildung 3.20: Verteilung von PrP(90-230) mit A β (1-42) im Saccharosedichte-
gradienten.** Verteilung von A β mit 2 μ M (A), 5 μ M (B), 10 μ M (C) oder 20 μ M
PrP(90-230) (D), analysiert durch Tris-Tricin-SDS-PAGE. A β -Konzentrationen in
den einzelnen Fraktionen sind in E, PrP-Konzentrationen in F dargestellt. Mit
steigender PrP-Menge wird eine geringe A β -Zunahme in den Fraktionen 11 - 14
beobachtet. PrP(90-230) befindet sich überwiegend in den Fraktionen 1 - 5. Nur
geringe Konzentrationen werden in den Fraktionen 11 - 14 nachgewiesen.

3.7.4 Verteilung von A β (1-42) mit PrP(23-111 Δ 41-94)

Neben den bereits analysierten PrP-Konstrukten ist es in dieser Arbeit ebenfalls von großem Interesse ein PrP-Konstrukt zu untersuchen, welches die Octarepeat-Region auf dem PrP (Aminosäuren 51 - 91) nicht beinhaltet. Der Grund hierfür ist, dass die AS, die sich in der Octarepeat-Region befinden, sich in ähnlicher chemischer Umgebung befinden und somit bei NMR-Messungen nicht auseinander gehalten werden können (siehe Kapitel 3.6.2). Deshalb soll ein Konstrukt ohne diese Region zunächst mittels Saccharose-DGZ analysiert und mit den anderen PrP-Konstrukten (PrP(23-230), PrP(23-144) und PrP(90-230)) verglichen werden. Hierbei wurde das PrP(23-111 Δ 41-94) gewählt, welches auf der Veröffentlichung von Fluharty et al. [60] basiert. Mit diesem -von ihnen als P2 bezeichneten- Konstrukt wurde ein K_D -Wert von 26,3 nM gegenüber A β -Oligomeren erhalten [60].

Das synthetische PrP(23-111 Δ 41-94) wurde in dieser Arbeit in den drei Konzentrationen 10 μ M, 20 μ M und 40 μ M untersucht (Abb. 3.21). Die Konzentrationen 2 μ M und 5 μ M, mit denen alle anderen PrP-Konstrukte analysiert wurden, wurden bewusst nicht untersucht, da dieses nur 35 AS lange PrP-Konstrukt nur geringe Absorptionssignale bei RP-HPLC-Messungen aufweist und bei sehr niedrigen Konzentrationen das Detektionslimit der HPLC erreicht wird. Die Auswertungen von Messungen mit niedrigeren als den untersuchten Konzentrationen wären somit deutlich kritischer und möglicherweise fehlerbehaftet.

Nach Hinzufügen von 10 μ M, 20 μ M oder 40 μ M PrP(23-111 Δ 41-94) ist eine Abnahme der A β -Banden in den Fraktionen 4 bis 9 und eine A β -Zunahme in den Fraktionen 11 bis 14 zu beobachten (Abb. 3.21 A - E). In diesen Fraktionen können bis zu 20 μ M A β pro Fraktion nach Zugabe von 20 μ M oder 40 μ M PrP(23-111 Δ 41-94) (Ausgangslösung) nachgewiesen werden (Abb. 3.21 E). Ebenfalls ist eine A β -Abnahme in den Fraktionen 1 bis 3 zu erkennen. Diese lässt sich durch das Gleichgewicht zwischen Monomeren und Oligomeren erklären (siehe auch 3.7.1).

Bei den Messungen mit 10 μ M PrP(23-111 Δ 41-94) in der Ausgangslösung konnte alles an PrP in den DGZ-Fraktionen 11 bis 14 nachgewiesen werden (Abb. 3.21 B, F). Bei den Messungen mit 20 μ M und 40 μ M PrP(23-111 Δ 41-94) liegt dieses im Überschuss vor, weshalb das PrP zusätzlich in den oberen Fraktionen 1 und 2 verifiziert werden konnte (Abb. 3.21 F). Die PrP-Konzentrationen in den Fraktionen 11 bis 14 liegen nach Zugabe von 10 μ M oder 20 μ M PrP(23-111 Δ 41-94) maximal bei 3 μ M pro Fraktion.

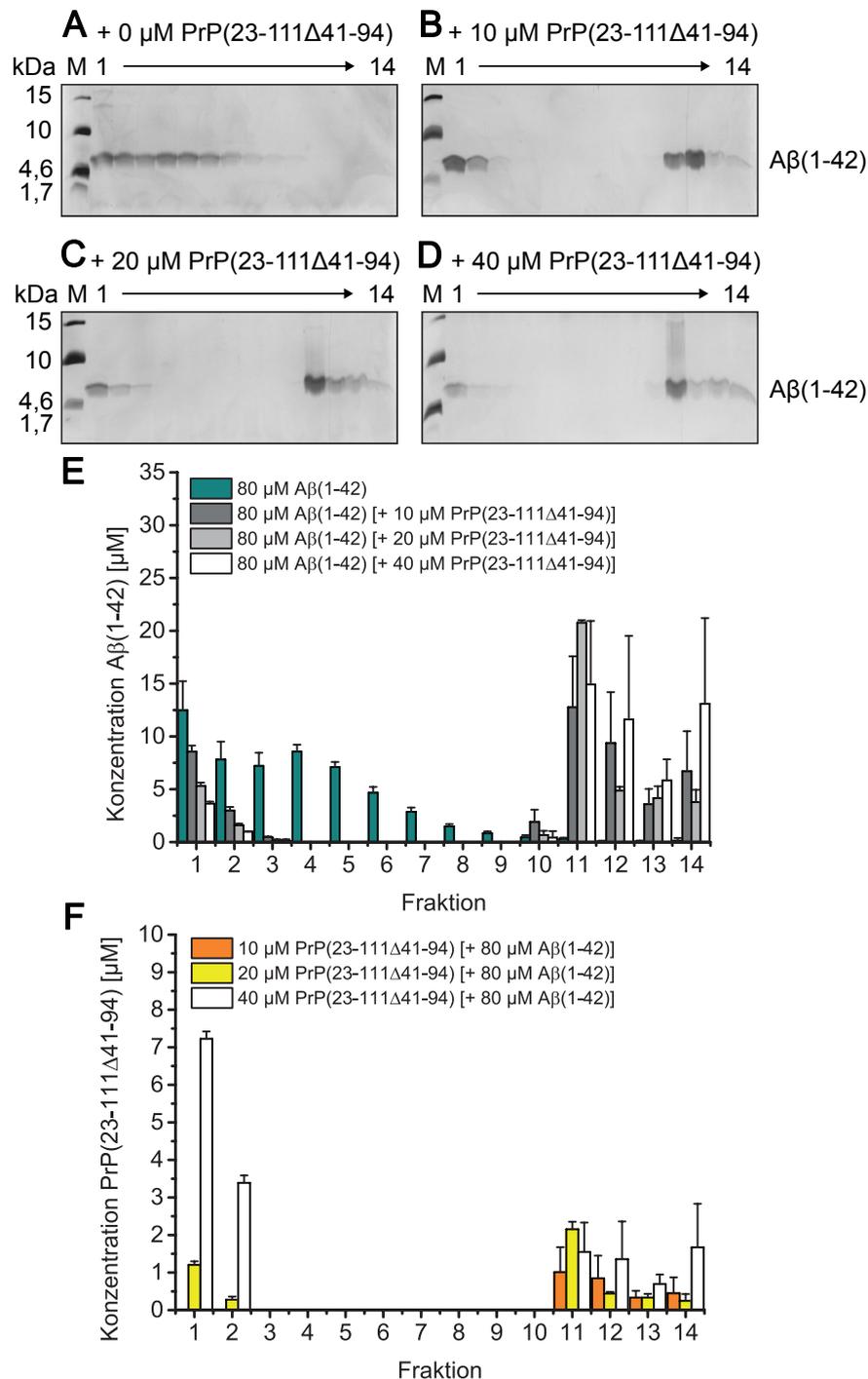


Abbildung 3.21: Verteilung von PrP(23-111 Δ 41-94) mit A β (1-42) im Saccharosedichtegradienten. Verteilung von A β allein (A) oder mit 10 μM (B), 20 μM (C) oder 40 μM PrP(23-111 Δ 41-94) (D), analysiert durch Tris-Tricin-SDS-PAGE. A β -Konzentrationen in den einzelnen Fraktionen sind in E, PrP-Konzentrationen in F dargestellt. Mit steigender PrP-Menge wird eine A β -Zunahme in den Fraktionen 11 - 14 beobachtet. PrP(23-111 Δ 41-94) wird bei allen untersuchten PrP-Konzentrationen in den Fraktionen 11 - 14 nachgewiesen, bei Zugabe von 20 μM und 40 μM auch in den Fraktionen 1 und 2 (F).

Bemerkenswert ist, dass PrP(23-111 Δ 41-94) in den Tris-Tricin-SDS-PAGE-Gelen bei den gegebenen Bedingungen nicht oder nur sehr schwach mittels Silberfärbung sichtbar gemacht werden kann (Abb. 3.21).

Beim Vergleich aller PrP-Konstrukte fällt auf, dass nach Zugabe gleicher PrP-Konzentrationen im Falle von PrP(23-230), PrP(23-144) und PrP(23-111 Δ 41-94) wesentlich mehr A β in den Fraktionen 11 bis 14 nachgewiesen und mit diesen Konstrukten hochmolekulare A β -PrP-Komplexe erhalten werden können. Folglich wird weder die strukturierte Domäne des PrPs, welche ab ca. AS 128 beginnt [40], noch die Octarepeats (AS 51 - 91) für die Bindung an A β -Oligomere benötigt. Mit PrP(90-230) bilden sich weniger Komplexe als mit den anderen drei PrP-Konstrukten. Somit kann gezeigt werden, dass das Vorhandensein der Bindestelle an Position 23 - 27 wichtig für die A β -PrP-Komplexbildung ist und das Vorhandensein der Bindestelle 95 - 110 allein nicht ausreicht, um A β -Oligomere effektiv zu komplexieren.

3.7.5 Stöchiometrien der verschiedenen A β -PrP-Komplexe

In den Kapiteln 3.7.1 - 3.7.4 wurden die PrP-Konstrukte PrP(23-230), PrP(23-144), PrP(90-230) und PrP(23-111 Δ 41-94) ausführlich untersucht und die Verteilungen von A β und PrP in Abhängigkeit von der PrP-Konzentration im Dichtegradienten gezeigt. Die RP-HPLC-Messungen erlauben eine Quantifizierung von A β und allen PrP-Konstrukten, sodass das Verhältnis von A β zu PrP innerhalb der entstandenen Komplexe bestimmt werden kann. Da es durch die manuelle Fraktionierung der Dichtegradienten zu einer leichten Ungenauigkeit der Fraktionsgröße kommen kann, was zu einer Positionsänderung der Komplexe in den Fraktionen führt, werden die Fraktionen 11 bis 14 als eine Einheit betrachtet und die Stöchiometrie pro Experiment und nicht pro Fraktion bestimmt. Die genaue Berechnung der Stöchiometrien ist dem Kapitel 2.2.19 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Mittelwerte und Standardabweichungen der Stöchiometrien von A β zu PrP aller untersuchten PrP-Konstrukte innerhalb der A β -PrP-Komplexe aus den Dichtegradientenfraktionen 11 - 14

Konzentration	PrP(23-230)	PrP(23-144)	PrP(23-111 Δ 41-94)	PrP(90-230)
2 μ M	12,1 \pm 1,7	10,1 \pm 0,8	-	6,7 \pm 1,5
5 μ M	9,6 \pm 2,3	11,3 \pm 0,6	-	9,0 \pm 1,1
10 μ M	6,3 \pm 1,7	8,3 \pm 1,1	11,1 \pm 0,5	9,6 \pm 2,8
20 μ M	4,2 \pm 0,9	4,8 \pm 0,3	9,8 \pm 0,9	10,9 \pm 3,2
40 μ M	-	3,93 \pm 0,04	8,7 \pm 0,4	-
60 μ M	-	4,04 \pm 0,08	-	-

Alle berechneten Stöchiometrien sind in Tabelle 3.1 sowie der dazugehörigen Abbildung 3.22 angegeben. Mit den PrP-Konstrukten PrP(23-230), PrP(23-144) und PrP(23-111 Δ 41-94) können mit zunehmender PrP-Menge abnehmende A β /PrP-Verhältnisse beobachtet werden. Folglich ist mehr PrP in den Komplexen vorhanden. Im Falle des PrP(90-230) wird zwar eine Zunahme der Mittelwerte bei steigender PrP-Menge beobachtet, bei Berücksichtigung des Fehlers wird jedoch deutlich, dass mit allen untersuchten PrP(90-230)-Konzentrationen A β /PrP-Verhältnisse innerhalb desselben Bereichs erhalten werden. Dieser liegt in etwa bei einem Verhältnis von 8 A β : 1 PrP(90-230) (siehe Tabelle 3.1 und Abb. 3.22). Die Menge an A β ist in Monomeräquivalenten angegeben.

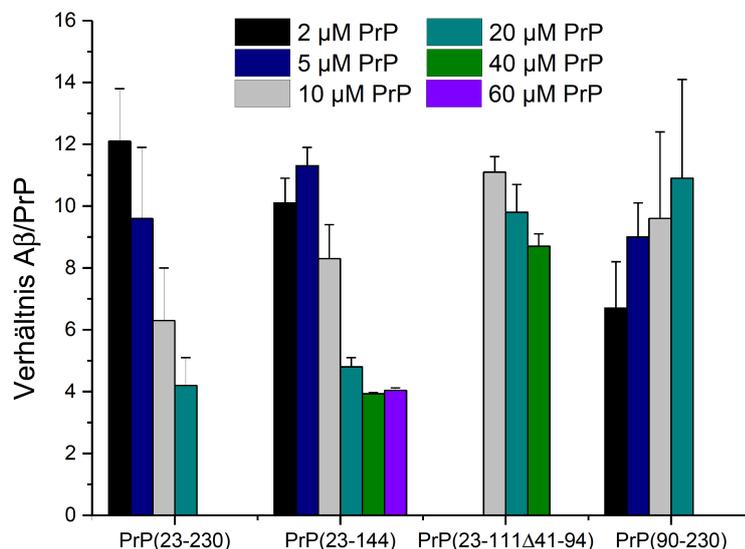


Abbildung 3.22: Stöchiometrien der A β -PrP-Komplexe aller untersuchten PrP-Konstrukte bei verschiedenen Konzentrationen. Mit den Konstrukten PrP(23-230), PrP(23-144), PrP(23-111 Δ 41-94) und PrP(90-230) wurden die A β /PrP-Verhältnisse nach Hinzufügen von 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M oder 60 μ M PrP zu 80 μ M A β untersucht. Im Falle von PrP(23-230) und PrP(23-144) wird mit steigender Prion-Konzentration ein Verhältnis von 4 A β : 1 PrP erhalten.

Beim Vergleich der Werte von PrP(23-230) und PrP(23-144) ist zu beobachten, dass bei gleichen eingesetzten PrP-Konzentrationen ähnliche Stöchiometrien erhalten werden. Mit steigender PrP-Konzentration nähern sich die Stöchiometrien einem Wert von 4 A β : 1 PrP (siehe Tabelle 3.1 und Abb. 3.22). Nach Hinzufügen von 40 μ M PrP(23-144) befindet sich dieses im Überschuss (siehe Kapitel 3.7.2). Auch mit einer noch höheren PrP-Konzentration von 60 μ M PrP(23-144) bleibt die Stöchiometrie unverändert bei 4 A β : 1 PrP. Folglich sind alle Bindestellen auf den A β -Oligomeren

besetzt, sodass nach PrP(23-144)-Überschuss das A β /PrP-Verhältnis konstant bleibt. Obwohl PrP(23-230) allein fast ausschließlich als Monomer vorliegt, werden etwa 15 % des PrP(23-230) in den Fraktionen 11 bis 14, somit als hochmolekulare Aggregate, nachgewiesen (siehe Kapitel 3.6.4, Abb. 3.17). Bei allen Berechnungen wurde dieser PrP-Hintergrund nicht mitberechnet. Dennoch befinden sich die Stöchiometrien in derselben Größenordnung wie mit PrP(23-144), bei dem kaum Hintergrund gemessen wurde (siehe Kapitel 3.6.4). Somit kann davon ausgegangen werden, dass der mögliche Einfluss des PrP(23-230)-Hintergrunds auf die A β /PrP-Stöchiometrie so gering ist, dass dieser vernachlässigt werden kann. Diese Ergebnisse bestätigen, dass der gefaltete C-terminale Bereich des PrPs für die Bindung von A β -Oligomeren nicht benötigt wird. Auch für PrP(23-111 Δ 41-94), welches die Octarepeat-Region nicht beinhaltet, können A β /PrP-Stöchiometrien bestimmt werden (siehe Tabelle 3.1 und Abb. 3.22), da auch mit diesem PrP-Konstrukt Komplexe gebildet werden. Trotz eines PrP-Überschusses bei 20 μ M und 40 μ M PrP(23-111 Δ 41-94)-Zugabe (siehe Kapitel 3.7.4) kommen die Stöchiometrien nicht an den Wert von 4 A β : 1 PrP mit PrP(23-230) bzw. PrP(23-144) heran, obwohl mit PrP(23-111 Δ 41-94) eine Bindung an A β -Oligomere gezeigt werden konnte (siehe Kapitel 3.7.4, [60]). Mit einem Wert von etwa 8 A β : 1 PrP liegt die Stöchiometrie mit PrP(23-111 Δ 41-94) doppelt so hoch. Dies lässt sich durch die geringe Größe des PrP(23-111 Δ 41-94) erklären. Bei gleichbleibender Größe der A β -Oligomere kann PrP(23-111 Δ 41-94) möglicherweise aus sterischen Gründen nur jede zweite Bindestelle besetzen.

Neben den A β /PrP-Stöchiometrien wurde auch untersucht wie viel Prozent A β bzw. PrP mit den unterschiedlichen PrP-Konstrukten in den Fraktionen 11 bis 14 nachgewiesen werden können. Hierbei wurde die Menge des in den Fraktionen 11 bis 14 befindlichen A β bzw. PrP in Relation zu der in allen Fraktionen verifizierten Menge gesetzt (Abb. 3.23). Dargestellt sind die Prozente bei einer Konzentration von 20 μ M, da alle vier verschiedenen Prion-Konstrukte bei dieser Konzentration analysiert wurden. Die Prozente von A β liegen mit 80 - 90 % für die Konstrukte PrP(23-230), PrP(23-144) und PrP(23-111 Δ 41-94) nahe beieinander. Die Menge des verifizierten PrP in den Fraktionen 11 bis 14 liegt sowohl bei PrP(23-230) als auch bei PrP(23-144) bei nahezu 100 % (Abb. 3.23). Lediglich bei PrP(23-230) weicht dieser Wert etwas ab, da bei diesem zum Teil auch PrP in den oberen Fraktionen 1 bis 3 nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 3.7.1). Die PrP-Menge des PrP(23-111 Δ 41-94) in den Fraktionen 11 bis 14 liegt zwischen 70 % und 80 % und zeigt damit an, dass dieses PrP-Konstrukt bei einer Konzentration von 20 μ M bereits im Überschuss vorliegt. Mit PrP(90-230) sind deutliche Unterschiede zu den anderen Konstrukten festzustellen. Sowohl die Menge an A β als auch die an PrP sind mit 30 - 40 % bzw.

15 - 18 % niedriger als mit allen anderen Prion-Konstrukten. Folglich wurden mit PrP(90-230) weniger A β -PrP-Komplexe erhalten.

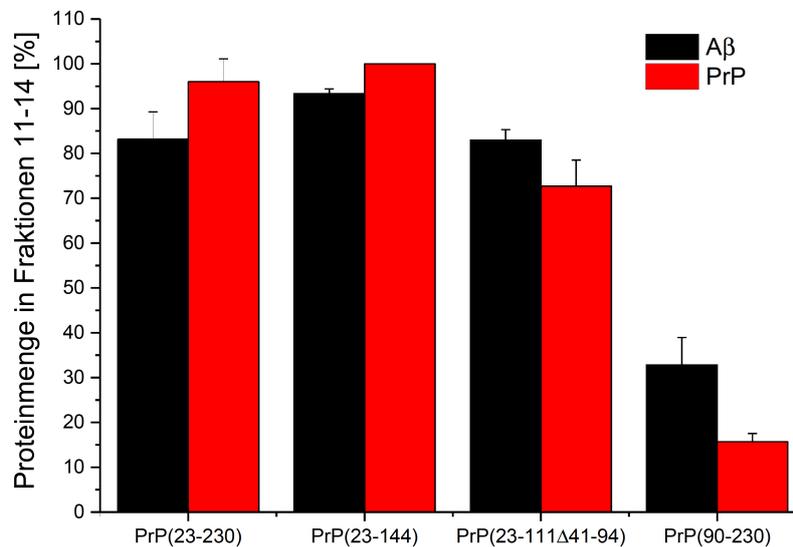


Abbildung 3.23: A β - bzw. PrP-Menge in den A β -PrP-Komplexen in Relation zur Gesamtproteinmenge. Untersucht wurden die PrP-Konstrukte PrP(23-230), PrP(23-144), PrP(23-111 Δ 41-94) und PrP(90-230) bei einer Konzentration von 20 μ M in der Ausgangslösung mit 80 μ M A β . Mit PrP(90-230) wurden die geringsten Proteinmengen nachgewiesen, da am wenigsten A β -PrP-Komplexe gebildet wurden. Berechnet wurden die prozentualen A β - und PrP-Mengen in Fraktionen 11 bis 14, indem diese in Relation zur A β - und PrP-Menge aus allen Fraktionen (1 bis 14) gesetzt wurden. Diese wurde zuvor als 100 % gesetzt.

3.7.6 Untersuchung von A β -PrP(23-144)-Komplexen mittels Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy, AFM*)

In den Kapiteln 3.7.1 - 3.7.5 ist die A β -PrP-Interaktion ausführlich charakterisiert und die Stöchiometrie zwischen A β und PrP in den entstandenen Komplexen bestimmt worden. Neben den Stöchiometrien sind ebenfalls die strukturellen Eigenschaften der A β -PrP-Komplexe in dieser Arbeit von besonderem Interesse. Deshalb wurden die Komplexe durch Rasterkraftmikroskopie (*Atomic Force Microscopy, AFM*) abgebildet, um einen Eindruck der strukturellen Eigenschaften zu bekommen. Hierbei wurde sich für Komplexe bestehend aus A β und PrP(23-144) entschieden, da dieses PrP-Konstrukt das gleiche Verhalten zeigt wie das Volllänge PrP(23-230) (siehe Kapitel 3.7.1, 3.7.2 und 3.7.5), aber bei den DGZ-Analysen des Ausgangsmaterials nahezu kein aggregiertes Protein in den Fraktionen gemessen wurde, in denen sich

auch die Komplexe befinden (siehe Kapitel 3.6.4). Alle gezeigten AFM-Messungen wurden zusammen mit Elke Reinartz durchgeführt. Vor der Untersuchung der A β -PrP-Komplexe wurden die Ausgangsmaterialien charakterisiert. Bei der geringen Konzentration von 200 nM bildet PrP(23-144) auf der Micaoberfläche nur einen dünnen Proteinfilm von 1 - 2 nm (Abb. 3.24 A). Selten können auch Partikel von wenigen Nanometern Höhe, jedoch nicht mehr als 10 nm, gemessen werden. A β -Oligomere wurden für die Messung soweit verdünnt, dass sie einzeln liegen, damit sie anschließend ausgewertet werden können. Die sphärischen Oligomere sind zwischen 1 nm und 6 nm hoch, selten auch bis zu 10 nm (Abb. 3.24 B und C). Höhe und Breite der Oligomere korrelieren miteinander. Im Gegensatz zu Brener et al. [128] wurden die AFM-Aufnahmen im trockenen Zustand gemessen.

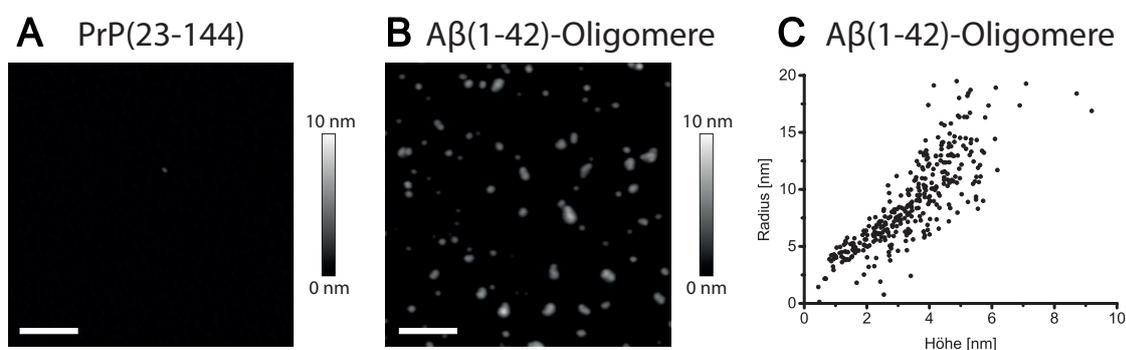


Abbildung 3.24: Analyse der Ausgangsmaterialien mittels AFM. 200 nM PrP(23-144) (A) und 800 nM A β (1-42)-Oligomere (B) wurden auf einen Mica-Kristall gegeben und über AFM gemessen; Skala: 200 nm. Während PrP einen dünnen Film auf der Kristalloberfläche bildet, können bei A β kleine sphärische Oligomere mit durchschnittlich 1 - 6 nm Höhe gemessen werden. Eine Analyse der Oligomere zeigt (C), dass Höhe und Breite der Oligomere zusammenhängen.

Zur Herstellung der Komplexe wurden zunächst 80 μ M A β für 2 h inkubiert und entweder 1 μ M, 5 μ M oder 40 μ M PrP(23-144) für weitere 30 min hinzugefügt. Um die Komplexe mit möglichst hoher Auflösung abbilden zu können, mussten lose anhaftende Proteine durch Wasch- und Zentrifugationsschritte abgelöst werden. Von den Komplexproben mit 1 μ M, 5 μ M und 40 μ M wurden zunächst 4 x 4 μ m Übersichtsbilder aufgenommen (Abb. 3.25). Bei allen untersuchten PrP-Konzentrationen ist zu erkennen, dass sich die Komplexe aus zusammengeballten globulären Strukturen aufbauen. Zu beachten ist, dass die beobachteten globulären Strukturen wesentlich größer sind als die A β -Oligomere (Abb. 3.26). Mit 5 μ M und 40 μ M PrP(23-144) ist es nicht möglich die Komplexe komplett auf dem 4 x 4 μ m Ausschnitt abzubilden, da diese deutlich breiter sind (Abb. 3.25 B und C).

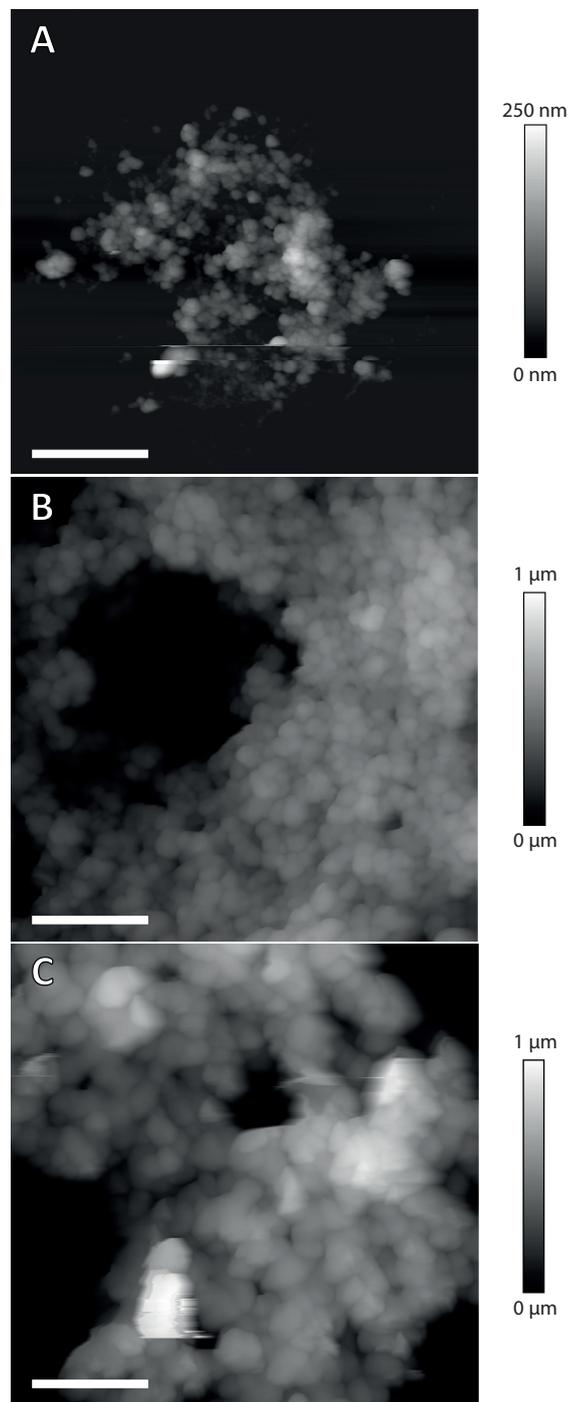


Abbildung 3.25: 4 x 4 μm AFM-Bilder von A β -PrP-Komplexen. A β -PrP-Komplexe nach Hinzufügen von 1 μM (A), 5 μM (B) oder 40 μM PrP(23-144) (C); Skala: 1 μm. Bei allen AFM-Bildern können Gebilde aus verschiedenen großen globulären Strukturen erkannt werden, die mit steigender PrP(23-144)-Menge kompakter werden. Insbesondere die Komplexe mit 40 μM PrP(23-144) waren schwieriger abzubilden, da der Cantilever öfters an den Komplexen anhaftete.

Die Messungen waren insbesondere bei den Komplexen mit 40 μM PrP(23-144) in der Ausgangslösung schwierig durchzuführen, da die Oberfläche der Komplexe äußerst klebrig ist und der Cantilever aus diesen Gründen die Oberfläche nicht gleichmäßig abtasten konnte. Auch durch die große Höhendifferenz zwischen Erhöhungen und Vertiefungen innerhalb dieser Komplexe war das Abbilden der Komplexe herausfordernd, insbesondere an den Rändern der Komplexe, da der Höhenunterschied hier am größten ist.

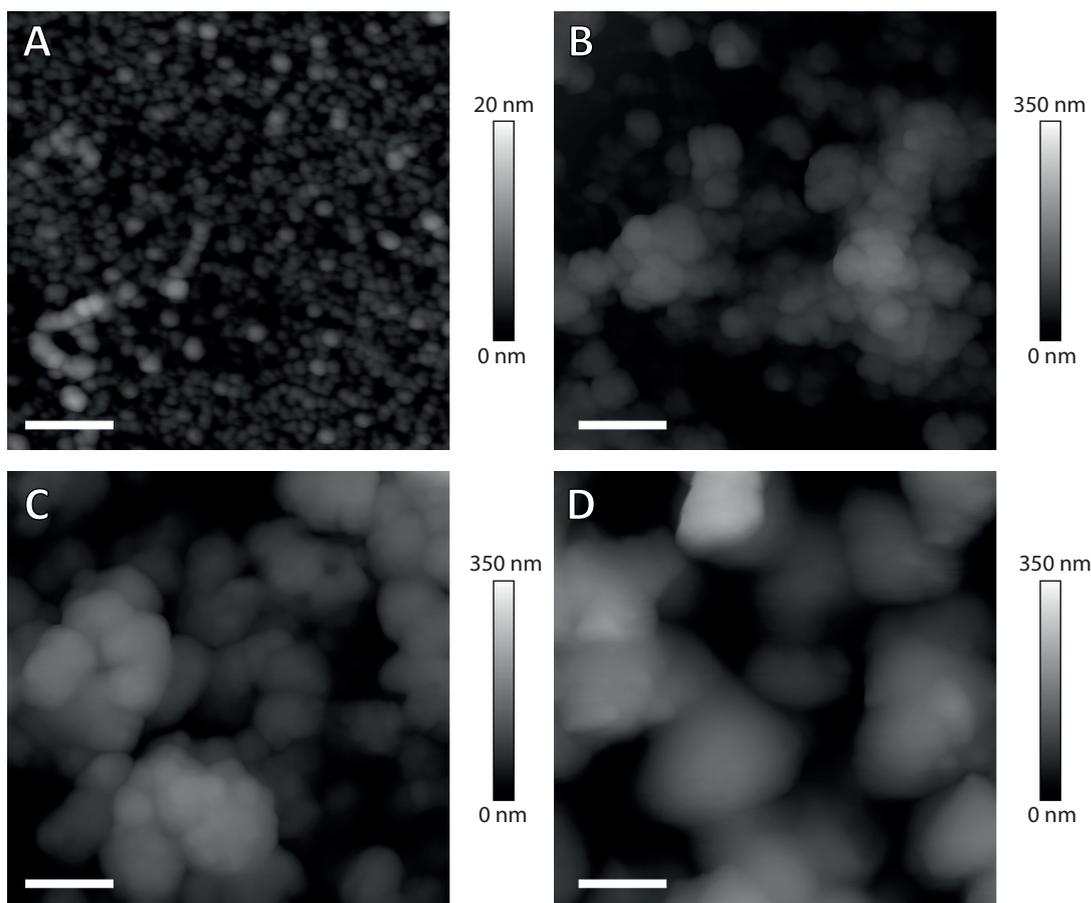


Abbildung 3.26: 1 x 1 μm AFM-Bilder von A β -Oligomeren und A β -PrP-Komplexen. Gezeigt sind A β -Oligomere bei einer Konzentration von 8 μM (A) sowie A β -PrP-Komplexe generiert durch 1 μM (B), 5 μM (C) oder 40 μM PrP(23-144) (D) mit jeweils 80 μM A β ; Skala: 200 nm. Mit verschiedenen PrP-Konzentrationen werden unterschiedlich große A β -PrP-Komplexe erhalten. Alle globulären Strukturen sind größer als die A β -Oligomere.

Um die drei Ansätze vergleichen zu können, wurden Bereiche an der Oberfläche der Aggregate gewählt. So konnten Bilder erstellt werden, die frei sind von Spitzenartefakten, die an den Randbereichen hoher Partikel entstehen (Abb. 3.26). Die Bilder der Komplexe (3.26 B, C und D) sind auf dieselbe Höhe von 350 nm skaliert,

um Gemeinsamkeiten und Unterschiede feststellen zu können. Bei den Komplexen bestehend aus 80 μ M A β und 1 μ M PrP(23-144) können lose unregelmäßig geformte Cluster erkannt werden, die an „Himbeeren“ erinnern (Abb. 3.26 B). Eine Quantifizierung der Größenverteilung, so wie es bei den A β -Oligomeren durchgeführt wurde (Abb. 3.24 C), ist nur bei Partikeln möglich, die sich in einer Ebene befinden. Die einzelnen Partikel sind zwischen 20 nm und 70 nm hoch und formen ein bis zu 200 nm hohes und bis zu 2,5 μ m breites Aggregat. Es fällt auf, dass jede einzelne „Kugel“ innerhalb dieser Partikel größer ist als jedes A β -Oligomer, selbst wenn diese bei einer Konzentration von 8 μ M sehr dicht auf der Micaoberfläche liegen (Abb. 3.26 A). Somit kann eine „Kugel“ kein einzelnes Oligomer sein, sondern setzt sich entweder aus mehreren Oligomeren zusammen oder wird von PrP(23-144) abgedeckt.

Mit steigender PrP-Menge werden die Komplexe kompakter. Nach Zugabe von 5 μ M PrP(23-144) hängen die Substrukturen dichter aneinander und die Oberfläche wirkt insgesamt glatter (Abb. 3.26 C). Das gesamte Aggregat ist bis zu 500 nm hoch. Nach Hinzufügen von 40 μ M PrP(23-144) können Aggregate von über 1 μ m Höhe gemessen werden. Die Substrukturen sind insgesamt sehr glatt und es können keine „himbeerartigen“ Strukturen mehr erkannt werden (Abb. 3.26 D).

3.7.7 Strukturelle Untersuchungen der A β -PrP-Komplexe über Festkörper-NMR-Spektroskopie

Für weitere strukturelle Einblicke wurden die A β -PrP-Komplexe über NMR-Spektroskopie charakterisiert. Hierbei sollten die entstandenen Komplexe ursprünglich über Flüssig-NMR-Spektroskopie gemessen werden. Es zeigte sich jedoch, dass das Hinzufügen von A β -Oligomeren zu PrP (sei es PrP(23-230) oder PrP(23-144)) unter Ausbildung der Komplexe zur Präzipitation der Probe führte. Dies war bei den besonders hohen Konzentrationen (bis zu mehrere hundert Mikromolar), die für NMR-Proben nötig sind, direkt augenscheinlich. Dadurch waren die Komplexe nicht mehr gelöst und es konnten bei der Messung keine Resonanzen detektiert werden.

Deshalb wurde entschieden die A β -PrP-Komplexe über *magic angle spinning* (MAS) Festkörper-NMR-Spektroskopie (FK-NMR) zu untersuchen. Hierfür ist es nötig die zu untersuchende Komponente mit ^{13}C - und/oder ^{15}N -Isotopen zu markieren. Alle in dieser Arbeit gezeigten FK-NMR-Spektren wurden durch Anna König im

Rahmen ihrer Doktorarbeit aufgenommen und ausgewertet. Zunächst wurden Komplexe bestehend aus unmarkierten A β (1-42)-Oligomeren und ^{13}C - ^{15}N markiertem PrP(23-230) (Probe generiert aus 240 μM A β und 60 μM PrP(23-230)) bzw. ^{13}C - ^{15}N markiertem PrP(23-144) (Probe generiert aus 240 μM A β und 40 μM PrP(23-144)) untersucht (Abb. 3.27). Zum Zeitpunkt der Probenvorbereitung waren die Stöchiometrien, beschrieben in Kapitel 3.7.5, noch nicht bekannt.

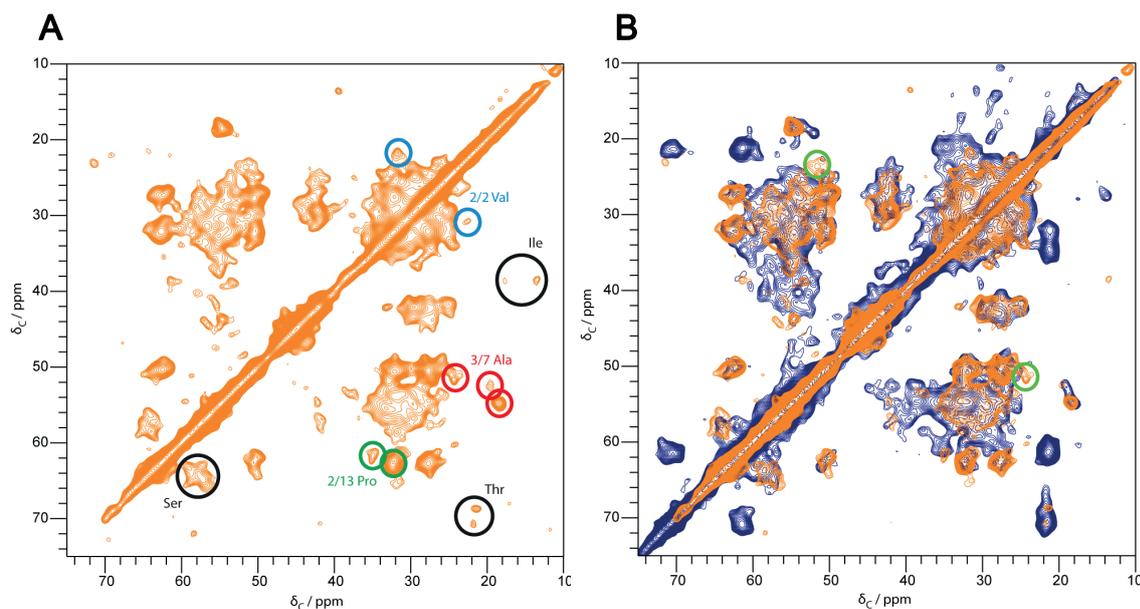


Abbildung 3.27: PDS-D-Spektren von A β -PrP-Komplexen mit ^{13}C - ^{15}N markiertem PrP(23-144) oder PrP(23-230). PDS-D-Spektrum mit markiertem PrP(23-144), aufgenommen bei 11 kHz MAS, -10°C (nominal) und 30 ms Mischzeit (A). Einige der Resonanzen können den jeweiligen AS zugeordnet werden (Kreise). Überlagerung von PDS-D-Spektren mit markiertem PrP(23-144) (B, orange) und markiertem PrP(23-230) (B, blau); beide aufgenommen bei 11 kHz MAS und 30 ms Mischzeit bei -16°C (nominal) (PrP(23-144)) oder -10°C (nominal) (PrP(23-230)). In dem Spektrum mit markiertem PrP(23-230) (B, blau) sind insbesondere in dem Bereich von 35 - 45 ppm mehr Resonanzen zu erkennen sowie bei etwa 22 ppm und 62 ppm (Thr und Val) als in dem Spektrum mit markiertem PrP(23-144) (B, orange). Lediglich eine Alanin- oder Prolin-Resonanz (grüne Kreise) ist ausschließlich in dem orangenen PrP(23-144) Spektrum enthalten.

Es fällt auf, dass trotz der verschiedenen Längen der beiden Prionkonstrukte wenig strukturelle Unterschiede zwischen PrP(23-230) und PrP(23-144) innerhalb der A β -PrP-Komplexe in den gezeigten *Proton-Driven Spin Diffusion* (PDS-D)-Spektren sichtbar sind. Mit PrP(23-230) (Abb. 3.27 B blau) können jedoch mehr Threonine, Valine und Isoleucine detektiert werden, da durch das Verkürzen zu PrP(23-144) nur noch 3 von 12 Threoninen, 2 von 9 Valinen und 2 von 5 Isoleucinen vorhanden sind. Auch in dem Bereich von 35 ppm bis 45 ppm sind in den PrP(23-144)-Spektren

weniger Signale zu erkennen (Abb. 3.27 B orange), ebenfalls erklärbar durch eine Reduktion an Aminosäuren (verbleibend: 4 von 11 Argininen, 4 von 11 Asparaginen, 0 von 9 Glutaminsäuren, 8 von 15 Glutaminen, 3 von 13 Tyrosinen, 1 von 5 Asparaginsäuren und 1 von 3 Phenylalaninen). In dem PDSD-Spektrum von PrP(23-144) kann allerdings ein Peak gefunden werden, der in dem Spektrum mit PrP(23-230) nicht zu finden ist (Abb. 3.27 B grüne Kreise). Hierbei handelt es sich um mindestens ein Alanin oder Prolin, welches stark Richtung β -Faltblatt verschoben ist. Dennoch treten durch das Verkürzen des PrP(23-230) zu PrP(23-144) keine gravierenden strukturellen Unterschiede auf, mit Ausnahme der genannten Signalreduzierungen. Dies ist dadurch erklärbar, dass der PrP-C-Terminus für die Bindung nicht relevant ist. Ein Vergleich der erhaltenen Resonanzen mit denen von Zahn et al. [40] zeigt, dass der N-Terminus des PrPs in den PDSD-Spektren sichtbar und ähnlich zu den Werten von Zahn et al. ist. Die Resonanzen des C-Terminus' [40] zeigen hingegen kaum Übereinstimmungen mit den hier erhaltenen Signalen. Folglich wird der sonst flexible N-terminale Bereich des PrPs durch die Bindung von A β -Oligomeren immobilisiert.

Es ist möglich einige der Resonanzen zu unterscheiden (Abb. 3.27 A). Dies betrifft z.B. Isoleucine, Threonine und Valine. Glutamine, Glycine, Proline und Tryptophane hingegen, allesamt Aminosäuren, die sich in den Octarepeats befinden, erzeugen überlappende Signale, die nicht differenziert werden können. Alanine und Serine hingegen, können nur teilweise aufgelöst werden. So können mit Hilfe dieser Proben einige strukturelle Aussagen getroffen werden, jedoch sind die Proben, bedingt durch die Octarepeats, nicht geeignet, um eine komplette Zuordnung der Signale vornehmen zu können.

Im weiteren Verlauf wurde deshalb eine A β -PrP-Komplex-Probe hergestellt, bei der die A β -Oligomere die einheitlich ^{13}C - ^{15}N markierte Spezies sind und PrP(23-144) die unmarkierte Spezies ist. Das resultierende PDSD-Spektrum ist, bedingt durch die geringere Länge des Peptids, deutlich übersichtlicher (Abb. 3.28) als die Spektren mit markiertem Prion-Protein (vgl. Abb. 3.27). Eine Unterscheidung der Resonanzen und Zuordnung zu den verschiedenen Aminosäuren ist größtenteils möglich. Es können jedoch keine Histidine in dem Spektrum identifiziert werden. Bedingt durch die pH-Wert abhängige Imin-Enamin-Tautomerie der Histidine werden bei dem pH-Wert der Probe (pH 7,4) keine Resonanzen erhalten. Es zeigt sich, dass mehr als ein Satz an Resonanzen in den Spektren gefunden werden kann, als A β Aminosäuren besitzt (siehe Tabelle 3.2). Folglich muss es mehr als ein A β -Konformer innerhalb der Probe geben.

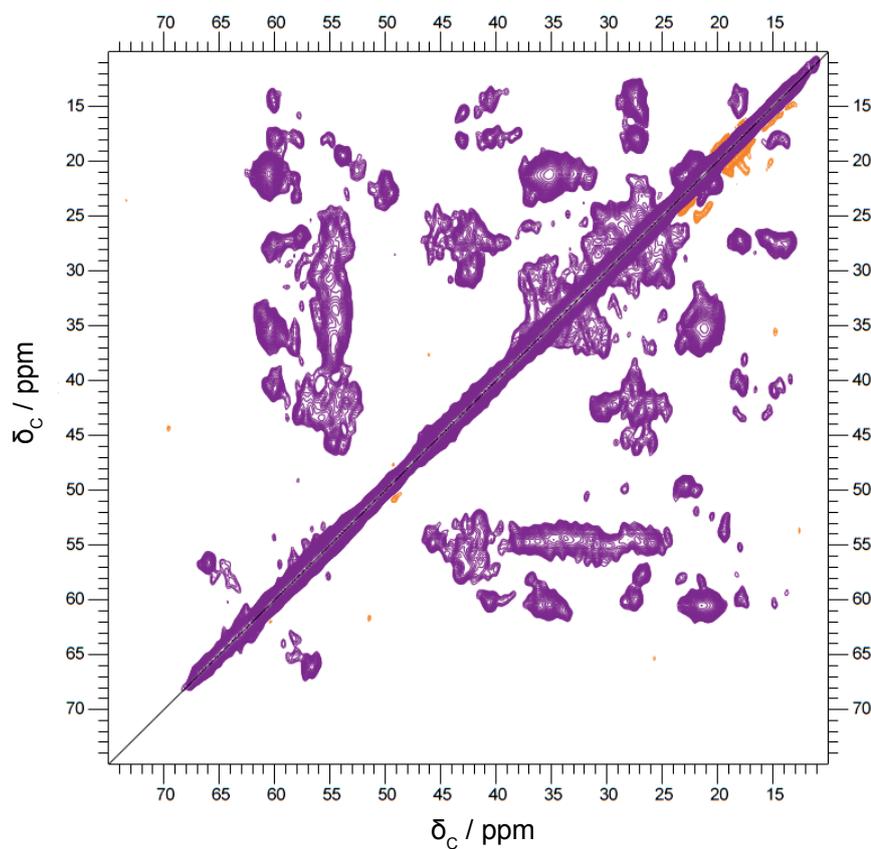


Abbildung 3.28: PDSD-Spektrum von A β -PrP-Komplexen mit ^{13}C - ^{15}N markiertem A β (1-42) und nicht-markiertem PrP(23-144). Das Spektrum wurde bei 11 kHz MAS, -10°C und 30 ms Mischzeit aufgenommen. Es ist möglich viele der Resonanzen den verschiedenen AS zuzuordnen. Jedoch wird mehr als ein Satz an Resonanzen in dem Spektrum gefunden als A β AS enthält. Somit sind verschiedene A β -Konformere in den A β -PrP-Komplexen enthalten.

Tabelle 3.2: Anzahl der in der Sequenz vorhandenen Aminosäuren und Anzahl der gefundenen Resonanzen

Aminosäure	A	R	N	D	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	S	Y	V
Anz. in Seq.	4	1	1	3	1	3	6	3	3	2	2	1	3	2	1	6
Anz. gefunden	7	2	2	3	1	5	9	0	4	2	4	0	4	3	1	7

Das ließe sich entweder durch verschiedene strukturelle Anordnungen von A β erklären, die für die Komplexe benötigt würden, durch die Ausbildung von A β -Fibrillen oder dadurch, dass die Probe noch nicht komplett mit PrP(23-144) abgesättigt ist und deshalb noch Bindestellen unbesetzt sind. Letzteres wäre wahrscheinlich, da zu dem Zeitpunkt der Probenherstellung die A β /PrP-Stöchiometrien (siehe Kapitel 3.7.5) noch nicht bekannt waren und zur Herstellung der Probe 320 μ M A β und 40 μ M PrP(23-144) eingesetzt wurden, was einem Verhältnis entspricht, bei dem noch keine PrP-Sättigung vorhanden ist.

Eine 1 : 10 Verdünnung dieser FK-NMR-Probe, die vor den Waschschrritten entnommen wurde (vgl. 2.2.22.2), wurde zur weiteren Charakterisierung über Saccharose-DGZ und anschließende RP-HPLC-Messung analysiert (Abb. 3.29). Hierbei zeigt sich, dass ausschließlich in der untersten Fraktion des Gradienten Protein nachgewiesen werden kann. Dabei handelt es sich sowohl um ^{13}C - ^{15}N -A β (1-42) (Abb. 3.29 A oberhalb der 4,6 kDa-Markerbande) als auch um PrP(23-144) (Abb. 3.29 A auf Höhe der 15 kDa-Markerbande).

Es ist möglich, dass in den anderen Fraktionen noch geringe Mengen an A β oder PrP(23-144) vorhanden sind, die aufgrund der Verdünnung jedoch nicht nachgewiesen werden können. Dass der Komplex aus A β und PrP(23-144) ausschließlich in der untersten DGZ-Fraktion gefunden werden kann, spricht für die Ausbildung eines hochmolekularen Komplexes, bedingt durch die hohen Proteinkonzentrationen der Ausgangslösung. Die unterste Fraktion des Gradienten wurde über RP-HPLC untersucht (Abb. 3.29 B). Es können sowohl A β als auch PrP(23-144) in einem Verhältnis von 8,6 : 1 (einfache Messung) nachgewiesen werden. Ein Vergleich mit den in dieser Arbeit ermittelten Stöchiometrien (siehe Kapitel 3.7.5) bestätigt eine noch nicht vollständige Sättigung mit PrP(23-144).

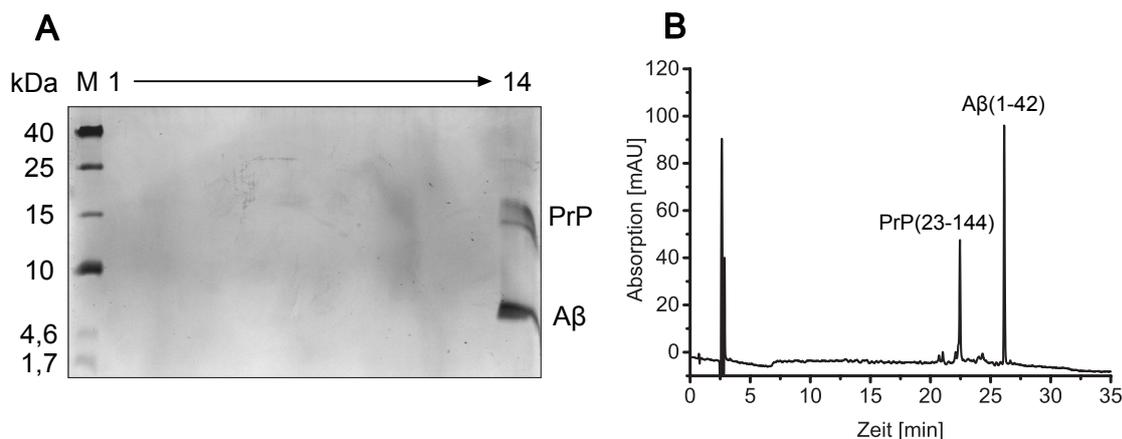


Abbildung 3.29: Verteilung der FK-NMR-Probe im Saccharosedichtegradienten. Eine 1 : 10 Verdünnung der FK-NMR-Probe generiert aus 320 μM A β und 40 μM PrP(23-144) wurde über eine Saccharose-DGZ aufgetrennt und über ein mit Silber gefärbtes Tris-Tricin-SDS-Gel visualisiert (A). PrP(23-144) und A β können ausschließlich in der untersten Fraktion gefunden werden. Diese Fraktion wurde über RP-HPLC analysiert (B). Es wird ein Verhältnis von 8,6 A β : 1 PrP(23-144) erhalten.

Trotz der erhöhten Anzahl an Resonanzen in dem PDS-D-Spektrum der A β -PrP-Komplexe mit ^{13}C - ^{15}N markiertem A β (Abb. 3.28) ist eine partielle Zuordnung der Signale möglich (siehe Abb. 3.30). Manche Resonanzen können sicher einer Aminosäure zugewiesen werden; in den Regionen AS 3 - 5, 8 - 10 sowie 20 - 31 gibt es jedoch mehrere Sätze an Resonanzen, teilweise bis zu drei pro Aminosäure, woraus sich potentiell drei unterschiedliche A β -Konformere ergeben (Abb. 3.30). Es fehlen die Zuordnungen der Histidine (aus den oben genannten Gründen) sowie die des Methionins. Mit Fragezeichen markierte Zuordnungen sind vermutete Verknüpfungen, die anhand dieser Probe jedoch nicht sicher zugewiesen werden können. Alle Reste, deren chemische Verschiebungen sich weniger als 2 ppm von Literaturwerten unterscheiden, sind farblich markiert. Hierbei wurden immer CO-, CA- und CB-Werte zugrunde gelegt. Grün stellt einen Vergleich mit Ravotti et al. [149], Gelb mit Werten von Gremer et al. [27] und Pink einen Vergleich mit Werten von Lendel et al. [150] dar. Bei den angegebenen Studien wurden entweder hexamere Bausteine von A β -Protofibrillen ohne PrP [150] oder A β -Fibrillen [27, 149] untersucht. Für die Aminosäuren, die links in der Abbildung (Abb. 3.30) mit einem Fragezeichen und einem farbigen Kasten markiert sind, liegen keine Literaturwerte vor; bei Lendel et al. fehlt folglich der N-Terminus.

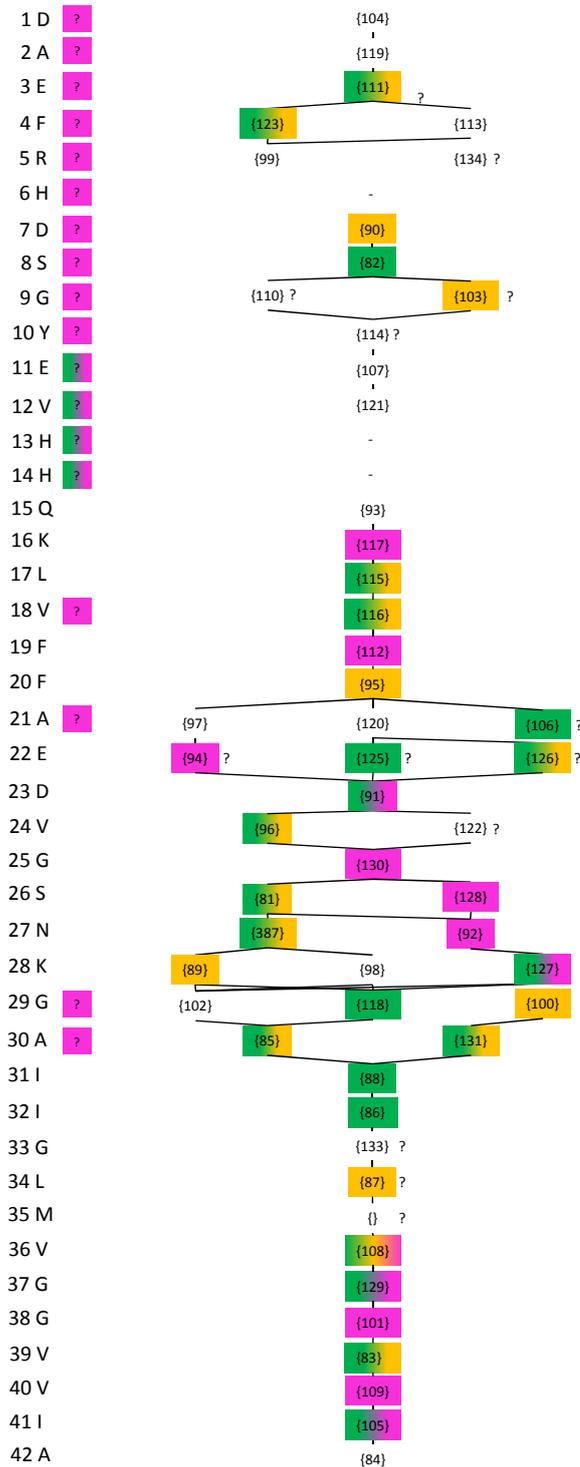


Abbildung 3.30: Verschiedene A β -Konformere innerhalb der A β -PrP-Komplexe und deren Verknüpfungen. Für die Regionen AS 3 - 5, 8 - 10 und 20 - 31 wurden mehrere Sätze an Resonanzen im korrespondierenden PDS-Spektrum gefunden. Die Zahlen (rechts) geben die Nummer des Spinsystems an und sind wichtig für den Verlauf der Zuordnung. Die Farben markieren Gemeinsamkeiten mit Literaturwerten. Grün: [149], Pink: [150], Gelb: [27].

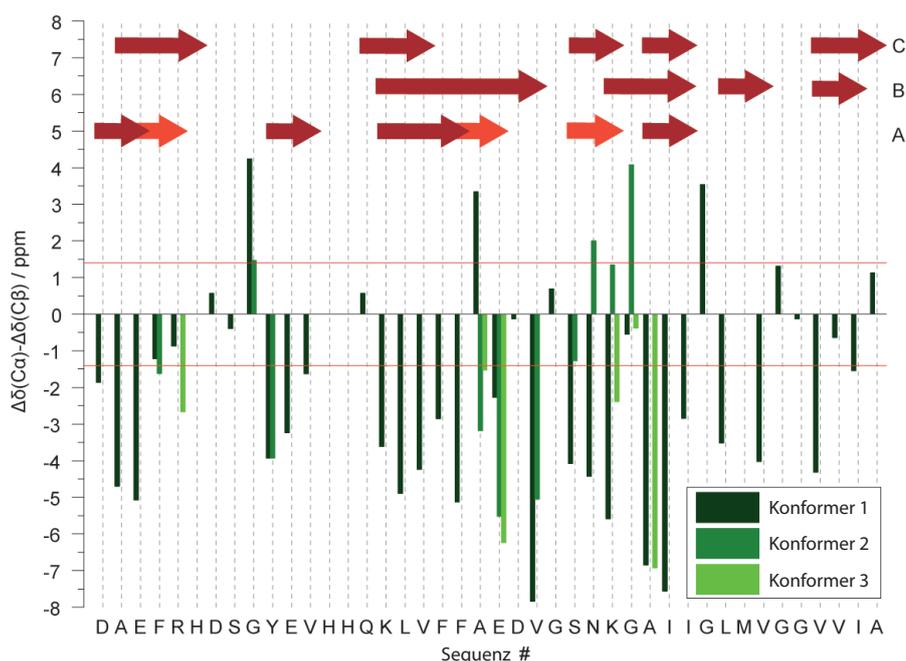


Abbildung 3.31: Sekundäre chemische Verschiebungen der A β -Konformere innerhalb der A β -PrP-Komplexe berechnet aus der Differenz der CA- und CB-Verschiebungen abzüglich der *random coil* Werte. In den Spektren (u.a. Abb. 3.28) konnten bis zu drei Signalsätze erkannt werden, die sich zuordnen ließen. Für alle drei möglichen A β -Konformere (grün) wurde berechnet, in welchen Bereichen α -Helices oder β -Faltblätter vorliegen. Hierfür wurden die *random coil* Werte nach Wishart et al. [145] herangezogen. In A ist das Ergebnis der vorliegenden Studie gezeigt, wobei dunkelrote Pfeile β -Faltblätter symbolisieren, die in allen Konformeren enthalten sind, und hellrote solche, die nur in einzelnen Konformeren vorkommen. B ist der Vergleich mit Lendel et al. [150] und C der Vergleich mit Ravotti et al. [149].

In einer weiteren Analyse wurden durch Anna König die sekundären chemischen Verschiebungen berechnet (Abb. 3.31). Hierbei wurden die *random coil* Verschiebungen der verschiedenen Aminosäuren (nach Wishart et al. [145]) von den jeweiligen gemessenen CA- und CB-Verschiebungen subtrahiert und anschließend die Differenz gebildet. Sofern drei oder mehr Werte hintereinander kleiner als -1,4 sind, liegt ein β -Faltblatt vor, bei drei oder mehr Werten hintereinander größer als +1,4 eine α -Helix (Abb. 3.31, rote Linien). Die verschiedenen Grüntöne kennzeichnen die unterschiedlichen A β -Konformere und die roten Pfeile stellen β -Faltblätter dar. Hierbei bezeichnet A die hier vorliegende Studie (Abb. 3.31). Dunkelrote Pfeile kennzeichnen die β -Faltblätter, die in allen Konformeren vorhanden sind und hellrote Pfeile jene β -Faltblätter, die nur in einzelnen Konformeren enthalten sind. Bei B sind die sekundären chemischen Verschiebungen von hexameren Bausteinen für A β -Protofibrillen gezeigt [150] und C stellt die sekundären chemischen Verschiebungen von A β -Fibrillen dar [149]. Interessanterweise passen die Werte des einen

Konformers mehr zu den Protofibrillen, die eines anderen Konformers mehr zu den Daten der Fibrillen (vgl. Abb. 3.30 und Abb. 3.31). Nach diesen Untersuchungen und Erkenntnissen wurde eine weitere FK-NMR-Probe hergestellt, bei der ebenfalls A β die markierte Spezies ist und PrP(23-144) im deutlichen Überschuss zugegeben wird, um sicher alle A β -Bindestellen abzudecken (156,51 μ M A β mit 78,25 μ M PrP(23-144)). Mit Hilfe von RP-HPLC-Messungen der A β -PrP-Komplexe konnte eine A β /PrP-Stöchiometrie von $3,70 \pm 0,12$ nachgewiesen werden und verifiziert die Stöchiometrie, bei der eine PrP-Sättigung vorliegt (vgl. Kapitel 3.7.5). Mit dieser Probe soll untersucht werden, ob erneut mehr Resonanzen erhalten werden als Aminosäuren in der Sequenz enthalten sind und folglich das Vorhandensein verschiedener A β -Konformere für die Bildung von A β -PrP-Komplexen unabdingbar ist oder ob nun eine eindeutige Zuordnung erhalten werden kann, weil es nur ein A β -Konformer innerhalb der Komplexe gibt.

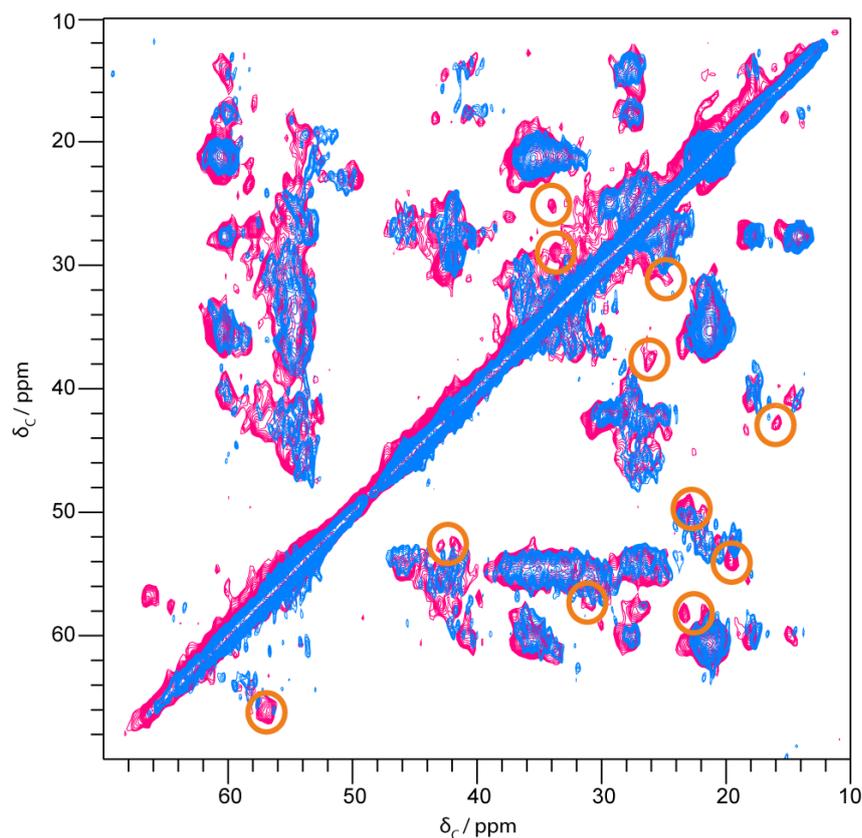


Abbildung 3.32: PDS-D-Spektren von A β -PrP(23-144)-Komplexen mit ^{13}C - ^{15}N markiertem A β (1-42) und nicht-markiertem PrP(23-144). Beide PDS-D-Spektren wurden bei 11 kHz MAS, -10°C und 50 ms Mischzeit aufgenommen. Pink: Spektrum bei einem PrP(23-144)-Unterschuss (600 MHz Spektrometer), Blau: Spektrum bei einem PrP(23-144)-Überschuss (800 MHz Spektrometer). Unterschiede sind mit orangenen Kreisen markiert.

Das resultierende PDSD-Spektrum (Abb. 3.32 blau) wurde mit dem der vorherigen Probe mit PrP-Unterschuss (Abb. 3.32 pink) verglichen. Viele Signale überlappen und zeigen somit keine Veränderung. Doch bei manchen Resonanzen können Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben beobachtet werden (Abb. 3.32 orangene Kreise). Diese Resonanzen können den Aminosäuren Alanin, Isoleucin, Valin, Lysin, Serin, Asparagin, Glutamin und Aspartat zugewiesen werden, also einigen der AS, für die mit der vorherigen Probe mehr Resonanzen gefunden wurden als A β AS besitzt. Bei allen Unterschieden handelt es sich -wie erhofft- um ein „Verschwinden“ oder ein Verschieben der Signale in der Probe mit PrP-Überschuss. Neue Resonanzen werden hingegen nicht gefunden. Es ist jedoch zu früh für ein abschließendes Urteil, da zum Zeitpunkt des Schreibens dieser Arbeit lediglich erste Messungen mit der neuen Probe angefertigt wurden und noch weitere Messungen durchgeführt werden müssen. Somit liegt auch noch keine Zuordnung der Resonanzen für diese Probe vor. Dennoch erscheint die neue Probe vielversprechend für einen detaillierteren Einblick in die strukturellen Eigenschaften der A β -PrP(23-144)-Komplexe.

3.8 Einfluss des Inhibitors Chicago Sky Blue auf die A β -PrP-Interaktion

Im Jahr 2015 identifizierten Risse et al. bei einem *high-throughput screening* die Substanz „Chicago Sky Blue 6B“ als erstes kleines Molekül, welches die A β -PrP-Interaktion unterbrechen kann [103] (Struktur: Abb. 3.33 A). Hierbei bindet Chicago Sky Blue 6B (CSB) das Prion-Konstrukt PrP(23-231) in einem 3 : 1 Verhältnis. Für diese Arbeit ist CSB insofern interessant, als dass die Auswirkung auf die A β - bzw. PrP-Verteilung in einem Dichtegradienten nach Zugabe eines Inhibitors untersucht werden kann. Hierbei dienen die Untersuchungen mit CSB u.a. als Vorversuch für die Analysen mit A β -bindenden D-Peptiden, welche ebenfalls mit Hinblick auf ihr Potential die A β -PrP-Interaktion zu unterbinden, analysiert werden sollen (siehe Kapitel 3.9).

Es wurden zwei verschiedene CSB : PrP Verhältnisse untersucht. Zum einen das in der Literatur genannte 3 : 1 Verhältnis sowie ein 1,5 : 1 Verhältnis, um zu untersuchen, ob ein CSB-konzentrationsabhängiger Unterschied in den A β - und PrP-Verteilungen im Dichtegradienten erkennbar ist. Zusätzlich wurden zwei verschiedene Reihenfolgen gewählt, mit der A β , PrP und CSB vermischt wurden.

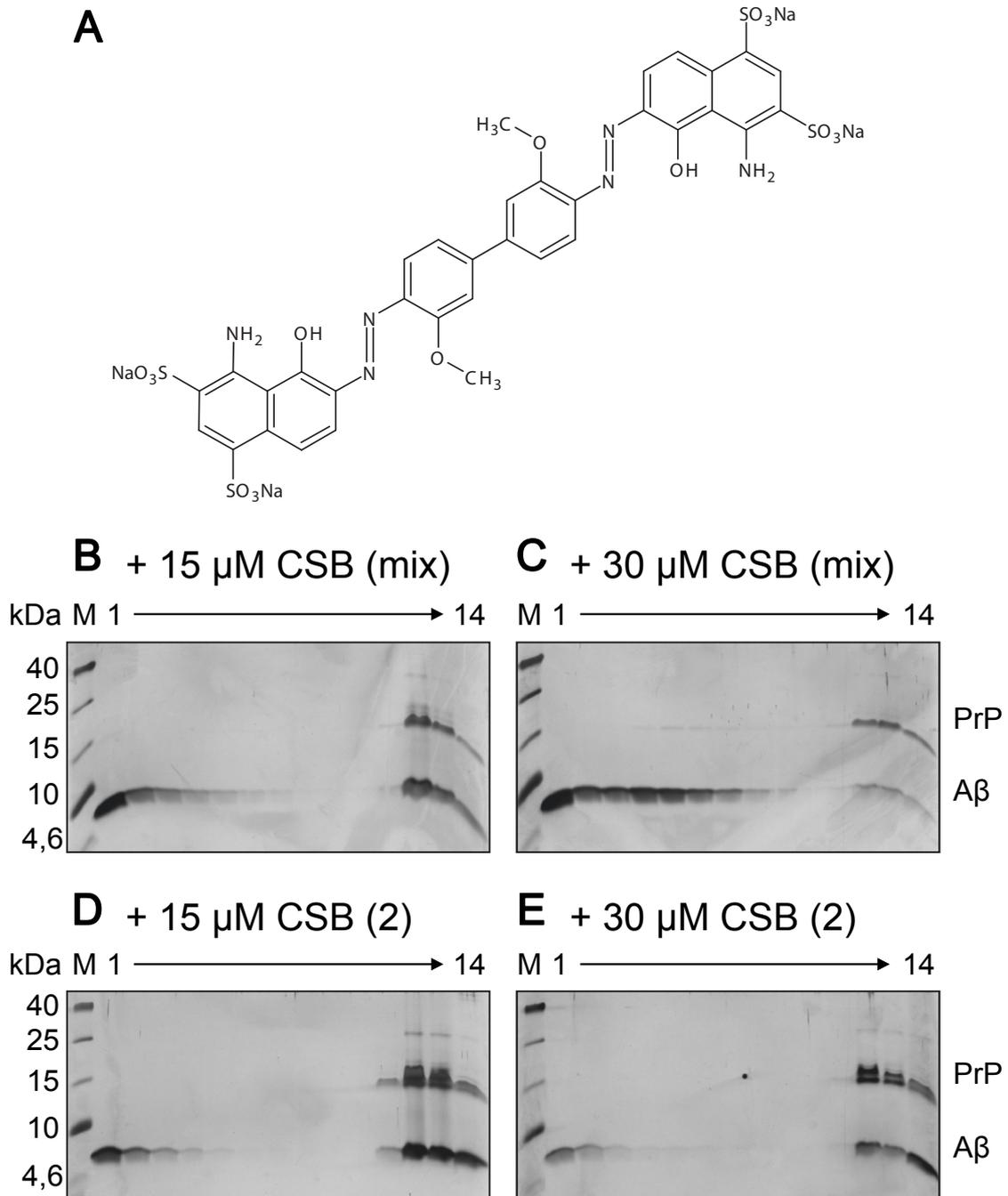


Abbildung 3.33: Verteilung von PrP(23-144) mit A β (1-42) in Anwesenheit von Chicago Sky Blue 6B (CSB) im Saccharosedichtegradienten. Strukturformel von CSB (A), mit Silber gefärbte Tris-Tricin-SDS-PAGE-Gele nach DGZ-Untersuchungen bei einem Vermischen (Anmerkung „(mix)“) von CSB und PrP(23-144) vor Zugabe zu A β -Oligomeren (B) und (C) sowie bei später Zugabe (Anmerkung „(2)“) von CSB zu bereits gebildeten A β -PrP-Komplexen (D) und (E). Es wurden entweder 15 μ M oder 30 μ M CSB sowie 10 μ M PrP(23-144) und 80 μ M A β eingesetzt. CSB ist in den mit Silber gefärbten Gelen nicht zu erkennen.

Entweder wurden PrP und CSB gemischt, für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und gemeinsam auf 2,5 h vorinkubiertes A β gegeben und alles zusammen für weitere 30 min inkubiert (Abb. 3.33 B und C). Alternativ wurde zunächst der A β -PrP-Komplex gebildet, indem A β oligomerisiert, PrP nach 2 h hinzugefügt und zuletzt CSB nach weiteren 30 min für 30 min zu der Lösung gegeben wurde (Abb. 3.33 D und E). Mit letzterer Methode soll untersucht werden, ob bereits bestehende A β -PrP-Komplexe durch CSB dissoziiert werden können.

Für die Untersuchungen wurden das Konstrukt PrP(23-144) bei einer Konzentration von 10 μ M sowie 80 μ M A β in der Ausgangslösung verwendet. CSB ist in den hier gezeigten mit Silber gefärbten Tris-Tricin-SDS-PAGE-Gelen nicht zu erkennen (Abb. 3.33). Werden CSB und PrP(23-144) gemischt und simultan auf A β -Oligomere gegeben (Abb. 3.33 B und C), so sind CSB-konzentrationsabhängige Unterschiede erkennbar. Während mit der niedrigeren CSB-Ausgangskonzentration deutlich mehr Protein (sowohl A β als auch PrP(23-144)) in den Fraktionen 12 bis 14 nachgewiesen werden kann, sind diese Proteinmengen in den Fraktionen 12 bis 14 bei Verwendung von 30 μ M CSB reduziert. Gleichzeitig erinnert die A β -Verteilung bei höherer CSB-Konzentration an die Verteilung der A β -Kontrolle (siehe Kapitel 3.6.3, Abb. 3.16). Dies bedeutet, dass wesentlich mehr A β -Oligomere noch in den Fraktionen 4 bis 6 enthalten sind. Bei der Verwendung von 15 μ M CSB hingegen, ist ein Großteil der A β -Oligomere in eben jenen Fraktionen kaum nachweisbar (Abb. 3.33 B).

Werden die Ergebnisse bei später CSB-Zugabe miteinander verglichen (Abb. 3.33 D und E), ist zu erkennen, dass mit beiden CSB-Ausgangskonzentrationen A β -PrP-Komplexe gebildet wurden, erkennbar an den A β - und PrP(23-144)-Banden in den Fraktionen 12 bis 14. Folglich kann CSB bereits gebildete A β -PrP-Komplexe in der hier untersuchten Zeit nicht wieder trennen. Quantitative RP-HPLC-Messungen ergaben, dass insbesondere bei einem Vermischen von PrP(23-144) mit CSB die PrP(23-144)-Ausbeuten sehr niedrig waren (nur 17 - 35 %). Auch bei genauerer Betrachtung der Tris-Tricin-SDS-PAGE-Gele ist zu erkennen, dass die PrP(23-144)-Banden bei später CSB-Zugabe intensiver sind, als bei einem Vermischen von PrP(23-144) mit CSB (Abb. 3.33). Warum weniger PrP nachgewiesen werden konnte, ist anhand dieser Messungen nicht erklärbar. Dieser Versuch wurde lediglich einmal durchgeführt, um einen ersten Eindruck von der Wirkung eines Inhibitors auf die A β -PrP-Interaktion bezüglich der Proteinverteilungen im Dichtegradienten zu bekommen. Um genauere Aussagen über CSB machen zu können, müssten weitere Versuche durchgeführt werden. Dennoch unterstützen diese Ergebnisse die in der Publikation gezeigten Befunde [103], da auch hier nach Bindung von PrP(23-144) und CSB kein bzw. deutlich weniger A β durch PrP gebunden wurde.

3.9 Einfluss von D-Peptiden auf die A β -PrP-Interaktion

Neben der Charakterisierung der A β -PrP-Interaktion soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob diese Bindung beeinflusst werden kann. Das einzige kleine Molekül, das bisher bekannt ist diese Interaktion zu verhindern, ist Chicago Sky Blue 6B, wie im vorigen Kapitel beschrieben (siehe Kapitel 3.8).

An dem „Institute of Complex Systems Strukturbiochemie (ICS-6), Forschungszentrum Jülich GmbH“ sowie dem „Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ werden D-enantiomere Peptide, nachfolgend D-Peptide genannt, untersucht. Diese dort selektierten D-Peptide binden A β -Oligomere mit hoher Affinität unter Ausbildung amorpher, nicht-toxischer Aggregate mit hoher molekularer Masse [115, 128]. Aufgrund der Stereoselektivität der im menschlichen Körper vorkommenden Enzyme haben D-Peptide eine längere Verweildauer als L-enantiomere Peptide und sind somit als mögliche Therapeutika gegen Alzheimer geeignet [109, 117, 151]. Ein detaillierter Überblick zu D-Peptiden als Wirkstoff gegen Alzheimer ist dem gleichnamigen Kapitel 1.6 zu entnehmen.

In dieser Arbeit wurden 12 bzw. 24 AS lange, mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierte D-Peptide untersucht. Die Markierung mittels FITC erlaubt die Detektion des jeweiligen Peptids über Fluoreszenz, sowohl in ungefärbten Tris-Tricin-SDS-PAGE-Gelen als auch bei RP-HPLC-Messungen. Diese Markierung ist notwendig, da die D-Peptide aufgrund ihrer Größe und mangels aromatischer AS im eingesetzten Konzentrationsbereich nur sehr schwach nachgewiesen werden können.

Zur Untersuchung des Einflusses der D-Peptide auf die A β -PrP-Interaktion wurden diese mittels Dichtegradientenzentrifugation (DGZ) und anschließender Tris-Tricin-SDS-PAGE sowie RP-HPLC-Messungen aller DGZ-Fractionen analysiert. Zur Beurteilung der Wirksamkeit des D-Peptids kann die A β - bzw. PrP-Verteilung im Dichtegradienten sowie das A β /PrP-Verhältnis in entstandenen Komplexen herangezogen werden. Beeinflusst das D-Peptid die A β -PrP-Interaktion, so sollte weniger PrP in den Komplexen gebunden werden, da die D-Peptide mit PrP um die Bindung zu A β -Oligomeren konkurrieren. Dies ließe sich durch eine erhöhte Konzentration von monomerem PrP in den oberen DGZ-Fractionen (ca. 1 bis 3) sowie durch ein größeres A β /PrP-Verhältnis in den hochmolekularen A β -PrP-Komplexen nachweisen.

3.9.1 Einfluss des D-Peptids RD2-FITC

Als erstes wurde das 12 AS lange D-Peptid RD2-FITC untersucht, indem zunächst die Kontrollen durchgeführt wurden. Hierfür wurde sowohl die Verteilung von RD2-FITC allein als auch die Verteilung von RD2-FITC in Anwesenheit von PrP(23-144) im Dichtegradienten analysiert. Würde RD2-FITC mit PrP(23-144) bereits hochmolekulare Aggregate bilden, so könnte zwischen der Bindung von RD2-FITC an A β oder an PrP(23-144) nicht unterschieden werden, was weitere Untersuchungen hinfällig machen würde.

3.9.1.1 Kontrollen

40 μ M RD2-FITC allein wurde mittels Saccharose-DGZ aufgetrennt und anschließend über Fluoreszenzdetektion nach erfolgter Tris-Tricin-SDS-PAGE nachgewiesen (Abb. 3.34 A). RD2-FITC ist hauptsächlich in den ersten beiden DGZ-Fractionen vorhanden, kann aber auch in den Fraktionen 3 und 4 schwach detektiert werden. In allen weiteren Fraktionen kann kein RD2-FITC beobachtet werden. Folglich bleibt dieses löslich und bildet unter den untersuchten Bedingungen keine unlöslichen Bestandteile.

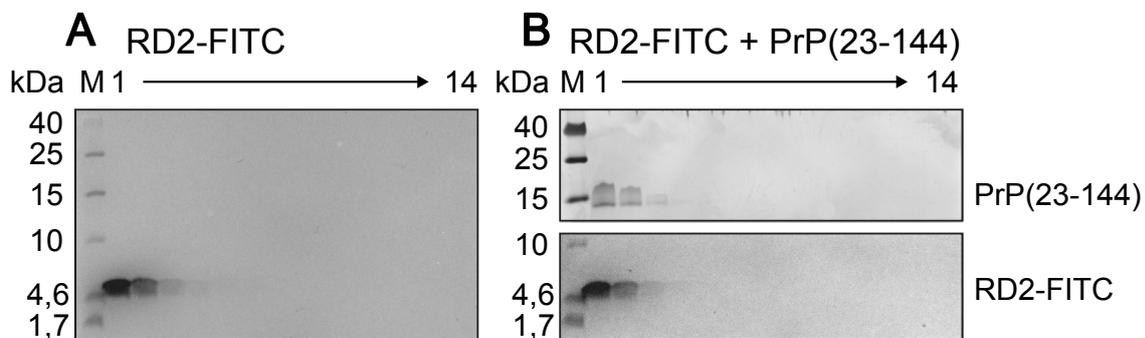


Abbildung 3.34: Verteilung von 40 μ M RD2-FITC allein oder 40 μ M RD2-FITC mit 10 μ M PrP(23-144) im Saccharosedichtegradienten. Fluoreszenzaufnahme des Tris-Tricin-SDS-PAGE-Gels von RD2-FITC allein (A). RD2-FITC allein kann in den oberen DGZ-Fractionen 1 bis 4 verifiziert werden. Fluoreszenzaufnahme (B, unten) und Silberfärbung (B, oben) desselben Tris-Tricin-SDS-PAGE-Gels zur Untersuchung von 40 μ M RD2-FITC mit 10 μ M PrP(23-144) in der Ausgangslösung. Sowohl PrP(23-144) als auch RD2-FITC können in den Fraktionen 1 bis 4 nachgewiesen werden und bilden keine hochmolekularen Aggregate.

Werden 40 μ M RD2-FITC und 10 μ M PrP(23-144) für 30 min zusammen bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über Saccharose-DGZ aufgetrennt (Abb. 3.34 B), so ist die Verteilung analog zu den Untersuchungen von RD2-FITC allein (Abb. 3.34 A) und PrP(23-144) allein (Abb. 3.17 B). Sowohl RD2-FITC als auch PrP(23-144) werden in den oberen vier DGZ-Fractionen nachgewiesen, insbesondere in den ersten beiden. Um PrP(23-144) und RD2-FITC in demselben Gel nachweisen zu können, wurde zunächst die Fluoreszenz nach erfolgter Elektrophorese detektiert und das Gel anschließend mit Silber gefärbt. Ob eine Bindung zwischen RD2-FITC und PrP(23-144) stattfindet, kann anhand dieser Ergebnisse nicht beurteilt werden, da dieser Versuch kein Bindungsassay ist. Festzuhalten bleibt, dass RD2-FITC und PrP(23-144) zusammen keine hochmolekularen Aggregate bilden, welche sonst in den unteren Fraktionen 11 bis 14 hätten gefunden werden müssen. Es wurde schon in der Vergangenheit gezeigt, dass das Hinzufügen von RD2 zu oligomerem A β in der Bildung hochmolekularer, nicht toxischer Aggregate resultiert [118], weshalb diese Kontrollen in der vorliegenden Arbeit nicht wiederholt wurden.

3.9.1.2 Verteilung von A β (1-42) mit PrP(23-144) und RD2-FITC

Werden 10 μ M PrP(23-144) und 40 μ M RD2-FITC zunächst miteinander gemischt und für 30 min gemeinsam auf 2 h vorinkubiertes (oligomerisiertes) A β gegeben, so entsteht eine Verteilung im Dichtegradienten wie unter Abbildung 3.35 A und B dargestellt. PrP(23-144) kann ausschließlich in den unteren Fraktionen 11 bis 14 nachgewiesen werden. RD2-FITC ist sowohl in den oberen Fraktionen 1 bis 4 als auch in den unteren Fraktionen 11 bis 14 vorhanden (Abb. 3.35 B blau). Hierbei befinden sich etwa 40 - 50 % des verifizierten D-Peptids in den Fraktionen 11 bis 14. Bei Betrachtung von A β fällt auf, dass dieses sich mit 94 - 97 % fast ausschließlich in den Fraktionen 11 bis 14 befindet. Maximal 20 - 27 μ M können hierbei in den Fraktionen 12 und 13 pro Fraktion nachgewiesen werden. In Fraktion 1 befinden sich maximal 2,5 μ M A β (Abb. 3.35 B).

Beim Vergleich der A β -Verteilung in Gegenwart von 10 μ M PrP(23-144) in der Ausgangslösung mit und ohne RD2-FITC (siehe Kapitel 3.7.2) fällt auf, dass mit RD2-FITC insgesamt mehr A β komplexiert und in den Fraktionen 11 bis 14 nachgewiesen werden kann. So wurden ohne RD2-FITC maximal 17 μ M A β in den Fraktionen 11 bis 14 pro Fraktion nachgewiesen, während sich noch 7,5 - 10 μ M A β in Fraktion 1 befanden (Abb. 3.19 G). Dies liegt daran, dass in Anwesenheit von 10 μ M PrP(23-144) nicht alles A β gebunden wird und noch Bindestellen frei bleiben, wie in Kapitel

3.7.2 und 3.7.5 beschrieben. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente mit RD2-FITC waren die A β /PrP-Stöchiometrien mit 40 μ M PrP(23-144) jedoch noch nicht bekannt. Zum Vergleich und zur Überprüfung, ob RD2-FITC das Potential besitzt die A β -PrP-Interaktion zu beeinflussen, wurde deshalb die PrP(23-144)-Konzentration auf 40 μ M erhöht und der Versuch erneut in Dreifachbestimmung durchgeführt (Abb. 3.35 C und D).

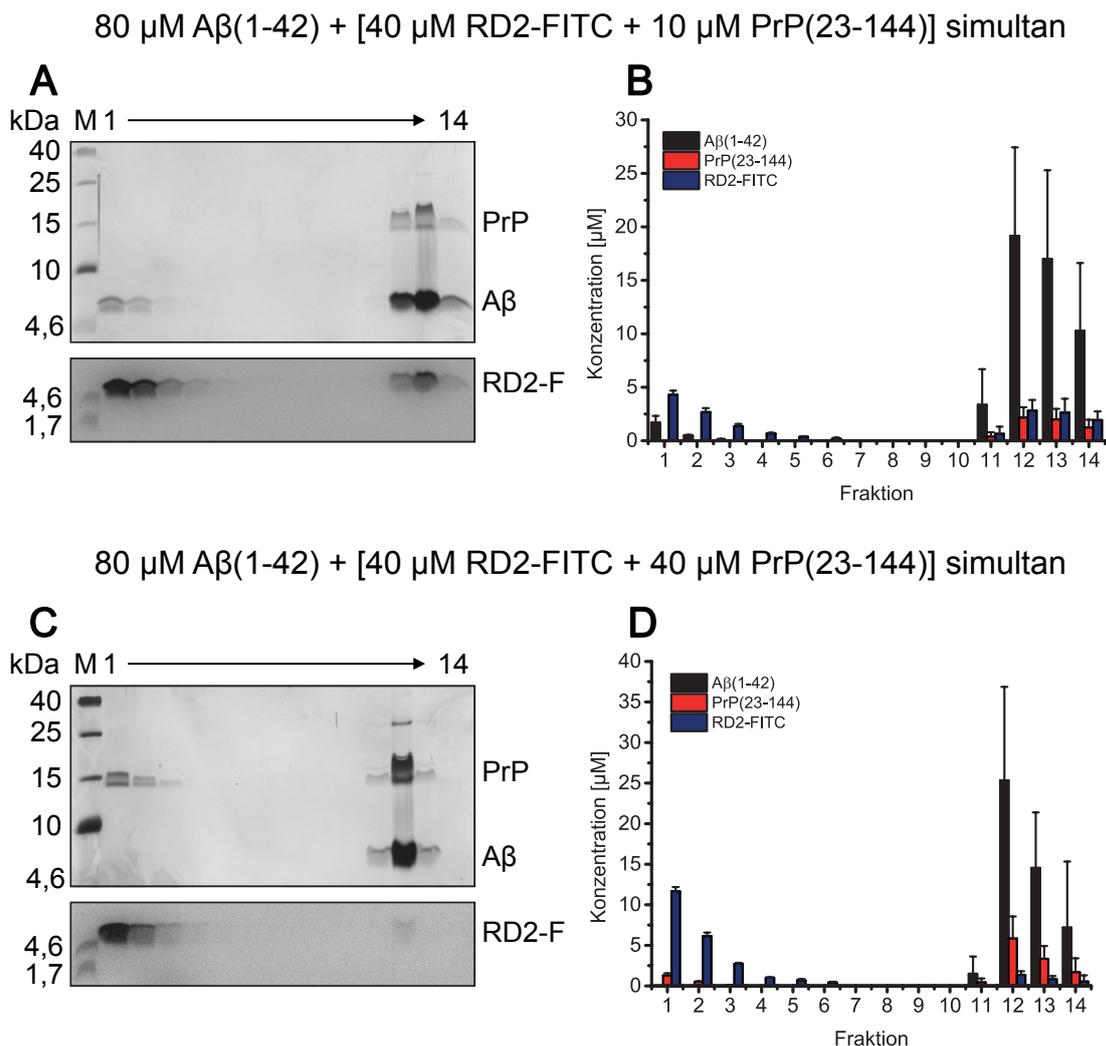


Abbildung 3.35: Verteilung von A β , PrP(23-144) und RD2-FITC im Saccharosedichtegradienten bei verschiedenen PrP(23-144)-Konzentrationen. 40 μ M RD2-FITC (RD2-F) wurde entweder mit 10 μ M (A, B) oder 40 μ M PrP(23-144) (C, D) gemischt und gemeinsam auf 80 μ M vorinkubiertes A β gegeben. Die Verteilungen im Dichtegradienten sind in den Tris-Tricin-SDS-PAGE-Gelen (A, C) sowie den RP-HPLC-Analysen (B, D) dargestellt. Mit steigender PrP(23-144)-Konzentration in der Ausgangslösung ist weniger RD2-FITC in den Fraktionen 11 - 14 enthalten.

Nach Mischen von 40 μ M RD2-FITC mit 40 μ M PrP(23-144) und simultaner Zugabe zu inkubiertem A β wurde eine Verteilung im Dichtegradienten, wie in Abbildung 3.35 C und D dargestellt, erhalten. Mit 83 - 88 % kann der Großteil des PrP(23-144) in den Fraktionen 11 bis 14 verifiziert werden. Auch in den Fraktionen 1 bis 3 ist PrP(23-144) nachweisbar, da dieses sich bei der untersuchten Konzentration im Überschuss befindet (vgl. Kapitel 3.7.2 und 3.7.5). Mit 87 - 89 % PrP(23-144) in den Fraktionen 11 bis 14 ohne RD2-FITC-Zugabe (siehe Kapitel 3.7.2) liegen diese PrP(23-144)-Mengen innerhalb der Standardabweichung der Werte bei RD2-FITC-Zugabe. Folglich ist kein Unterschied in der PrP(23-144)-Verteilung erkennbar.

Bei der RD2-FITC-Verteilung fällt auf, dass lediglich 10 % des D-Peptids in den Fraktionen 11 bis 14 vorhanden sind. Der Großteil befindet sich in den Fraktionen 1 bis 3 mit etwa 12,5 μ M in Fraktion 1 und ca. 6 μ M RD2-FITC in Fraktion 2 (Abb. 3.35 D). Folglich befindet sich bei gleicher eingesetzter RD2-FITC-Konzentration in Anwesenheit von 40 μ M PrP(23-144) weniger RD2-FITC in den Fraktionen 11 bis 14 als mit 10 μ M PrP(23-144). Eine Verdrängung des PrP(23-144) durch RD2-FITC findet somit nicht statt. Dies ist auch anhand der A β /PrP-Stöchiometrien erkennbar (s. u.). Durch die hohen Konzentrationen an PrP(23-144) sowie RD2-FITC wird alles A β komplexiert und befindet sich gänzlich in den Fraktionen 11 bis 14.

Um herauszufinden, ob die Reihenfolge der Zugabe von PrP(23-144) bzw. RD2-FITC zu A β -Oligomeren einen Einfluss auf das Ergebnis hat, wurden Versuche durchgeführt, bei denen entweder RD2-FITC als erstes und PrP(23-144) als zweites auf inkubiertes A β gegeben wurden und umgekehrt. Hierbei wurden jeweils 40 μ M RD2-FITC sowie 10 μ M PrP(23-144) in der Ausgangslösung verwendet. Es konnten jedoch keine Unterschiede festgestellt werden. Diese Versuche wurden nur einmal durchgeführt und werden hier deshalb auch nicht gezeigt, da andere Versuche vielversprechender sind.

3.9.1.3 Verteilung von A β (1-42) mit PrP(23-144) und 500 μ M RD2-FITC

Als letzte Versuchsreihe mit RD2-FITC wurde die RD2-FITC-Konzentration auf 500 μ M erhöht, um zu überprüfen, ob RD2-FITC durch einen deutlichen Überschuss mit PrP(23-144) um die Bindestellen auf A β -Oligomeren konkurrieren kann. Hierfür wurde 80 μ M A β für 2 h inkubiert, bevor das RD2-FITC zugegeben und weitere 30 min später auch 10 μ M PrP(23-144) hinzugefügt wurde. Nach weiteren 30 min erfolgte die Auftrennung der Probe durch eine Saccharose-DGZ.

A β wurde gänzlich komplexiert und befindet sich in den DGZ-Fractionen 11 bis 14 (Abb. 3.36). Bei der PrP(23-144)-Verteilung ist zu erkennen, dass sich dieses zwar zum Großteil in den Fractionen 11 bis 14 befindet (Abb. 3.36), dennoch kann auch in den Fractionen 1 bis 3 PrP(23-144) verifiziert werden (Abb. 3.36 A roter Kasten, C). Die Konzentration an PrP(23-144) beträgt in Fraction 1 jedoch höchstens 0,4 μ M (Abb. 3.36 C). Bei Abwesenheit von RD2-FITC und Einsatz von 10 μ M PrP(23-144) in der Ausgangslösung befindet sich dieses ausschließlich in den unteren Gradientenfractionen (vgl. Kapitel 3.7.2). RD2-FITC kann im gesamten Gradienten nachgewiesen werden, mit höchsten Konzentrationen von 155 μ M und 85 μ M in den ersten beiden Fractionen, da das D-Peptid deutlich im Überschuss eingesetzt wurde. Etwa 9 % des RD2-FITC befinden sich in den Fractionen 11 bis 14. Zwar kann ein Einfluss auf die A β -PrP-Interaktion gezeigt werden, auch erkennbar an den erhaltenen A β /PrP-Stöchiometrien (s.u.), doch sind dafür mit 500 μ M RD2-FITC sehr hohe Peptidkonzentrationen nötig, die eine Bindung von PrP(23-144) an A β dennoch nicht verhindern können. Folglich wurden weitere A β bindenden D-Peptide analysiert, mit Hinblick auf eine höhere Effektivität (siehe Kapitel 3.9.2).

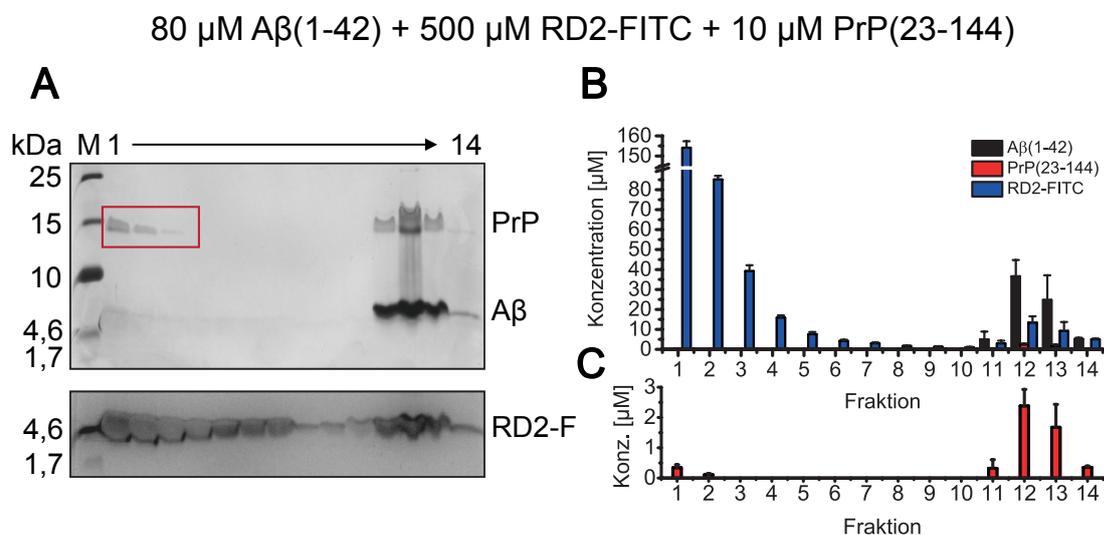


Abbildung 3.36: Verteilung von A β , PrP(23-144) und RD2-FITC im Saccharose-dichtegradienten bei einer RD2-FITC-Konzentration von 500 μ M. Die Proteinverteilungen sind durch Tris-Tricin-SDS-PAGE (A) sowie nach RP-HPLC-Analyse (B und C) dargestellt. Mit dieser sehr hohen RD2-FITC-Konzentration in der Ausgangslösung kann PrP(23-144) auch in den oberen Fractionen 1 - 3 nachgewiesen werden (A roter Kasten, C). Dennoch wird die Bindung von PrP(23-144) an A β nicht komplett verhindert.

3.9.1.4 Stöchiometrien der A β -PrP(23-144)-Komplexe in Anwesenheit von RD2-FITC

Für einen Überblick des Einflusses von RD2-FITC auf die A β -PrP-Interaktion sind die erhaltenen A β /PrP-Stöchiometrien in Tabelle 3.3 aufgelistet. (1) bzw. (2) beschreibt die Reihenfolge der Zugabe der angegebenen Substanz zu vorinkubiertem A β . Andernfalls wurden PrP(23-144) und RD2-FITC gemischt und simultan auf vorinkubiertes 80 μ M A β (1-42) gegeben.

Werden 10 μ M PrP(23-144) und 40 μ M RD2-FITC gemischt und gemeinsam zu A β gegeben, so wird eine A β /PrP-Stöchiometrie von $8,6 \pm 0,2$ innerhalb der Komplexe erhalten (Tabelle 3.3, erste Spalte). Beim Vergleich mit der A β /PrP-Stöchiometrie bei derselben eingesetzten PrP(23-144)-Konzentration ohne RD2-FITC-Zugabe mit einem Wert von $8,3 \pm 1,1$ (vgl. Tabelle 3.1) ist kein Unterschied erkennbar. Auch bei Vergleich der A β /PrP-Stöchiometrien mit 40 μ M PrP(23-144) mit und ohne 40 μ M RD2-FITC mit Werten von $4,4 \pm 0,2$ bzw. $3,93 \pm 0,04$ (siehe Tabellen 3.1 und 3.3) ist lediglich ein leichter Anstieg der Stöchiometrie um 0,2 - 0,6 bei RD2-FITC-Anwesenheit erkennbar.

Erst bei Verwendung von 500 μ M RD2-FITC, bei dem zuerst das D-Peptid, danach 10 μ M PrP(23-144) zu A β hinzugefügt wurden, wird ein von der Stöchiometrie ohne D-Peptid abweichendes A β /PrP-Verhältnis erhalten. Hier liegt dieses Verhältnis bei $15,1 \pm 0,4$, verglichen mit $8,3 \pm 1,1$. Jedoch sind hierfür mit 500 μ M RD2-FITC sehr hohe Konzentrationen nötig, die eine Bindung von PrP(23-144) an A β dennoch nicht verhindern, weshalb nach weiteren effektiveren D-Peptiden gesucht wurde.

Tabelle 3.3: Mittelwerte und Standardabweichungen der A β /PrP(23-144)-Stöchiometrien innerhalb der A β -PrP-Komplexe aus den Dichtegradientenfraktionen 11 - 14 bei verschiedenen RD2-FITC- und PrP(23-144)-Konzentrationen. Es wurden immer 80 μ M A β verwendet.

	40 μ M RD2 + 10 μ M PrP	40 μ M RD2 + 40 μ M PrP	500 μ M RD2 (1) + 10 μ M PrP (2)
A β /PrP-Verhältnis	$8,6 \pm 0,2$	$4,4 \pm 0,2$	$15,1 \pm 0,4$

3.9.2 Einfluss des D-Peptids RD2D3-FITC

In Vorversuchen wurden die D-enantiomeren und gegen Alzheimer therapeutisch aktiven „Tandempeptide“ D3D3-FITC sowie RD2D3-FITC [128, 151] mit Hinblick auf ihren Einfluss auf die A β -PrP-Interaktion analysiert. Hierbei erwies sich das

RD2D3-FITC als das interessantere und vielversprechendere D-Peptid, weshalb es in diesem Kapitel genauer beschrieben wird. RD2D3-FITC ist mit 24 AS doppelt so lang wie RD2-FITC und hat ein Molekulargewicht von 3.667 Da. Bei RD2D3-FITC handelt es sich um ein Heterodimer bestehend aus den D-Peptiden RD2 und D3, welche *head to tail* miteinander verknüpft sind, und welches C-terminal den Fluoreszenzfarbstoff FITC zur leichteren Detektion des Peptids beinhaltet. Wie bei RD2-FITC auch wurden zunächst die Kontrollen durchgeführt.

3.9.2.1 Kontrollen

Die Verteilung von 40 μM RD2D3-FITC allein im Saccharosedichtegradienten (Abb. 3.37 A) ist analog der Verteilung von RD2-FITC allein (Abb. 3.34 A). RD2D3-FITC wird in den Fraktionen 1 bis 4 nachgewiesen und läuft im SDS-Gel unterhalb der 10 kDa Markerbande (Abb. 3.37 A). Auch bei der Untersuchung von 20 μM RD2D3-FITC mit 10 μM PrP(23-144) werden beide Analyten in den oberen DGZ-Fraktionen 1 bis 4 nachgewiesen und bilden folglich keine hochmolekularen Aggregate (Abb. 3.37 B). Da RD2D3-FITC größer ist als RD2-FITC, wird es teilweise durch Silber eingefärbt und ist als schwache Bande im SDS-Gel sichtbar (Abb. 3.37 B, obere Hälfte, unterhalb der 10 kDa Bande).

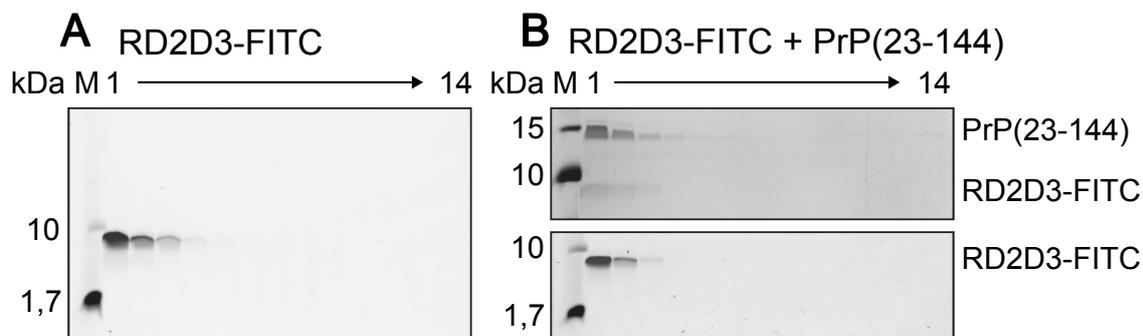


Abbildung 3.37: Verteilung von 40 μM RD2D3-FITC allein und 20 μM RD2D3-FITC mit 10 μM PrP(23-144) im Saccharosedichtegradienten. Fluoreszenzaufnahme des Tris-Tricin-SDS-PAGE-Gels von RD2D3-FITC allein (A). RD2D3-FITC allein kann in den oberen DGZ-Fraktionen 1 bis 4 verifiziert werden. Fluoreszenzaufnahme (B, unten) und Silberfärbung (B, oben) desselben Tris-Tricin-SDS-PAGE-Gels zur Untersuchung von 20 μM RD2D3-FITC mit 10 μM PrP(23-144). Sowohl PrP(23-144) als auch RD2D3-FITC können in den Fraktionen 1 bis maximal 4 nachgewiesen werden und bilden somit keine hochmolekularen Aggregate. RD2D3-FITC ist -im Gegensatz zu RD2-FITC- auch schwach in silbergefärbten SDS-Gelen zu erkennen (B, oben), da es größer ist als RD2-FITC.

3.9.2.2 Verteilung von A β (1-42) mit PrP(23-144) und 20 μ M RD2D3-FITC

Zur Untersuchung des Einflusses von RD2D3-FITC auf die A β -PrP-Interaktion wurden Konzentrationen von 80 μ M A β (1-42) und 40 μ M PrP(23-144) in der Ausgangslösung gewählt, da bei diesem Konzentrationsverhältnis alle Bindestellen auf den A β -Oligomeren besetzt sind und PrP(23-144) im Überschuss vorliegt (vgl. Kapitel 3.7.5). Bei diesen Konzentrationen entsteht ein Verhältnis von etwa 4 A β : 1 PrP(23-144) innerhalb der Komplexe. Zunächst wurde die Wirkung von 20 μ M RD2D3-FITC auf die A β -PrP-Interaktion analysiert, indem drei verschiedene Reihenfolgen für das Hinzufügen des D-Peptids zu der Probe gewählt wurden. Wurde RD2D3-FITC mit PrP(23-144) vermischt und gemeinsam mit diesem für 30 min auf 2 h vorinkubiertes A β gegeben, so ist dies unter dem Begriff „Simultan“ aufgeführt. Alternativ wurde entweder PrP(23-144) gemeinsam mit A β inkubiert und RD2D3-FITC nach 2 h für weitere 30 min hinzugefügt oder umgekehrt. Dies ist unter dem Begriff „Erst...dann...“ mit der jeweiligen Substanz aufgeführt.

Nach Vermischen von RD2D3-FITC mit PrP(23-144) und Hinzufügen zu A β -Oligomeren wird A β vollständig gebunden und befindet sich in den DGZ-Fraktionen 11 bis 14 (Abb. 3.38 A und B). Insgesamt 86 - 89 % des RD2D3-FITC werden in den Fraktionen 11 bis 14 nachgewiesen und erreichen in den Fraktionen 12 und 13 Konzentrationen von 3 μ M bis 7 μ M (Abb. 3.38 A und B). Neben RD2D3-FITC bindet ebenfalls PrP(23-144) an A β und ist mit 61 - 64 % der nachgewiesenen Menge bei einer A β /PrP-Stöchiometrie von $6,7 \pm 0,2$ in den Komplexen vorhanden. Beim Vergleich mit den Werten ohne RD2D3-FITC fällt auf, dass dort 87 - 89 % des PrP(23-144) in den Fraktionen 11 bis 14 nachgewiesen wurden und in einer A β /PrP-Stöchiometrie von $3,93 \pm 0,04$ resultiert. Folglich ist bei RD2D3-FITC-Anwesenheit bei diesen Versuchsbedingungen weniger PrP(23-144) an A β gebunden.

Wird jedoch PrP(23-144) mit A β zusammen inkubiert und RD2D3-FITC nach 2 h hinzugefügt, so ergibt sich eine andere Verteilung im Saccharosedichtegradienten. Beim Vergleich der Tris-Tricin-SDS-PAGE-Gele (Abb. 3.38 A und C) ist ein deutliches Fluoreszenzsignal des RD2D3-FITC in den Fraktionen 1 und 2 zu erkennen (Abb. 3.38 C). Folglich hat bei früher PrP(23-144)-Zugabe weniger RD2D3-FITC an A β -Oligomere gebunden, weshalb dieses mit 2 μ M - 3 μ M in den oberen DGZ-Fraktionen verbleibt (Abb. 3.38 D, graue Balken). Auch die erhaltene A β /PrP-Stöchiometrie von $4,2 \pm 0,2$ zeigt, dass kein Unterschied zu A β -PrP-Komplexen ohne D-Peptid erkennbar ist, da die Stöchiometrien mit Einberechnung des Fehlers gleich sind (vgl. Kapitel 3.7.5).

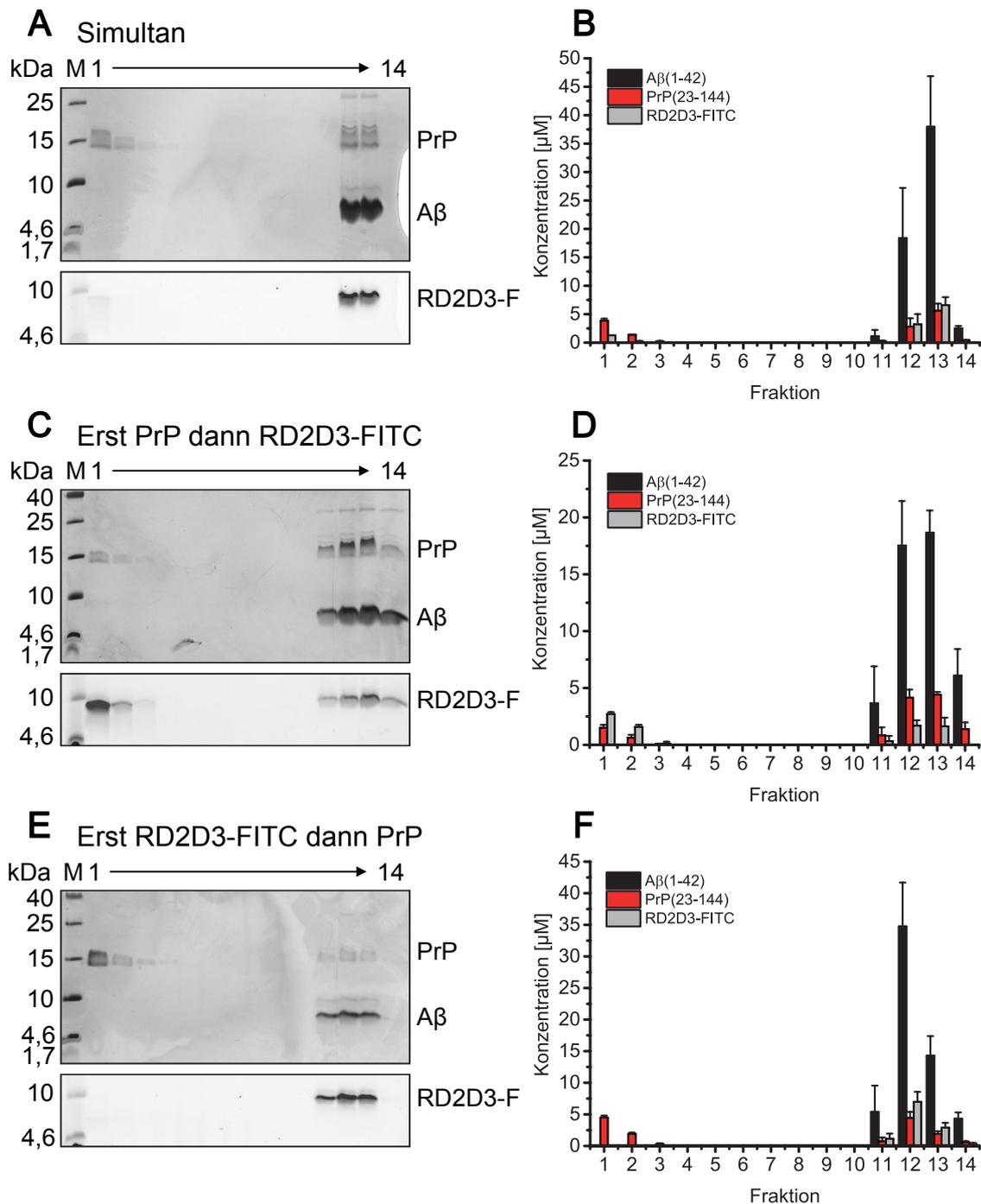


Abbildung 3.38: Verteilung von 80 μM A β , 40 μM PrP(23-144) und 20 μM RD2D3-FITC im Saccharosedichtegradienten bei unterschiedlicher Reihenfolge der RD2D3-FITC-Zugabe. Proteinverteilungen sind durch Tris-Tricin-SDS-PAGE (A, C und E) sowie nach RP-HPLC-Analyse (B, D und F) dargestellt. Entweder wurden PrP(23-144) und RD2D3-FITC (RD2D3-F) vermischt und gemeinsam auf A β -Oligomere gegeben (Simultan) oder es wurde entweder PrP(23-144) bzw. RD2D3-FITC während der A β -Inkubation hinzugefügt (Erst...dann...) und die jeweils andere Komponente nach 2 h hinzugefügt. Je nach Reihenfolge werden unterschiedliche PrP(23-144)- und RD2D3-FITC-Konzentrationen in den Fraktionen 1 - 3 und 11 - 14 erhalten.

Nach Inkubation von A β mit RD2D3-FITC und später PrP(23-144)-Zugabe (Abb. 3.38 E und F) zeigt sich eine ähnliche Verteilung im Dichtegradienten wie nach Mischen von RD2D3-FITC mit PrP(23-144) und Hinzufügen zu A β (Abb. 3.38 A und B). RD2D3-FITC befindet sich ausschließlich in den Fraktionen 11 bis 14 und ist somit vollständig in den Komplexen gebunden (Abb. 3.38 F, graue Balken). Beim Vergleich der PrP(23-144)-Konzentrationen in den ersten beiden DGZ-Fraktionen bei früher PrP(23-144)- bzw. RD2D3-FITC-Zugabe (Abb. 3.38 D und F, rote Balken) fällt auf, dass mehr PrP(23-144) in den oberen DGZ-Fraktionen verbleibt (ca. 5 μ M in Fraktion 1, statt 1,5 - 2 μ M), sofern RD2D3-FITC vor PrP(23-144) zu A β gegeben wurde. Folglich hat weniger PrP(23-144) an die A β -Oligomere gebunden als bei spätem RD2D3-FITC-Zusatz. Bestätigt wird diese Beobachtung durch das in den Komplexen vorhandene A β /PrP-Verhältnis von $7,7 \pm 0,2$, welches fast doppelt so hoch ist wie das A β /PrP-Verhältnis ohne RD2D3-FITC.

3.9.2.3 Verteilung von A β (1-42) mit PrP(23-144) und 40 μ M RD2D3-FITC

Im weiteren Verlauf wurde die RD2D3-FITC-Konzentration in der Ausgangslösung auf 40 μ M erhöht. Die A β bzw. PrP(23-144)-Konzentration wurde mit 80 μ M bzw. 40 μ M beibehalten. Nach Vermischen von PrP(23-144) mit RD2D3-FITC und simultanem Hinzufügen zu inkubiertem A β werden ca. 42 - 44 % des PrP(23-144) mit Konzentrationen von maximal 5 μ M in den Fraktionen 11 bis 14 gefunden (Abb. 3.39 A und B, rote Balken). 2 - 5 μ M PrP(23-144) verbleiben in den oberen beiden DGZ-Fraktionen. Damit einhergehend befinden sich 10 - 15 μ M RD2D3-FITC in den Fraktionen 12 und 13 und folglich in den Komplexen, während lediglich maximal 3,5 μ M RD2D3-FITC in der ersten Fraktion vorhanden ist (Abb. 3.39 A und B, graue Balken). Auch die errechnete A β /PrP-Stöchiometrie von $10,4 \pm 0,4$ in den Fraktionen 11 bis 14 zeigt, dass weniger PrP(23-144) in den Komplexen gebunden ist als zuvor mit 20 μ M RD2D3-FITC in der Ausgangslösung.

Wird PrP(23-144) gemeinsam mit A β inkubiert (Abb. 3.39 C und D), ist die PrP(23-144)-Verteilung analog zu dem Versuch mit 20 μ M RD2D3-FITC (Abb. 3.38 C und D). Ebenfalls bleibt die A β /PrP-Stöchiometrie von $4,0 \pm 0,1$ gleich. Auffällig sind die hohen RD2D3-FITC-Konzentrationen von bis zu 8 μ M in Fraktion 1 (Abb. 3.39 C und D, graue Balken), da das D-Peptid unter diesen Versuchsbedingungen weniger an die A β -Oligomere bindet als beim Vermischen mit PrP(23-144) und somit überschüssig ist.

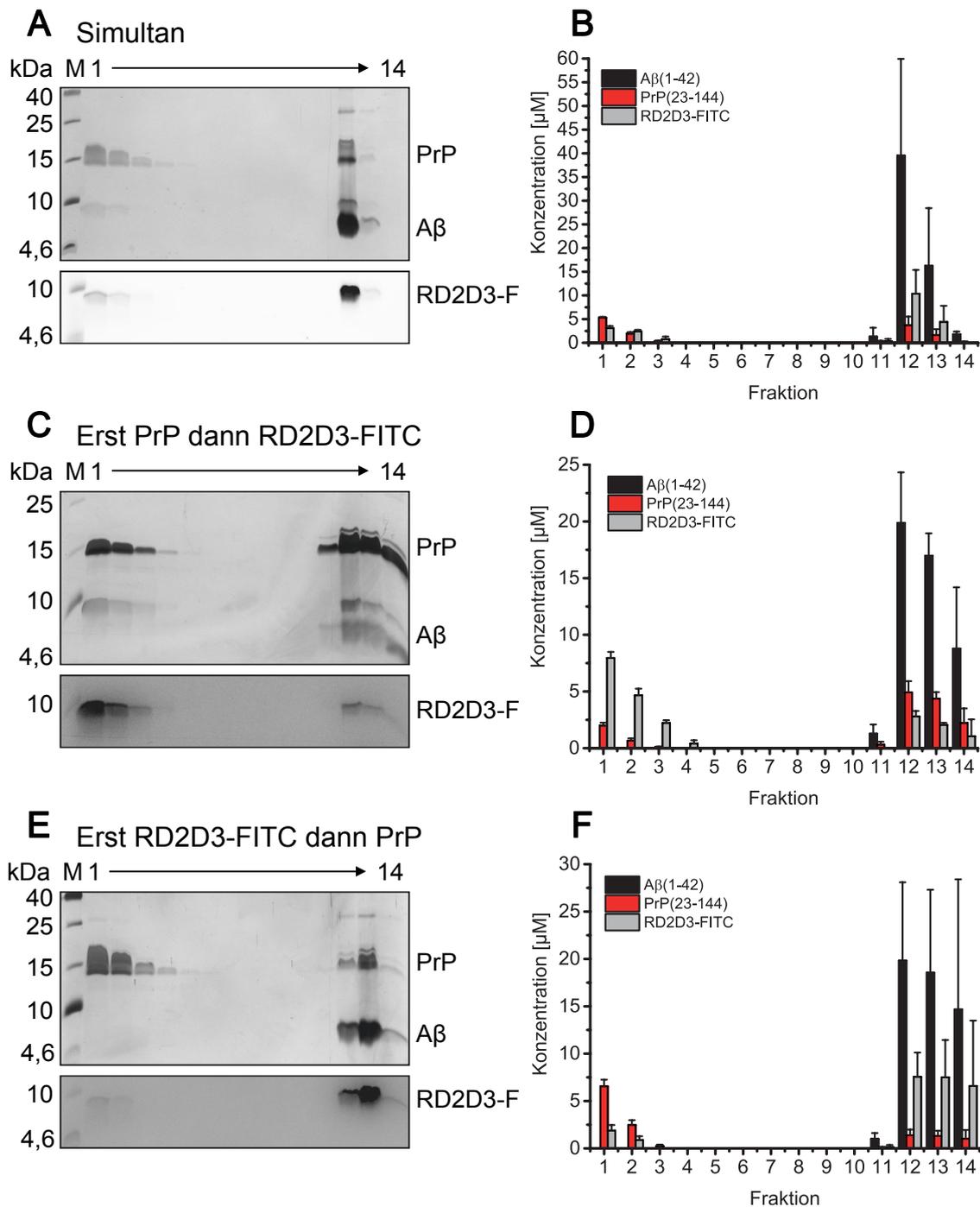


Abbildung 3.39: Verteilung von 80 µM Aβ, 40 µM PrP(23-144) und 40 µM RD2D3-FITC im Saccharosedichtegradienten bei unterschiedlicher Reihenfolge der RD2D3-FITC-Zugabe. Proteinverteilungen sind durch Tris-Tricin-SDS-PAGE (A, C und E) sowie nach RP-HPLC-Analyse (B, D und F) dargestellt. Entweder wurden PrP(23-144) und RD2D3-FITC (RD2D3-F) vermischt und gemeinsam auf Aβ-Oligomere gegeben (Simultan) oder es wurde entweder PrP(23-144) bzw. RD2D3-FITC während der Aβ-Inkubation hinzugefügt (Erst...dann...) und die jeweils andere Komponente nach 2 h hinzugefügt. Je nach Reihenfolge werden unterschiedliche PrP(23-144)- und RD2D3-FITC-Konzentrationen in den Fraktionen 1 - 3 und 11 - 14 erhalten.

Nach Inkubation von 40 μ M RD2D3-FITC mit A β und spätem Hinzufügen von 40 μ M PrP(23-144) (Abb. 3.39 E und F) befinden sich 7 - 10 μ M RD2D3-FITC pro Fraktion in den Fraktionen 12 bis 14; lediglich 2 μ M des Peptids werden in der ersten Fraktion detektiert (Abb. 3.39 F, graue Balken). Folglich werden 86 - 89 % des RD2D3-FITC in den unteren DGZ-Fraktionen verifiziert. Im Falle von PrP(23-144) ist es genau umgekehrt. 6 - 7 μ M des PrPs werden in der ersten DGZ-Fraktion nachgewiesen, während die Konzentration in den Fraktionen 11 bis 14 unterhalb von 2 μ M PrP(23-144) pro Fraktion liegt (Abb. 3.39 F, rote Balken). Auch in der Tris-Tricin-SDS-PAGE (Abb. 3.39 E) ist der Überschuss an nicht gebundenem PrP(23-144) in den Fraktionen 1 bis 3 deutlich erkennbar, während sich in denselben Fraktionen kaum RD2D3-FITC detektieren lässt (Abb. 3.39 E, unten). Insgesamt befinden sich lediglich 25 - 30 % des PrPs in den Fraktionen 11 bis 14. Dies ist der niedrigste PrP(23-144)-Wert in den Komplexen aller durchgeführten Analysen bei D-Peptid-Anwesenheit. Auch die A β /PrP-Stöchiometrie mit einem Wert von $14,3 \pm 0,5$ zeigt die größte Abweichung von der A β /PrP-Stöchiometrie ohne Peptidzugabe (vgl. Kapitel 3.7.5).

Festzuhalten bleibt, dass bei einer Konzentration von 40 μ M RD2D3-FITC in der Ausgangslösung und gemeinsamer Inkubation von RD2D3-FITC und A β der größte Einfluss auf die A β -PrP-Interaktion gezeigt werden kann. Trotzdem kann eine Bindung von PrP(23-144) an A β -Oligomere nicht gänzlich unterbunden werden, da in den Komplexen noch PrP(23-144) enthalten ist. Die PrP-Mengen sind jedoch deutlich niedriger als ohne D-Peptid.

3.9.2.4 Stöchiometrien der A β -PrP(23-144)-Komplexe in Anwesenheit von RD2D3-FITC

Nach intensiven Untersuchungen zwei verschiedener Konzentrationen und Zugabereihenfolgen von RD2D3-FITC zu A β und PrP(23-144) wurden die A β /PrP-Stöchiometrien innerhalb der Komplexe, bestehend aus A β , PrP(23-144) und RD2D3-FITC, bestimmt (Tabelle 3.4 und Abb. 3.40). Als Referenz dient die Stöchiometrie ohne D-Peptid bei Verwendung derselben A β - bzw. PrP(23-144)-Konzentrationen (80 μ M A β bzw. 40 μ M PrP(23-144)), vgl. Kapitel 3.7.5).

Es fällt auf, dass die Reihenfolge der RD2D3-FITC-Zugabe bei den gewählten Versuchsbedingungen einen Einfluss auf die A β /PrP-Stöchiometrie hat (Tabelle 3.4 und Abb. 3.40). Während bei Verwendung von 20 μ M RD2D3-FITC und Zugabe von RD2D3-FITC zu A β -Inkubationsbeginn ein A β /PrP(23-144)-Verhältnis von

7,7 ± 0,2 erhalten wird, so resultiert hingegen die Zugabe von PrP(23-144) zu A β -Inkubationsbeginn in einer Stöchiometrie von 4,2 ± 0,2, welche gleich der Referenz-Stöchiometrie ist. Beim Vermischen von 20 μ M RD2D3-FITC mit 40 μ M PrP(23-144) und simultanem Zusatz zu A β -Oligomeren ergibt sich ein A β /PrP-Verhältnis von 6,7 ± 0,2, welches zwischen den beiden anderen Stöchiometrien liegt.

Tabelle 3.4: Mittelwerte und Standardabweichungen der A β /PrP(23-144)-Stöchiometrien innerhalb der A β -PrP-Komplexe aus den Dichtegradientenfraktionen 11 - 14 bei verschiedenen RD2D3-FITC-Konzentrationen und verschiedenen Zugabereihenfolgen. Es wurden 80 μ M A β und 40 μ M PrP(23-144) verwendet. Die Referenz ist bei 0 μ M RD2D3-FITC angegeben.

Konzentration	Simultan	Erst PrP(23-144)	Erst RD2D3-FITC
20 μ M RD2D3-FITC	6,7 ± 0,2	4,2 ± 0,2	7,7 ± 0,2
40 μ M RD2D3-FITC	10,4 ± 0,4	4,0 ± 0,1	14,3 ± 0,5
0 μ M RD2D3-FITC	3,93 ± 0,04		

Nach Erhöhung der RD2D3-FITC-Konzentration in der Ausgangslösung von 20 μ M auf 40 μ M wird eine ähnliche Tendenz beobachtet. Der Einsatz von 40 μ M RD2D3-FITC hat einen größeren Einfluss auf die A β -PrP-Interaktion als die Verwendung von 20 μ M RD2D3-FITC, erkennbar an den größeren A β /PrP-Verhältnissen (Tabelle 3.4 und Abb. 3.40). Das höchste A β /PrP-Verhältnis mit 14,3 ± 0,5 wird durch die Zugabe von 40 μ M RD2D3-FITC zu A β -Inkubationsbeginn erhalten. Hier wird folglich die niedrigste Menge an PrP(23-144) in den A β -PrP-Komplexen nachgewiesen. Doch auch bei einer Konzentration von 40 μ M RD2D3-FITC wird eine Stöchiometrie von 4,0 ± 0,1 (A β /PrP) erhalten, sofern PrP(23-144) bei A β -Inkubationsbeginn zu der Probe hinzugefügt wird. Beim Vermischen von 40 μ M RD2D3-FITC mit 40 μ M PrP(23-144) kann nach DGZ eine A β /PrP-Stöchiometrie von 10,4 ± 0,4 in den Komplexen errechnet werden, welche auch hier zwischen den Werten von früher PrP(23-144)-Zugabe und früher RD2D3-FITC-Zugabe liegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Reihenfolge des RD2D3-FITC-Zusatzes zu der Probe bei den hier untersuchten Versuchsbedingungen einen Einfluss auf die A β /PrP-Stöchiometrie hat. Sofern sich bereits A β -PrP-Komplexe gebildet haben und RD2D3-FITC anschließend hinzugefügt wird, ist kein Unterschied zu der Referenz ohne D-Peptid erkennbar. Für einen Einfluss auf die A β /PrP-Stöchiometrie ist ebenfalls die Konzentration von RD2D3-FITC entscheidend. Hier zeigt sich, dass eine höhere Konzentration (40 μ M) einen stärkeren Effekt hat als die niedrigere Konzentration (20 μ M). Im Vergleich zu RD2-FITC (siehe Kapitel 3.9.1) kann mit RD2D3-FITC erstmals ein Einfluss auf die A β -PrP-Interaktion nachgewiesen werden, ohne dass enorm hohe Konzentrationen (500 μ M) nötig sind.

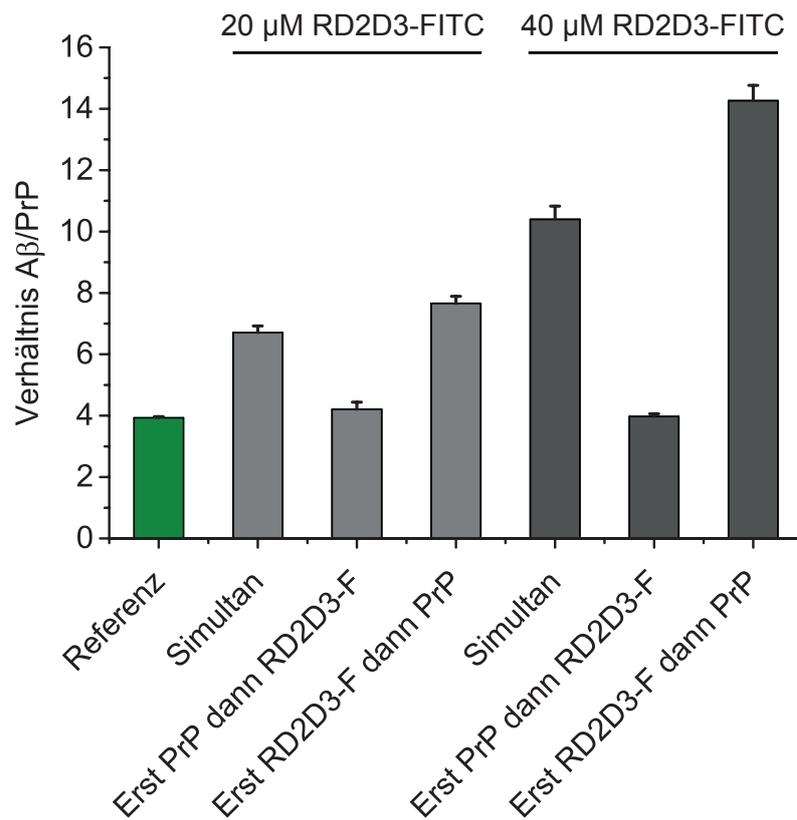


Abbildung 3.40: A β /PrP-Stöchiometrien innerhalb der A β -PrP-Komplexe in Anwesenheit von 20 μ M oder 40 μ M RD2D3-FITC und verschiedenen Zugabereihenfolgen von RD2D3-FITC. Für alle Versuche wurde eine A β -Konzentration von 80 μ M und eine PrP(23-144)-Konzentration von 40 μ M in der Ausgangslösung verwendet. Es ergibt sich ein Referenzwert von 4 A β : 1 PrP(23-144) (vgl. Kapitel 3.7.5). Mit steigender RD2D3-FITC-Konzentration und früher Zugabe von RD2D3-FITC (Erst RD2D3-F dann PrP) ist die Abweichung von dem Referenzwert am größten. Bei früher PrP(23-144)-Zugabe (Erst PrP dann RD2D3-F) ändert sich die A β /PrP-Stöchiometrie zur Referenz nicht.

4 Diskussion

Inhaltsangabe

4.1	Reinigung von PrP(23-230) und PrP(23-144)	128
4.2	Anpassung des QIAD Assays	129
4.3	Charakterisierung der Ausgangsmaterialien	130
4.4	Charakterisierung der A β -PrP-Interaktion	133
4.5	Einfluss von CSB und D-Peptiden auf die A β -PrP-Interaktion . .	143
4.6	Modell der A β -PrP-Komplexe	148
4.7	Ausblick	151

4.1 Reinigung von PrP(23-230) und PrP(23-144)

In dieser Arbeit sollte die A β -PrP-Interaktion charakterisiert und der Einfluss verschiedener Substanzen (insbesondere D-Peptide) auf diese Interaktion untersucht werden. Hierfür mussten zunächst die verschiedenen benötigten Prion-Varianten gereinigt werden. Es ist sehr wichtig, dass das PrP möglichst rein vorliegt, damit die A β -PrP-Interaktion oder die ermittelten Stöchiometrien nicht durch Verunreinigungen beeinflusst werden.

Sowohl PrP(23-230) als auch PrP(23-144) wurden für die Untersuchungen mit und ohne Isotopenmarkierung gereinigt. Die Reinigung von ^{13}C - ^{15}N PrP(23-144) erfolgte hierbei durch Lothar Gremer und Reinhild Wurm. Ebenfalls benötigt wurde PrP(90-230), das durch Elke Reinartz, Lothar Gremer und Florian Schmitz hergestellt wurde.

Der pET-11a-huPrP(23-230)-Vektor war bereits im Institut vorhanden (beschrieben in [122]), weshalb die Klonierung des Konstrukts nicht Bestandteil dieser Arbeit ist. Für die Reinigung des PrP(23-230) wurde ein etabliertes Protokoll, basierend auf Referenz [152], verwendet. Nach der Anzucht von *E. coli* in TB-Medium zur Herstellung des nicht-isotopenmarkierten PrP(23-230) wurden ca. 20 g Zellen (Nassgewicht) pro Liter Kulturmedium erhalten. Die nachfolgenden Reinigungsschritte über SEC und RP-HPLC verliefen ohne Komplikationen und es wurden etwa 29 mg PrP(23-230) aus einem Liter Medium in hoher Reinheit (vgl. Abb. 3.6) erhalten.

Für die Herstellung von ^{15}N PrP(23-230) wurde nach Zellanzucht mit 7 g *E. coli*-Zellen etwa nur ein Drittel der Zellmenge erhalten, jedoch wurde mit etwa 37 mg ^{15}N PrP(23-230) pro Liter Kultur eine etwas höhere Ausbeute generiert. Das langsamste Zellwachstum und die niedrigste Zellmenge mit 3,3 g Zellen pro Liter Medium wurde bei der Herstellung von ^{13}C - ^{15}N PrP(23-230) verzeichnet. Mit ca. 22 mg ^{13}C - ^{15}N PrP(23-230) pro Liter Medium wurde die niedrigste Ausbeute mit Hinblick auf das PrP(23-230)-Konstrukt erhalten. Doch auch diese geringere Menge reichte für die Herstellung aller in dieser Arbeit benötigten NMR-Proben, die eine zweifache Isotopenmarkierung voraussetzten, aus.

Zur Herstellung von PrP(23-144) wurde der pET302/NT-His-huPrP(23-144)-Vektor durch Aziz Gauhar kloniert und das PrP(23-144) durch ihn bereits über *gravity flow* gereinigt [123]. Das Protokoll sollte in dieser Arbeit verändert werden, sodass PrP(23-144) über FPLC in größeren Mengen gereinigt werden kann. Sowohl mit als auch ohne Isotopenmarkierung des Mediums wurden 6 g *E. coli*-Zellen aus einem Liter Kultur erhalten. Bereits nach dem IMAC-Reinigungsschritt wurden neben PrP(23-144) kaum weitere Proteinbanden im SDS-Gel erhalten (Abb. 3.4) und das

Protein somit in hoher Reinheit aus dem Zelllysate separiert. Es zeigte sich, dass weder das Aufkonzentrieren der Lösung durch Zentrifugalkonzentration (Centricon) noch das Dialysieren geeignete Schritte bei der PrP(23-144)-Reinigung sind, da es hier zur Präzipitation und zum Verlust des Proteins kommt.

Es konnten 5,3 mg PrP(23-144) aus zwei Litern Kultur gewonnen werden, u.a. bedingt durch den Verlust des Proteins bei den oben genannten Schritten. Die Reinigung des ^{15}N PrP(23-144) resultierte in 3,9 mg Protein aus einem Liter Kultur. Diese Ausbeuten sind relativ niedrig, sodass für die Herstellung größerer Mengen PrP(23-144) eine weitere Optimierung des Protokolls wünschenswert ist. Diese wurde kürzlich von Luis Macorano im Rahmen seiner Masterarbeit etabliert [146].

4.2 Anpassung des QIAD Assays

Der *quantitative determination of interference with A β aggregate size distribution* (QIAD) Assay ist eine Methode zur Auftrennung und Quantifizierung von A β -Spezies und setzt sich aus einer DGZ mit anschließender RP-HPLC-Analyse der erhaltenen Fraktionen hinsichtlich des A β -Gehaltes zusammen [128]. Dieser Assay sollte neben A β ebenfalls für die Quantifizierung von PrP verwendet werden, um die Stöchiometrien innerhalb entstandener A β -PrP-Komplexe zu bestimmen. Hierfür musste der Assay zunächst signifikant modifiziert werden. Ein Punkt ist hierbei die Verwendung eines anderen Puffersystems, da gezeigt wurde, dass mit Phosphatpuffer infektiöse PrP(23-144)-Fibrillen gebildet werden können [52, 55, 147], was für die Untersuchung der A β -PrP-Interaktion unerwünscht ist. Tris-HCl, pH 7,4 konnte als Puffer identifiziert werden, in dem sowohl A β -Oligomere generiert werden können (vgl. Kapitel 3.4) als auch die in dieser Arbeit verwendeten PrP-Konstrukte löslich bleiben (vgl. Kapitel 3.6). Durch Luis Macorano wurde das Dichtegradientenmaterial von Iodixanol auf Saccharose umgestellt [129], um weniger Absorptionssignal durch das Gradientenmaterial bei RP-HPLC-Läufen zu erhalten, welches bei der Quantifizierung von früh eluierenden Substanzen (in diesem Fall den D-Peptiden) störend wäre. Eine Umstellung des RP-HPLC-Gradienten von isokratisch 30 % Acetonitril, 0,1 % TFA auf 10 - 40 % Acetonitril, 0,1 % TFA ermöglichte eine Unterscheidung und Quantifizierung von D-Peptiden, PrP (alle Konstrukte) sowie A β innerhalb einer Messung (vgl. Abb. 3.8). Somit wurde ein Assay erhalten, welcher optimal für die Quantifizierung von allen Komponenten und folglich für die Bestimmung von Stöchiometrien innerhalb erhaltener Komplexe geeignet war.

4.3 Charakterisierung der Ausgangsmaterialien

Bevor die Interaktion von A β mit den verschiedenen PrP-Varianten untersucht werden konnte, wurden zunächst die Ausgangsmaterialien, sprich A β -Oligomere sowie jedes PrP-Konstrukt, einzeln untersucht. Dies ist besonders wichtig, da jede einzelne Komponente in der Lage ist zu aggregieren und Fibrillen zu bilden [22, 27, 51, 55, 153, 154]. Es sollte jedoch die Interaktion von A β -Oligomeren mit PrP-Monomeren analysiert werden, weshalb überprüft werden musste, dass die Ausgangsmaterialien genauso vorliegen. Deshalb wurden Untersuchungen über CD, NMR und DGZ durchgeführt.

CD-Analysen (siehe Kapitel 3.6.1) haben gezeigt, dass sowohl das Volllängen-PrP(23-230) als auch das C-terminale PrP(90-230) eine überwiegend α -helikale Struktur aufweisen, zu erkennen an den Minima zwischen etwa 210 - 220 nm sowie einem Schnitt mit der x-Achse bei 200 nm. Mit PrP(90-230) ist es etwas deutlicher zu erkennen, dass es sich um zwei Minima handelt; bei PrP(23-230) ist die Signalintensität etwas geringer. Da PrP(23-230) auch noch den unstrukturierten N-terminalen Bereich beinhaltet, ist davon auszugehen, dass dieser Bereich das Gesamtsignal etwas weniger α -helikal erscheinen lässt. Das gereinigte PrP(23-144) liegt in Lösung ungefaltet vor. Bei Betrachtung der Struktur von Volllängen-PrP (Abb. 1.3 und [40]), wird deutlich, dass PrP(23-144) aus dem ungefalteten N-Terminus des PrPs besteht und lediglich die Hälfte eines β -Faltblattes beinhaltet, welches sich aufgrund fehlender AS im PrP(23-144) nicht ausbilden kann. So entspricht das CD-Spektrum von PrP(23-144) (Abb. 3.11) den Erwartungen, dass dieses PrP in Lösung ungefaltet vorliegt. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit denen von Morillas et al., die zeigen konnten, dass -bei ihnen humanes PrP(23-145)- bei pH-Werten von 5 oder 7 ungefaltet vorliegt [155]. Auch die Spektren von Volllängen-PrP bzw. C-terminalem PrP stimmen mit deren überein.

PrP(23-230) sowie PrP(23-144) wurden darüber hinaus mittels *liquid state* NMR untersucht. Hierbei wurden die Proteine bei verschiedenen pH-Werten, PrP(23-144) zusätzlich bei verschiedenen Temperaturen analysiert. Die Messungen und Zuordnungen erfolgten durch Philipp Neudecker und Daniel Flender. Insbesondere die Messungen beider Proteine bei neutralem pH-Wert und einer Temperatur von 20 °C sind für die Charakterisierung wichtig, da die A β -PrP-Komplexe bei diesen Bedingungen generiert werden. NMR-Untersuchungen bei niedrigeren Temperaturen (5 °C) und einem niedrigeren pH-Wert (z.B. pH 4,5) führten zu Spektren mit einer höheren Auflösung, da bei diesen Bedingungen alle AS-Seitenketten protoniert vorliegen und der Austausch der Amidprotonen mit dem Wasser verlangsamt ist.

Deshalb wurden verschiedene pH-Werte analysiert. Sowohl für PrP(23-230) als auch für PrP(23-144) führt die Veränderung des pH-Wertes zur Verschiebung einiger Resonanzen, insbesondere der Histidine (siehe Kapitel 3.6.2 sowie Bachelorarbeit von Daniel Flender [148]). Die Verschiebung der Resonanzen bei unterschiedlichen Temperaturen im Falle von PrP(23-144) ist bei konstantem pH-Wert für jede AS gleich. Dies ist in der vorliegenden Arbeit bei neutralem pH-Wert in HEPES-Puffer gezeigt (Abb. 3.14) sowie in der Bachelorarbeit von Daniel Flender in Natriumacetat-Puffer bei einem pH-Wert von 4,5 [148].

Trotz einiger Verschiebungen haben weder pH-Wert noch Temperatur einen Einfluss auf die Struktur von PrP(23-230) bzw. PrP(23-144). Das Volllängen-PrP ist bei allen hier untersuchten Bedingungen stabil und weist eine überwiegend α -helikale Struktur auf. Eine Zuordnung der Resonanzen ist mit Ausnahme der Octarepeats anhand hinterlegter Daten von Zahn et al. [40] möglich (Zuordnung durch Philipp Neudecker). Auch nach monatelanger Lagerung bei 5 °C bleibt PrP(23-230) löslich. Die NMR-Messungen von PrP(23-144) unterstützen die Ergebnisse der CD-Messungen und zeigen, dass PrP(23-144) ungefaltet vorliegt. Für die Temperaturmessungen wurde HEPES-Puffer verwendet, da der pH-Wert von Tris-Puffer stark temperaturabhängig ist. Es wurden jedoch zusätzlich HSQC-Spektren von PrP(23-144) in Tris-Puffer aufgenommen (siehe Abb. 5.6), die zeigen, dass auch unter diesen Bedingungen keine Faltung des PrP(23-144) erfolgt. Es ist für weitere Untersuchungen von PrP(23-144) mit A β wichtig, dass sich das PrP(23-144) nicht verändert, da bereits gezeigt wurde, dass PrP(23-144) unter Verwendung von Phosphatpuffer Fibrillen bildet [51, 147]. Dies wurde auch bei Verwendung von Tris-Puffer ein einziges Mal beschrieben [51], auch wenn für weitere Experimente dieser Arbeitsgruppe Phosphatpuffer zur Fibrillierung von PrP(23-144) eingesetzt wurde. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen hingegen keinerlei Konversion des PrP(23-144) vom monomeren zu einem fibrillären Zustand in Anwesenheit von Tris-Puffer über mehrere Tage. Eine Zuordnung vieler Resonanzen von PrP(23-144) ist möglich, auch hier ebenfalls ein Großteil der Resonanzen der Octarepeats ausgenommen. Diese Zuordnungen wurden durch Daniel Flender durchgeführt und sind seiner Bachelorarbeit zu entnehmen [148].

Vor Analyse der A β -PrP-Komplexe wurden die A β -Oligomere sowie jedes PrP-Fragment ohne die jeweils andere Komponente über eine Saccharose-DGZ untersucht. Das 2,5 h inkubierte A β zeigt eine Verteilung verschiedener A β -Spezies innerhalb des Dichtegradienten (siehe Abb. 3.16). Hierbei wird am meisten A β in den Fraktionen 1 bis 5 erhalten und nachfolgend nimmt die A β -Konzentration mit jeder Fraktion ab. Diese Verteilung entspricht derer nach Brener et al. [128], bei der

die verschiedenen A β -Spezies über einen Iodixanolgradienten aufgetrennt wurden. Wichtig für die Untersuchungen mit PrP sind insbesondere die A β -Oligomere in den Fraktionen 4 bis 6 (vgl. Kapitel 3.7.1 - 3.7.4). Zu dem Zeitpunkt vor den Untersuchungen der A β -PrP-Komplexe war jedoch nicht sicher, mit welcher A β -Oligomerspezies das PrP interagieren wird, da hierüber in der Literatur keine Einigung herrscht [65, 67–71], insbesondere, ob kleinere Oligomere (Dimere bis Tetramere [67–69]) oder hochmolekulare A β -Spezies gebunden werden [69, 70]. Deshalb sollte zunächst ein breites Spektrum an A β -Oligomeren, jedoch keine Fibrillen, generiert werden. Anhand der hier gezeigten A β -Verteilung ist zu erkennen, dass sowohl kleinere als auch bis über 100 kDa große A β -Spezies erhalten werden (vgl. Abb. 3.9 sowie [128]). Würde PrP mit noch größeren A β -Spezies interagieren, sollte sich keine Änderung in der A β -Verteilung zeigen. Ebenfalls wichtig ist, dass bei der Verteilung von A β allein so wenig wie möglich A β in den Fraktionen 11 bis 14 vorhanden ist, da hauptsächlich dort die A β -PrP-Komplexe nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.7.1 - 3.7.4). Da dies der Fall ist, sind die gewählten Inkubationsbedingungen von A β ideal, um sowohl genügend Oligomere zu erhalten als auch kaum Signal in den unteren Fraktionen, beispielsweise ausgelöst durch A β -(Proto)-Fibrillen oder nicht-gelöstes A β .

Bei der Verteilung von PrP(23-144) sowie PrP(23-111 Δ 41-94) im Saccharosedichtegradienten (jeweils allein) kann PrP fast ausschließlich in den oberen Fraktionen gefunden werden. Für PrP(23-144) sind dies Fraktion 1 bis maximal 5 und für PrP(23-111 Δ 41-94) ausschließlich Fraktion 1 und 2. PrP(23-111 Δ 41-94) wurde hierfür bei einer Ausgangskonzentration von 40 μ M untersucht, statt der eingesetzten 10 μ M für alle anderen PrP-Konstrukte, da es aufgrund seiner Größe sonst nicht über SDS-PAGE und Silberfärbung nachgewiesen werden kann. Lediglich bei PrP(23-144) können sehr geringe Konzentrationen in den Fraktionen 11 bis 14 nachgewiesen werden (Abb. 3.17 B). Diese Mengen liegen jedoch nah an der Nachweisgrenze der HPLC und sind vernachlässigbar niedrig.

Mit PrP(23-230) sowie PrP(90-230) werden ebenfalls die höchsten Konzentrationen in den Fraktionen 1 bis 5 gefunden, insbesondere in den ersten beiden Fraktionen mit je 2 - 2,5 μ M. Jedoch kann auch in den unteren Fraktionen PrP nachgewiesen werden. Im Falle von PrP(90-230) ist dies insbesondere Fraktion 14, in der teilweise nichts, teilweise bis zu 0,9 μ M PrP ermittelt wurden. Mit PrP(23-230) kann in den Fraktionen 11 bis 14 Protein nachgewiesen werden. Dieser Hintergrund ist möglicherweise durch Tau-Gefrierzyklen entstanden. Da über NMR gezeigt werden konnte, dass PrP(23-230) löslich und nicht β -faltblattartig vorliegt (siehe Kapitel 3.6.2), wird nicht davon ausgegangen, dass es sich bei dem PrP in den unte-

ren Fraktionen um Fibrillen handelt, insbesondere deshalb nicht, da eine spontane Fibrillogenese von PrP mehrere Wochen dauert [156] (dort gezeigt PrP(90-230)). Ob dieser Hintergrund möglicherweise einen Einfluss auf die A β -PrP-Stöchiometrien hat, wird im nachfolgenden Kapitel diskutiert. Da sich zeigte, dass PrP(23-144) ein ähnliches Verhalten bei der Bindung von A β -Oligomeren aufweist, wurde insbesondere auf dieses PrP-Konstrukt bei den Stöchiometrien geachtet, da mit PrP(23-144) allein kaum aggregiertes Protein in den Fraktionen 11 bis 14 erhalten wurde (vgl. Abb. 3.17 B).

4.4 Charakterisierung der A β -PrP-Interaktion

4.4.1 Verteilung von A β -PrP-Komplexen im Dichtegradienten

Zur Untersuchung der A β -PrP-Interaktion wurden verschiedene Konzentrationen der PrP-Konstrukte PrP(23-230), PrP(23-144), PrP(90-230) sowie PrP(23-111 Δ 41-94) zu A β -Oligomeren hinzugefügt, die Probe über einen Saccharosedichtegradienten separiert und anschließend jede Fraktion über SDS-PAGE und quantitative RP-HPLC analysiert (siehe Kapitel 3.7.1 - 3.7.4). Hierbei konnte nach Zugabe von PrP(23-230), PrP(23-144) und PrP(23-111 Δ 41-94) eine Abnahme oligomerer A β -Spezies (insbesondere in Fraktionen 4 bis 6) und eine A β -Zunahme in den unteren Fraktionen beobachtet werden. Dieser Effekt war bei Verwendung von PrP(90-230) deutlich schwächer, obgleich auch mit dieser PrP-Variante eine leichte Erhöhung der A β -Konzentrationen in den DGZ-Fraktionen 11 bis 14 detektiert wurde. Beim Vergleich mit der Verteilung von Standardproteinen (Abb. 3.9) fällt auf, dass das mit 669 kDa schwerste Protein Thyroglobulin bis maximal Fraktion 10 nachgewiesen werden konnte. Die nach Hinzufügen von PrP entstandenen A β -PrP-Komplexe werden insbesondere in den Fraktionen 11 bis 14 erhalten. Somit ist davon auszugehen, dass hochmolekulare Komplexe im Megadalton-Bereich entstanden sind.

Die Beobachtung, dass mit den Konstrukten PrP(23-230), PrP(23-144) und PrP(23-111 Δ 41-94) eine Interaktion mit A β -Oligomeren erhalten wurde, deckt sich mit Literaturangaben [57, 60, 66]. So wurde bereits gezeigt, dass sich die für die Bindung von A β -Oligomeren wichtigen Bereiche auf der PrP-Sequenz an den Positionen AS 23 - 27 sowie ca. 95 - 110 befinden [57, 59-62]. Beide Bindestellen sind auf den in dieser Arbeit verwendeten Konstrukten PrP(23-230), PrP(23-144) und PrP(23-111 Δ 41-94), die alle mit A β -Oligomeren interagieren und hochmolekulare

Komplexe formen, vorhanden. Auf PrP(90-230) hingegen befindet sich lediglich eine der beiden Bindestellen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass für eine effektive Bindung von A β -Oligomeren beide Bindestellen benötigt werden, da durch Deletion einer der beiden Stellen eine starke Abnahme der Bindung erfolgt [59, 61]. So lässt sich die deutlich niedrigere A β -PrP-Komplexbildung im Falle von PrP(90-230) durch das Nichtvorhandensein der Bindestelle an Position 23 - 27 erklären und ist in Einklang mit bereits publizierten Daten [59].

PrP(23-111 Δ 41-94), welches dem P2-Konstrukt nach Fluharty et al. entspricht [60], besteht aus insgesamt 35 AS, enthält beide Binderegionen für A β -Oligomere, jedoch keine Octarepeats. SPR-Messungen dieses P2-Konstrukts zeigten, dass die *resonance units* (RU) nach Bindung von A β -Oligomeren um 72 % reduziert sind als mit dem N1-Konstrukt (PrP(23-111)) [60]. Der angegebene K_D -Wert für P2 von 26,3 nM ist jedoch sogar etwas niedriger als der für N1 mit 40,9 nM [60]. Folglich ist die Bindung von A β -Oligomeren an dieses stark verkürzte Prion-Konstrukt ebenfalls hochaffin. Der Rückgang der RUs ist durch die verringerte Größe erklärbar. Nach SPR-Untersuchungen eines PrP-Konstrukts ohne Octarepeats (Δ 51-94) an A β -Oligomere durch Chen et al. konnte kein messbarer Effekt verglichen mit dem Wildtyp-PrP festgestellt werden [59]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Octarepeat-Region nicht für die Bindung benötigt wird und erklären die Affinitäten von Fluharty et al. [60]. Auch Laurén et al. können nach Deletion der AS 52 - 91 des PrPs eine signifikante Bindung von A β (1-42)-Oligomeren beobachten [57].

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Chen et al. [59] und Laurén et al. [57] überein, da auch bei den hier in Kapitel 3.7.4 gezeigten Daten eine Interaktion von PrP(23-111 Δ 41-94) mit A β (1-42)-Oligomeren beobachtet werden kann. So ist bereits nach Hinzufügen von 10 μ M PrP(23-111 Δ 41-94) in den DGZ-Fractionen 4 bis 9 kein A β mehr nachweisbar (Abb. 3.21 B und E). Selbst in Fraktion 3 befinden sich maximal 0,5 μ M A β . Niedrigere PrP(23-111 Δ 41-94)-Konzentrationen als 10 μ M wurden nicht untersucht, da mit PrP(23-111 Δ 41-94) nur schwache Absorptionssignale bei RP-HPLC-Messungen erhalten wurden und bei niedrigeren PrP-Konzentrationen das Detektionslimit der HPLC erreicht wurde und PrP(23-111 Δ 41-94) folglich nicht mehr nachgewiesen werden konnte.

Mit dem Rückgang oligomerer A β -Spezies einhergehend ist eine A β -Zunahme in den Fraktionen 11 bis 14 zu beobachten. Diese lässt sich durch entstandene A β -PrP-Komplexe erklären. Somit werden auch mit dem kurzen PrP(23-111 Δ 41-94), das kaum mehr AS beinhaltet als die Regionen der beiden A β -Bindestellen, hochmolekulare Komplexe erhalten. Die hohen Fehlerbalken (Abb. 3.21 E und F) lassen sich dadurch erklären, dass die Komplexe durch die manuelle Fraktionierung des Gradi-

enten nicht immer in derselben Fraktion zu finden sind. Trotz der Beobachtung, dass PrP(23-111 Δ 41-94) A β -Oligomere bindet, werden mit diesem PrP-Konstrukt andere Stöchiometrien erhalten ($8,7 \pm 0,4$ bei $40 \mu\text{M}$ PrP(23-111 Δ 41-94)-Zugabe) als mit PrP(23-230) bzw. PrP(23-144). Dies ist möglicherweise durch sterische Hinderung erklärbar. Diese Ergebnisse werden im Detail in Kapitel 4.4.2 diskutiert.

Ebenfalls nach Hinzufügen von PrP(23-230) und PrP(23-144) zu A β ist insbesondere bei den oligomeren A β -Spezies ein Rückgang zu beobachten, da zunächst in den Fraktionen 1 bis 3 A β übrig bleibt, während die A β -Konzentrationen der folgenden Fraktionen bis einschließlich Fraktion 9 stärker abnehmen. Hierbei ist insbesondere ein Rückgang der A β -Konzentrationen bei den Fraktionen 4 bis 6 zu beobachten. Für einen genauen Überblick ist die A β -Verteilung von Fraktion 1 bis 10 für alle verwendeten PrP-Varianten nach Zugabe von jeweils $10 \mu\text{M}$ vergleichend dargestellt (Abb. 4.1). Die Fraktionen 11 bis 14 werden nicht gezeigt, um einen deutlicheren Blick auf die mittleren Fraktionen, in denen sich die A β -Oligomere befinden, zu haben. Mit PrP(90-230) (Abb. 4.1 grau) ist die Abweichung von der A β -Verteilung ohne PrP (Abb. 4.1 cyan) am niedrigsten. Hier können in den Fraktionen 4 bis 6 noch zwischen $5 - 7 \mu\text{M}$ A β pro Fraktion nachgewiesen werden.

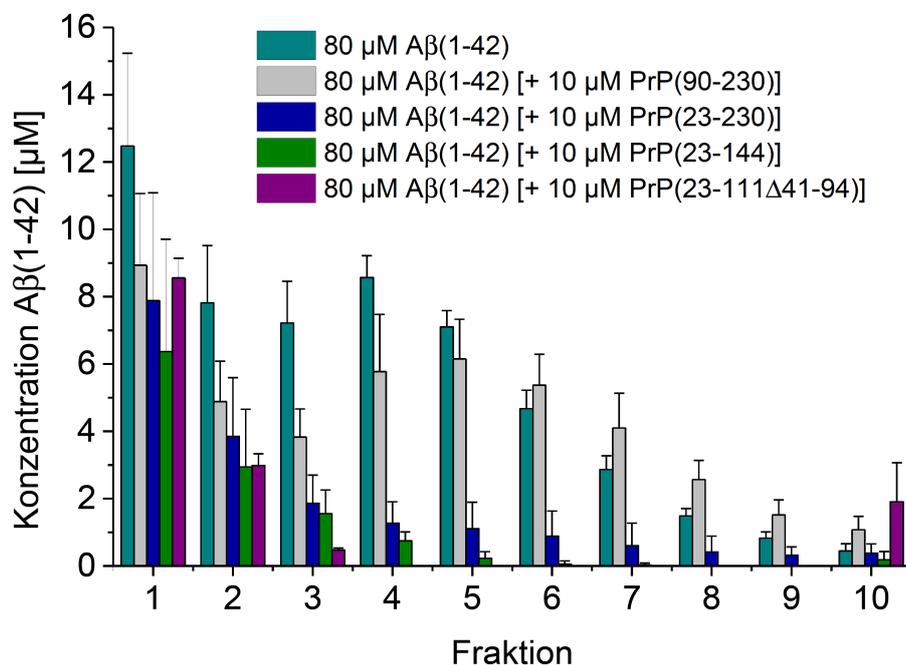


Abbildung 4.1: A β -Verteilung nach Hinzufügen von $10 \mu\text{M}$ der verschiedenen PrP-Varianten. Zur Übersicht der Abnahme der A β -Oligomere werden nur die Fraktionen 1 bis 10 dargestellt. Mit PrP(90-230) (grau) ist der Unterschied zu der A β -Verteilung ohne PrP (cyan) am geringsten. Hinzufügen von PrP(23-230) (blau), PrP(23-144) (grün) oder PrP(23-111 Δ 41-94) (violett) resultiert in einem starken Rückgang oligomerer A β -Spezies, besonders in den Fraktionen 4 bis 6.

Im Falle von PrP(23-230) (Abb. 4.1 blau) liegen die A β -Konzentrationen in den Fraktionen 4 bis 6 hingegen bei maximal 2 μ M pro Fraktion, während mit PrP(23-144) (Abb. 4.1 grün) höchstens 1 μ M nachgewiesen werden kann. Mit PrP(23-111 Δ 41-94) (Abb. 4.1 violett) kann in den Fraktionen 4 bis 6 kein A β gefunden werden. Ebenfalls in den Fraktionen 1 bis 3 kann mit allen PrP-Konstrukten ein Rückgang von A β gezeigt werden. Dieser ist jedoch besonders in Fraktion 1, in der sich hauptsächlich A β -Monomere befinden, am schwächsten und liegt innerhalb der Standardabweichung von A β ohne Hinzufügen von PrP. In der Literatur konnte nach SPR-Messungen für A β -Monomere keine Bindung an PrP gezeigt werden [59, 60]. Es wird davon ausgegangen, dass für die Bindung eine bestimmte dreidimensionale Konformation von A β (1-42) benötigt wird [62], die A β -Monomere wahrscheinlich nicht bilden können.

Der Rückgang von A β in den oberen DGZ-Fraktionen kann durch das Gleichgewicht, das sich zwischen den A β -Monomeren und A β -Oligomeren einstellt, erklärt werden. Durch das Hinzufügen von PrP werden die A β -Oligomere aus dem Gleichgewicht genommen, da sie mit dem PrP Komplexe formen. Deshalb werden vermehrt A β -Oligomere aus den Monomeren produziert und die Konzentration der A β -Monomere nimmt somit folglich ebenfalls stetig ab. Dieser Effekt nimmt mit steigender PrP-Konzentration zu (siehe beispielsweise Kapitel 3.7.2).

Eine weitere interessante Frage ist, welche Größe die gebundenen A β -Oligomere aufweisen. Anhand der hier durchgeführten RP-HPLC-Messungen ist dies nicht ersichtlich, da die A β -Oligomere durch die benötigten Bedingungen zur Dissoziation der Komplexe monomerisiert werden. Somit kann über die RP-HPLC-Messungen zunächst kein Rückschluss auf die gebundene A β -Oligomerspezies gezogen werden. Die errechneten Stöchiometrien (siehe Kapitel 3.7.5 und 4.4.2) werden folglich in A β -Monomeräquivalenten angegeben. Allgemein erschwert der Mangel an zuverlässigen Detektions- und Quantifikationsmethoden in diesem Bereich die Identifikation bestimmter A β -Oligomergrößen [21]. Entsprechend unterschiedlich sind die bisher publizierten Ergebnisse in dieser Hinsicht [65, 67–71]. Zum einen wurde gezeigt, dass überwiegend kleine A β -Oligomere (Dimere, Trimere) mit dem PrP interagieren [67, 68], zum anderen konnte aber auch die Bindung von PrP an hochmolekulare A β -Spezies nachgewiesen werden [69, 70]. Diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse können durch verschiedene Vorbehandlungen von A β und die Herstellung oligomerer A β -Spezies zustande kommen, weshalb die Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen schwierig miteinander zu vergleichen sind. Aber auch die Herkunft des A β könnte hierbei eine große Rolle spielen. So zeigten Dohler et al. eine Bindung von PrP an A β -Dimere bis -Tetramere im Falle von synthetischem

A β [69]. Für A β , das aus Hirnhomogenaten gewonnen wurde, konnten sie hingegen eine Bindung an hochmolekulare A β -Spezies zeigen [69]. So scheint es prinzipiell mehrere A β -Oligomergrößen zu geben, die an das PrP binden können. In dieser Arbeit kann die Größe der A β -Oligomere lediglich anhand der A β -Verteilung im Gradienten eingegrenzt werden, da A β bei den RP-HPLC-Messungen monomerisiert wird. Mit allen drei A β -bindenden PrP-Varianten (PrP(23-230), PrP(23-144) und PrP(23-111 Δ 41-94)) kann ein PrP-konzentrationsabhängiger A β -Rückgang in den Fraktionen 3 bis 9 beobachtet werden (vgl. Kapitel 3.7.1 bis 3.7.4). Diese Abnahme ist insbesondere in den Fraktionen 4 bis 6 sehr stark.

Beim Vergleich mit der Verteilung von einigen Standardproteinen (Abb. 3.9), kann die Aldolase mit einem Molekulargewicht von 158 kDa hauptsächlich in den Fraktionen 4 und 5, in denen sich auch die A β -Oligomere befinden, nachgewiesen werden. Brener et al. konnten mit Hilfe von AFM-Messungen die Größe eines A β -Oligomers aus den vereinigten Fraktionen 4 bis 6 eines Dichtegradienten auf ca. 104 kDa berechnen [128]. Hierbei wurde eine Höhe von 4,7 nm und eine Breite von 8,7 nm zugrunde gelegt [128]. Die in dieser Arbeit untersuchten A β -Oligomere zeigen nach AFM-Messungen Höhen von durchschnittlich 1 - 6 nm, wenige größere Oligomere auch bis zu 10 nm (Abb. 3.24 C). Die A β -Oligomere sind jedoch nicht zuvor durch einen Dichtegradienten aufgetrennt worden, weshalb hier die Gesamtoligomerspezies betrachtet werden. Folglich korreliert die ermittelte Höhe von 4,7 nm aus Brener et al. [128] mit den hier gezeigten Ergebnissen. So kann die gebundene (durch PrP eliminierte) A β -Oligomerspezies auf etwa eine Größe von ca. 100 kDa eingegrenzt werden. Wahrscheinlich werden auch etwas größere A β -Spezies gebunden, da auch bis einschließlich Fraktion 9 ein Rückgang an A β beobachtet werden kann.

Über den Rückgang kleinerer A β -Spezies wie z.B. Dimere bis Tetramere ist es schwierig anhand der hier gezeigten Ergebnisse eine Aussage zu treffen, da der Dichtegradient nicht breit genug ist, um jede einzelne A β -Oligomerspezies aufzutrennen. Dimere bis Tetramere befinden sich hier am wahrscheinlichsten zusammen mit Monomeren in den Fraktionen 1 und 2, in denen der A β -Rückgang deutlich langsamer erfolgt als in den folgenden Fraktionen. Dennoch kann eine Bindung nicht komplett ausgeschlossen werden, da es sich bei dem verwendeten Assay um keinen Bindungsassay handelt. Der A β -Rückgang in den Fraktionen 4 bis 6, in denen größere Oligomere von ca. 100 kDa vorliegen [128], ist jedoch deutlicher.

Mit niedrigen eingesetzten Konzentrationen von PrP(23-230) (2 μ M bzw. 5 μ M) können neben A β auch schwache PrP-Banden in den mittleren DGZ-Fraktionen 4 bis 10 beobachtet werden (Abb. 3.18). Die PrP-Konzentrationen liegen hierbei höchstens bei 0,1 μ M pro Fraktion und sind über RP-HPLC nur noch knapp nachweisbar,

aber deutlich sichtbar in silbergefärbten Tris-Tricin-SDS-Gelen (Abb. 3.18 A und B). Gleichzeitig ist ein PrP-Rückgang in den Fraktionen 1 bis 3 zu erkennen (Abb. 3.18 A und B), in denen sich nicht-gebundenes PrP(23-230) befindet (Abb. 3.17 A). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass sich zunächst kleinere, lockere A β -PrP-Komplexe bilden, die sich in den mittleren DGZ-Fraktionen 4 - 10 befinden und sich dann zu hochmolekularen Komplexen weiter verknüpfen. Deshalb kann auch nur mit niedrigen eingesetzten PrP-Konzentrationen in den mittleren DGZ-Fraktionen PrP gefunden werden, da die Verknüpfung mit mehr PrP schneller erfolgt und die Komplexe dann in den unteren DGZ-Fraktionen 11 bis 14 vorhanden sind.

Diese Vermutung wird durch die in Kapitel 3.7.6 gezeigten AFM-Ergebnisse untermauert, da hier ebenfalls unterschiedlich große A β -PrP(23-144)-Komplexe in Abhängigkeit von der hinzugefügten PrP-Konzentration erhalten werden. Diese wirken mit weniger PrP deutlich lockerer und weniger kompakt als mit höheren eingesetzten PrP-Konzentrationen von beispielsweise 40 μ M (Abb. 3.25 und 3.26). Da keine A β -PrP-Komplexe mit PrP(23-230) untersucht wurden, kann dies nicht 100 %ig belegt werden. Nun sollten nach dieser Logik auch PrP-Banden im Falle von PrP(23-144) in den mittleren DGZ-Fraktionen gefunden werden. Dies ist nach Zugabe von 2 μ M PrP(23-144) auch der Fall. Jedoch sind die Banden so schwach und aufgrund der sehr niedrigen Konzentrationen von unter 0,1 μ M pro Fraktion nur sehr schwierig über RP-HPLC nachweisbar (geringer Unterschied zur Grundlinie), dass diese Mengen kaum auffallen (Abb. 3.19 B und H). Das lässt sich durch die Größe von PrP(23-144) erklären, die mit 123 AS merklich kürzer ist als PrP(23-230) mit 209 AS und deshalb schwerer über RP-HPLC nachgewiesen werden kann.

4.4.2 Stöchiometrien der verschiedenen A β -PrP-Komplexe

Mit Hilfe der RP-HPLC-Messungen der Saccharose-DGZ-Fraktionen 11 bis 14 war es möglich die Stöchiometrien zwischen A β und den jeweiligen eingesetzten PrP-Konstrukten zu ermitteln (siehe Kapitel 3.7.5). Im Falle der A β -Oligomer bindenden PrP-Varianten PrP(23-230), PrP(23-144) und PrP(23-111 Δ 41-94) kann mit steigenden PrP-Konzentrationen in der Ausgangslösung ein sinkendes A β /PrP-Verhältnis in den Komplexen beobachtet werden. Dieses erreicht bei maximal eingesetzter PrP-Konzentration von 40 μ M im Falle von PrP(23-144) ein Verhältnis von $3,93 \pm 0,04$ A β /PrP. Hierbei befindet sich PrP im Überschuss, da es nach DGZ-Messungen zusätzlich in den oberen DGZ-Fraktionen 1 bis 3 zu finden ist. Mit PrP(23-230) kann eine sehr ähnliche Tendenz beobachtet werden. Die höchste untersuchte PrP-

Konzentration betrug 20 μM PrP(23-230). Mit dieser wird ein A β /PrP-Verhältnis von $4,2 \pm 0,9$ erhalten, welches, die Standardabweichung mit eingerechnet, gleich zu der Stöchiometrie mit PrP(23-144) ist. Anhand dieser Stöchiometrien kann auch geschlossen werden, dass der PrP-Hintergrund in den Fraktionen 11 bis 14, der mit PrP(23-230) allein erhalten wird (Abb. 3.17 A), bei den Berechnungen vernachlässigt werden kann. Anhand der unter Kapitel 3.7.1 und 3.7.2 beschriebenen Ergebnisse konnte bereits gezeigt werden, dass sich diese beiden PrP-Konstrukte sehr ähnlich verhalten. Auch in der Literatur wurden über SPR-Messungen K_D -Werte im nanomolaren Bereich für PrP(23-230) und das N1-Fragment, einem dem PrP(23-144) ähnlichen Konstrukt, erhalten [60]. Somit spiegeln die sehr ähnlichen Stöchiometrien mit PrP(23-230) und PrP(23-144) bereits publizierte Daten wider, bei denen PrP(23-230) und N1 ein ähnliches Bindeverhalten zeigen [60].

Mit PrP(23-111 Δ 41-94) konnte zwar ebenfalls eine effektive Eliminierung der A β -Oligomere gezeigt werden (siehe Kapitel 3.7.4) und auch in der Literatur wird mit diesem -dort als P2 bezeichneten- Konstrukt ein K_D -Wert von 26,3 nM erhalten [60], die Stöchiometrien innerhalb der resultierenden A β -PrP-Komplexe weichen aber auffällig von denen mit PrP(23-230) und PrP(23-144) ab (siehe Kapitel 3.7.5). So wird hier bei einem initialen Konzentrationsverhältnis von 80 μM A β zu 40 μM PrP(23-111 Δ 41-94) eine A β /PrP-Stöchiometrie von $8,7 \pm 0,4$ in den Komplexen erhalten. Wie PrP(23-144) befindet sich PrP(23-111 Δ 41-94) ebenfalls bei dieser Konzentration im Überschuss. Bereits nach Zugabe von 20 μM PrP(23-111 Δ 41-94) kann dieses in den oberen DGZ-Fractionen nachgewiesen werden und zeigt somit einen Überschuss an (Abb. 3.21). Das A β /PrP-Verhältnis von $8,7 \pm 0,4$ ist in etwa doppelt so hoch wie die A β /PrP-Verhältnisse mit PrP(23-230) und PrP(23-144). Folglich sind mit PrP(23-111 Δ 41-94) nur halb so viele PrP-Moleküle in den Komplexen gebunden. Unter Berücksichtigung, dass PrP(23-111 Δ 41-94) lediglich ein Molekulargewicht von etwa 4 kDa aufweist und ein durchschnittliches A β -Oligomer ca. 100 kDa groß ist (nach Werten von Brener et al. [128], s.o.), wäre ein A β -Oligomer in etwa 25 Mal größer als PrP(23-111 Δ 41-94). So könnte PrP(23-111 Δ 41-94) sterisch daran gehindert sein alle vorhandenen Bindestellen der A β -Oligomere zu besetzen, da es zu kurz ist, um die Oligomere auf dieselbe Art und Weise zu verknüpfen wie PrP(23-230) oder PrP(23-144). So können die unterschiedlichen Stöchiometrien bei ähnlichem Einfluss auf A β -Oligomere erklärt werden.

Mit PrP(90-230) werden unter Berücksichtigung des Fehlers mit allen untersuchten Konzentrationen ähnliche A β /PrP-Verhältnisse von etwa 8 : 1 erhalten. Insgesamt sind die Fehlerbalken höher als bei den anderen PrP-Konstrukten. Diese lassen sich dadurch erklären, dass nach PrP(90-230)-Zugabe weniger A β -PrP-Komplexe ent-

standen sind, die, bedingt durch die niedrigeren Proteinmengen, lediglich schwache Absorptionssignale bei RP-HPLC-Messungen erzielten. So können beispielsweise bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 20 μM PrP(90-230) nur etwa 15 % des PrP(90-230) sowie 30 - 40 % des A β in den DGZ-Fraktionen 11 bis 14, in denen sich die Komplexe befinden, nachgewiesen werden (Abb. 3.23). Insbesondere bei den niedrigen eingesetzten PrP-Konzentrationen 2 μM und 5 μM erschwert die geringere Ausbildung von A β -PrP-Komplexen die Messungen. So werden hier mitunter pro Fraktion teilweise PrP-Konzentrationen von nur 0,1 bis 0,2 μM erhalten, weshalb diese A β /PrP-Verhältnisse am ungenauesten sind.

Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass auch mit PrP(90-230) A β -PrP-Komplexe erhalten werden, wenn auch weitaus weniger und die A β /PrP-Stöchiometrien von der etwa 4 : 1 Stöchiometrie, die mit PrP(23-230) sowie PrP(23-144) im Falle eines PrP-Überschusses erhalten wird, abweichen. Somit hat die Eliminierung der Bindestelle im Bereich AS 23 - 27 einen starken Einfluss auf die Bindung von PrP(90-230) an A β -Oligomere. Die etwa um den Faktor zwei reduzierte Menge an PrP(90-230) in den Komplexen deutet an, dass durch den Wegfall der Bindestelle im PrP die Quervernetzung der A β -Oligomere eingeschränkt ist. Möglicherweise ist PrP(90-230) auch sterisch an der Bindung der Oligomere gehindert, da der flexible Teil fehlt und nur der gefaltete kompaktere Bereich des PrPs erhalten ist. Dies würde die Ausbildung von Komplexen ebenfalls einschränken, da die Oligomere kompakter gebunden werden und weniger Platz für weiteres PrP(90-230) ist.

Auch in der Literatur konnte bereits gezeigt werden, dass der Effekt von PrP(90-230) bzw. dort meist PrP(90-231) schwächer ist als der von PrP(23-231) oder PrP(23-144). So zeigten Nieznanski et al., dass PrP(90-231) die Fibrillenbildung von A β nur teilweise unterbindet und hierfür zehnfach höhere Konzentrationen notwendig sind, um den gleichen inhibitorischen Effekt auf die Fibrillenbildung zu erzielen wie PrP(23-231) oder PrP(23-144) [66]. Auch die Verringerung von A β -vermittelter Neurotoxizität konnte mit PrP(90-231) gezeigt werden [101]. Der Effekt war hierbei jedoch erheblich schwächer als mit Vollängen-PrP oder dem N1-Fragment [101]. Chen et al. hingegen konnten nach Deletion der AS 23 - 89 gar keine Bindung mehr an A β -Oligomere beobachten [59].

Alle hier errechneten Stöchiometrien helfen einen genaueren Einblick in die Interaktion von A β mit PrP zu bekommen, da bisher noch keine Stöchiometrien diesbezüglich veröffentlicht wurden. Bisher wurden unterschiedliche Mengen teils verschiedener PrP-Konstrukte zu A β gegeben und beispielsweise der Effekt auf die A β -vermittelte Zytotoxizität überprüft [68] oder die verschiedenen A β /PrP-Mischungen über AFM untersucht [101]. Hierbei wurden jedoch unterschiedliche

Strukturen erhalten als bei den in der vorliegenden Arbeit gezeigten AFM-Bildern (vgl. Kapitel 4.4.3). A β /PrP-Verhältnisse innerhalb der entstandenen Komplexe konnten bisher jedoch noch nicht gezeigt werden.

4.4.3 Untersuchung von A β -PrP(23-144)-Komplexen über AFM

Für strukturelle Einblicke in die A β -PrP-Komplexe wurden diese über AFM untersucht. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen an PrP(23-144) auf vorinkubiertes A β gegeben, die Komplexe mehrfach gewaschen und untersucht. Zunächst bestand die Idee die Komplexe über einen Saccharosedichtegradienten aufzutrennen, um überschüssiges A β oder PrP zu entfernen. Hierbei bestand jedoch die Schwierigkeit, dass sich die Komplexe in Fraktionen mit sehr hohen Saccharosekonzentrationen von etwa 50 - 55 % [129] befanden. Diese musste harsch abgewaschen werden, um die A β -PrP-Komplexe messen zu können, was die strukturellen Eigenschaften beeinflussen kann. Deshalb wurden die Komplexe nicht über einen Gradienten von überschüssigem Protein getrennt, sondern gewaschen.

Die erhaltenen A β -PrP(23-144)-Komplexe setzen sich aus vielen globulären Strukturen zusammen, die alle jeweils deutlich größer als ein einzelnes A β -Oligomer sind (Abb. 3.26). Je nach zugegebener PrP(23-144)-Konzentration sind morphologische Unterschiede sowie Eigenschaften der Probe erkennbar. Mit niedrigen PrP-Konzentrationen (1 μ M PrP auf 80 μ M A β) werden zunächst Komplexe erhalten, die aus kleinen globulären Strukturen bestehen, die locker miteinander verknüpft zu sein scheinen. Mit steigender PrP(23-144)-Konzentration in der Ausgangslösung wird die Oberfläche der Komplexe zunehmend glatter, klebriger (dadurch schwieriger zu messen) sowie das gesamte Aggregat höher und kompakter (Abb. 3.25). Anhand der mehreren 100 nm hohen Komplexe wird deutlich, dass sich die Ausgangsmaterialien zu großen Aggregaten verknüpft haben. Diese AFM-Bilder spiegeln die Ergebnisse aus den DGZ-Läufen wider, bei denen die Komplexe in den unteren DGZ-Fractionen 11 bis 14 gefunden werden können (Abb. 3.19), die sehr hohe Saccharosekonzentrationen beinhalten und folglich sich darin befindliche Proteine bzw. Proteinkomplexe Größen im Megadalton-Bereich aufweisen müssen. Ebenfalls bereits publizierte Daten zeigen AFM-Aufnahmen von A β -PrP-enthaltenden Proben [66, 101]. Hierbei wurden entweder PrP(23-231) oder das N1-Fragment untersucht. Bei Nieznanski et al. können hierbei nach 15 h Inkubation ebenfalls große amorphe Aggregate beobachtet werden und keinerlei fibrilläre Strukturen [66]. Einen genauen strukturellen Einblick in diese Aggregate zeigten die

Autoren jedoch nicht, da deren Fokus auf dem Vorhandensein von oligomeren bzw. fibrillären A β -Strukturen lag [66]. Scott-McKean et al. haben ebenfalls den Effekt nach Hinzufügen verschiedener Mengen von PrP(23-231) oder N1 auf A β über AFM untersucht [101]. Auch hier lag der Schwerpunkt auf den A β -Oligomeren. Amorphe Aggregate bestehend aus A β und PrP können den Bildern jedoch nicht entnommen werden [101].

4.4.4 Strukturelle Untersuchungen der A β -PrP-Komplexe über FK-NMR

Um einen genauen strukturellen Einblick in die A β -PrP-Komplexe zu bekommen, wurden Komplexe bestehend aus ^{13}C - ^{15}N markiertem PrP(23-230), PrP(23-144) oder A β generiert. Wichtig ist, dass nur eine der beiden Komponenten markiert vorlag. Zunächst wurden Proben hergestellt, bei denen PrP(23-230) bzw. PrP(23-144) die markierte Spezies sind. Mit beiden Prion-Konstrukten war lediglich eine partielle Zuordnung weniger Resonanzen möglich. Insbesondere die Signale aus der Octarepeat-Region weisen kaum unterschiedliche chemische Verschiebungen auf, was in der Überlappung vieler Signale resultiert, die nicht mehr unterschieden und zugeordnet werden können. Die erhaltenen Resonanzen stimmen weitestgehend mit den durch Zahn et al. zugeordneten Signalen des N-Terminus' (AS 23 - 124) überein, jedoch weniger mit den Resonanzen des C-Terminus' [40]. Folglich kann daraus geschlossen werden, dass in den hier gezeigten PDSD-Spektren insbesondere der N-Terminus zu erkennen ist, was sich durch die Bindung an A β -Oligomere erklären lässt, da der N-Terminus hierdurch weniger flexibel wird. Somit unterstützen diese Ergebnisse die bereits gezeigten Daten (vgl. Kapitel 3.7.1 - 3.7.3) sowie Literaturangaben, bei denen die Bindung von A β -Oligomeren an den PrP-N-Terminus gezeigt wurde [59–61].

Da eine vollständige Zuordnung der erhaltenen Resonanzen mit markiertem PrP nicht möglich war, wurden FK-NMR-Proben mit ^{13}C - ^{15}N markiertem A β (1-42) und nicht markiertem PrP(23-144) angefertigt (Abb. 3.28 und 3.32). Der Vorteil gegenüber einer PrP-Markierung sind hierbei die geringere Länge des A β mit lediglich 42 AS sowie das Nichtvorhandensein chemisch sehr ähnlicher Bereiche, wie es hingegen bei PrP, hervorgerufen durch die Octarepeats, der Fall ist. Die mit markiertem A β erhaltenen Daten erlaubten größtenteils eine Zuordnung der erhaltenen Resonanzen. Es zeigte sich jedoch, dass in den aufgenommenen PDSD-Spektren mehr als ein Satz an Resonanzen gefunden wurde (siehe Tabelle 3.2). Eine mögliche Erklärung hierfür

wäre, dass die Komplexprobe noch nicht mit PrP(23-144) abgesättigt war, da zum Zeitpunkt der Probenherstellungen die unter Kapitel 3.7.5 beschriebenen Stöchiometrien noch nicht bekannt waren. Anschließende Saccharose-DGZ mit nachfolgender RP-HPLC-Messung ergab ein A β /PrP-Verhältnis innerhalb der Komplexe von etwa 8,6 : 1, bei dem noch keine PrP-Sättigung vorhanden ist.

Die unterschiedlichen A β -Konformere in den A β -PrP-Komplexen wurden mit Literaturdaten von A β -Fibrillen bzw. den hexameren Grundbausteinen von A β -Protofibrillen verglichen [27, 149, 150] (Abb. 3.30 und 3.31). In allen putativen A β -Konformeren können mehrere in β -Faltblattkonformation befindliche Aminosäuren gefunden werden (Abb. 3.31 Pfeile). Darunter weist eines der Konformere mehr Ähnlichkeiten zu den hexameren Protofibrillen [150], ein anderes mehr Übereinstimmungen zu A β -Fibrillen auf [149].

Um zu untersuchen, ob diese Inhomogenität des A β in der Probe für die Ausbildung von A β -PrP-Komplexen benötigt wird oder durch das nicht vollständige Absättigen mit PrP(23-144) zustande kommt, wurde eine weitere Probe mit ^{13}C - ^{15}N markiertem A β (1-42) (156,51 μM) und nicht markiertem PrP(23-144) (78,25 μM) angefertigt. Die A β /PrP-Stöchiometrie innerhalb der Komplexe beträgt $3,70 \pm 0,12$ und zeigt folglich einen Wert, bei dem die Probe mit PrP(23-144) gesättigt ist (vgl. Kapitel 3.7.5). Ein Übereinanderlegen der PDSD-Spektren mit markiertem A β bei PrP(23-144)-Unterschuss bzw. -Überschuss zeigt, dass einige der Resonanzen bei PrP-Unterschuss in dem Spektrum bei PrP-Überschuss nicht mehr vorhanden sind (Abb. 3.32 orangene Kreise). Neue Resonanzen, die in dem Spektrum bei PrP-Unterschuss nicht vorkommen, können hingegen nicht gefunden werden. Folglich scheint die eingesetzte PrP-Konzentration einen Einfluss auf die A β (1-42)-Struktur innerhalb der Komplexe zu haben. Da diese PDSD-Spektren jedoch erst gegen Ende der vorliegenden Arbeit durch Anna König aufgenommen wurden, handelt es sich hier um vorläufige Ergebnisse, die noch durch weitere Messungen bestätigt werden müssen. Daher werden diese Daten noch nicht mit Literaturdaten verglichen.

4.5 Einfluss von CSB und D-Peptiden auf die A β -PrP-Interaktion

Nachdem die A β -PrP-Interaktion ausführlich charakterisiert wurde, können insbesondere die Verteilungen von A β und PrP im Dichtegradienten sowie die ermittelten A β /PrP-Stöchiometrien herangezogen werden, um den Einfluss von Substanzen

(hier: CSB und D-Peptiden) auf diese Bindung zu untersuchen. Die Idee ist hierbei eine Substanz zu finden, die entweder an A β oder PrP bindet, infolgedessen die für die A β -PrP-Interaktion benötigten Bindestellen besetzt und somit die Interaktion verhindert. Durch die A β -PrP-Interaktion wird im Krankheitsfall ein toxisches Signal mithilfe des Rezeptors mGluR5 über die Membran geleitet, bei der die intrazelluläre Fyn-Kinase aktiviert wird. Diese phosphoryliert sowohl das Tau-Protein als auch NMDA-Rezeptoren, was letztendlich zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration führt und toxisch für die Zelle ist (vgl. Abb. 1.6).

4.5.1 Einfluss von CSB

Es konnte bisher gezeigt werden, dass bei Verwendung von anti-PrP-Antikörpern die Anlagerung von A β an zelluläres PrP und die daraus folgende Neurotoxizität verhindert werden kann [57, 77, 79, 83]. Ebenfalls wurde nachgewiesen, dass das Porphyrin „Fe(III)-TMPyP“ sowie CSB an das Prion-Protein binden [102, 103]. Da das Porphyrin am C-Terminus des PrPs bindet, ist es für diese Arbeit von geringem Interesse, da die Bindung von A β -Oligomeren an den N-Terminus des PrPs erfolgt [57, 59–62]. Kürzlich konnte ebenfalls eine Inhibition der Elongation von A β -Fibrillen gezeigt werden, für die der C-Terminus des PrPs benötigt wird [157]. Zur Charakterisierung der A β -PrP-Interaktion war das kleine organische Molekül CSB für diese Arbeit besonders interessant, da es die Bindung von A β an PrP verhindern kann [103].

Für die Untersuchungen mit CSB wurden zwei verschiedene CSB-Konzentrationen sowie CSB-Zugabereihenfolgen bei gleichbleibenden A β - und PrP(23-144)-Ausgangskonzentrationen (80 μ M bzw. 10 μ M) untersucht. Wurde CSB erst nach Ausbildung der A β -PrP-Komplexe hinzugefügt, so ist kaum ein Unterschied -im Vergleich zu einer Probe ohne CSB- in den Verteilungen von A β oder PrP(23-144) im Dichtegradienten zu erkennen (Abb. 3.33 D und E und Abb. 3.19). Werden PrP(23-144) und CSB miteinander vermischt und gemeinsam zu A β -Oligomeren gegeben, so werden weniger A β -Oligomere in A β -PrP-Komplexe eingebunden, erkennbar an dem Vorhandensein von A β in den DGZ-Fractionen 4 bis 6 (Abb. 3.33 B und C). Dieser Effekt ist abhängig von der CSB-Konzentration.

So scheint es, dass CSB die A β -Oligomere nicht verdrängen und um die Bindestellen auf PrP konkurrieren kann, sofern A β und PrP bereits aneinander gebunden haben. Dies ließe sich durch die höhere Affinität von PrP(23-230) (bzw. PrP(23-231)) zu A β mit einem K_D -Wert von etwa 30 nM [60] als zu CSB mit einem K_D -Wert

von etwa 550 nM [103] erklären. Dies sind lediglich erste Eindrücke, da die Versuche erst einmal durchgeführt wurden und wiederholt werden müssten. Ebenfalls bereitete die Quantifizierung insbesondere von PrP(23-144) bei CSB-Anwesenheit Schwierigkeiten und müsste optimiert werden.

4.5.2 Einfluss von D-Peptiden

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob A β -bindende und therapeutisch aktive D-enantiomere Peptide eine weitere potentielle Wirkstoffklasse zur Verhinderung der A β -PrP-Interaktion darstellen. An dem „Institute of Complex Systems Strukturbiochemie (ICS-6), Forschungszentrum Jülich GmbH“ sowie dem „Institut für Physikalische Biologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“, an denen die vorliegende Arbeit durchgeführt wurde, werden D-Peptide mit Hinblick als Wirkstoffe gegen Alzheimer untersucht. Es wurden D-Peptide entdeckt, die selektiv A β unter Ausbildung amorpher Co-Aggregate binden, die weder toxisch noch fibrillär oder amyloidogen sind [115]. Nach der Behandlung mit bestimmten D-Peptiden werden die amyloiden A β -Plaques reduziert und die kognitiven Fähigkeiten transgener Mäuse verbessert, auch nach Einsatz bei vorangeschrittener Krankheit [114–116]. Für das an den o.g. Instituten entwickelte D-Peptid RD2 konnte gezeigt werden, dass es oral biologisch verfügbar ist, eine lange Halbwertszeit von 60 h aufweist sowie das Lernvermögen von transgenen Mäusen verbessert [119, 158]. Somit hätte es beste Voraussetzungen als Therapeutikum. Nachdem als Kontrolle gezeigt wurde, dass RD2-FITC mit PrP(23-144) keine hochmolekularen Aggregate formt (Abb. 3.34), wurde der Einfluss von diesem D-Peptid auf die A β -PrP-Interaktion untersucht. Nach Analyse einer initialen Mischung von 40 μ M RD2-FITC mit 80 μ M A β und 10 μ M oder 40 μ M PrP(23-144) (Abb. 3.35), kann zwar insbesondere bei Verwendung von wenig PrP(23-144) das RD2-FITC auch in den Fraktionen 11 bis 14 gefunden werden, die Hälfte verbleibt aber in den Fraktionen 1 bis 4. Bei Einsatz von 40 μ M PrP(23-144) sind nur etwa 10 % des RD2-FITC in den Fraktionen 11 bis 14 vorhanden. Bei beiden eingesetzten PrP-Konzentrationen werden, mit Werten von $8,6 \pm 0,2$ und $4,4 \pm 0,2$, sehr ähnliche A β /PrP-Stöchiometrien erhalten wie ohne Verwendung von RD2-FITC (hier: $8,3 \pm 1,1$ bzw. $3,93 \pm 0,04$). Folglich kann das RD2-FITC das PrP(23-144) nicht aus den A β -PrP-Komplexen verdrängen oder unter den untersuchten Bedingungen eine Bindung an A β verhindern. Da aber RD2-FITC in den Fraktionen 11 bis 14 gefunden werden kann, hat dieses entweder an noch nicht durch PrP(23-144) besetzte Bindestellen in den A β -PrP-Komplexen

gebunden oder an freie A β -Oligomere. Diese könnten vermehrt entstanden sein, da mit PrP(23-144) und RD2-FITC zwei A β -bindende Substanzen in der Lösung vorhanden sind, die Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen A β -Monomeren und A β -Oligomeren nehmen, und somit mehr A β -Oligomere gebildet werden. Was von diesen beiden Möglichkeiten passiert ist oder eventuell beides parallel, lässt sich anhand der Ergebnisse nicht sagen.

Da nach Einsatz von 40 μ M RD2-FITC nicht der gewünschte Effekt erzielt wurde, wurde untersucht, ob bei Verwendung von 500 μ M RD2-FITC eine Bindung von PrP(23-144) an A β -Oligomere verhindert werden kann. Hierbei zeigte sich, dass die A β /PrP-Stöchiometrie in den Komplexen mit $15,1 \pm 0,4$ von der Stöchiometrie ohne RD2-FITC bei Verwendung von 10 μ M PrP(23-144) ($8,3 \pm 1,1$) abweicht. Trotzdem kann selbst diese hohe RD2-FITC-Konzentration eine Anlagerung von PrP(23-144) nicht gänzlich verhindern. Deshalb wurden weitere D-Peptide analysiert.

Im weiteren Verlauf wurden die D-Peptide D3D3-FITC sowie RD2D3-FITC untersucht, von denen ebenfalls bekannt ist, dass sie A β -Oligomere effektiv binden [118, 128]. Nach Behandlung mit D3D3 oder RD2D3 konnten beide D-Peptide im Gehirn von Mäusen nachgewiesen werden [151]. Beide zeigten ungünstigere pharmakokinetische Eigenschaften, verglichen mit D3 oder RD2, dafür aber eine höhere Effektivität [128, 151]. Ferner konnte für RD2D3 eine Reduktion von A β -vermittelter Zytotoxizität gezeigt werden [159]. In Vorversuchen erwies sich RD2D3-FITC als das vielversprechendere D-Peptid, weshalb es in dieser Arbeit ausführlicher untersucht wurde. Wie bereits mit RD2-FITC zeigte die Kontrolle mit RD2D3-FITC und PrP(23-144), dass sich keine hochmolekularen Aggregate bilden (Abb. 3.37).

Für weitere Untersuchungen wurden gleichbleibende Konzentrationen von 80 μ M A β sowie 40 μ M PrP(23-144) in der Ausgangslösung gewählt und unterschiedliche RD2D3-FITC-Konzentrationen von 20 μ M oder 40 μ M analysiert. Ebenfalls wurde untersucht, ob die Zugabereihenfolge von RD2D3-FITC einen Einfluss auf die Interaktion hat. Hierbei waren zwei große Tendenzen zu erkennen: Zum einen ist der Effekt von RD2D3-FITC umso größer, je eher es zu A β hinzugefügt wird. Zum anderen kann mit einer höheren RD2D3-FITC-Konzentration ein größerer Einfluss auf die A β -PrP-Interaktion beobachtet werden (siehe Kapitel 3.9.2.4). Wird RD2D3-FITC erst hinzugefügt, nachdem sich bereits A β -PrP-Komplexe geformt haben, so ist innerhalb der A β /PrP-Stöchiometrien kein Unterschied zur Referenz ohne D-Peptide messbar (Abb. 3.40). In diesen Fällen wird eine Stöchiometrie von etwa 4 A β : 1 PrP(23-144) erhalten. Ebenfalls erkennbar ist, dass bei diesem Zeitpunkt der RD2D3-FITC-Zugabe dieses kaum in den Fraktionen 11 bis 14 nachgewiesen

werden kann, sondern sich -im Falle von 40 μ M RD2D3-FITC-Zugabe- zu etwa 70 % in den Fraktionen 1 bis 3 befindet (Abb. 3.39 C und D). Wird RD2D3-FITC vor PrP(23-144) zu A β -Oligomeren gegeben, so ist die größte Abweichung zur Referenz messbar. Im Falle von 40 μ M RD2D3-FITC-Zugabe wird hierbei ein A β /PrP-Verhältnis von $14,3 \pm 0,5$ erhalten. Die zweithöchste Abweichung von der Referenz wird nach Vermischen von PrP(23-144) mit 40 μ M RD2D3-FITC erhalten ($10,4 \pm 0,4$), gefolgt von früher 20 μ M RD2D3-FITC-Zugabe ($7,7 \pm 0,2$) (siehe Kapitel 3.9.2.4). Korrespondierend zu der Beobachtung, dass bei früher RD2D3-FITC-Zugabe (40 μ M) mehr RD2D3-FITC in den Fraktionen 11 bis 14 gefunden werden kann, nimmt die PrP(23-144)-Konzentration in den Komplexen ab. So befinden sich lediglich 25 - 30 % des verifizierten PrPs in den Komplexen, verglichen zu etwa 80 % bei früher PrP-Zugabe (Abb. 3.39).

Insgesamt konnte mit RD2D3-FITC ein D-Peptid gefunden werden, das in der Lage ist bei den hier untersuchten Bedingungen die A β -PrP-Interaktion zu beeinflussen und die Bindung des PrP(23-144) an A β -Oligomere stark zu reduzieren. Hierbei beeinflusst die Reihenfolge der Zugabe das Ergebnis: Je früher RD2D3-FITC zu der Probe gegeben wird, umso größer ist der Effekt auf die A β -PrP-Interaktion.



Abbildung 4.2: Aminosäuresequenzen von PrP, RD2 und RD2D3. Dargestellt ist der N-terminale Bereich des PrPs von AS 23 - 115 sowie die Regionen, die für die Bindung von A β -Oligomeren benötigt werden. Blau hinterlegte Bereiche kennzeichnen basische AS.

Anhand der unterschiedlichen Wirkungen von RD2-FITC bzw. RD2D3-FITC auf die A β -PrP-Interaktion können Überlegungen vorgenommen werden, welche Regionen hierfür entscheidend sind. RD2(-FITC) zeichnet sich durch eine hohe positive

C-terminale Ladungsdichte bestehend aus fünf Argininen aus (Abb. 4.2). Ebenfalls die Bindestellen auf PrP für A β -Oligomere enthalten mehrere basische AS, die insbesondere zu Beginn der PrP-Sequenz (AS 23 - 27) sehr dicht beieinander liegen. Dennoch ist der Einfluss von RD2-FITC auf die A β -PrP-Interaktion sehr schwach (siehe Kapitel 3.9.1). RD2D3(-FITC) hingegen, das aus mehreren aneinandergereihten basischen AS sowie einem alternierenden Bereich aus basischen und neutralen AS besteht (Abb. 4.2), kann die Bindung von PrP an A β -Oligomere deutlich beeinflussen (siehe Kapitel 3.9.2).

Erklärungen hierfür könnten sein, dass RD2-FITC zu kurz ist oder nicht genügend positiv geladene AS beinhaltet. Letzteres allein ist eher unwahrscheinlich, da das D-Peptid D3D3-FITC, welches in Vorversuchen analysiert wurde, sich aus denselben AS zusammensetzt wie RD2D3-FITC, jedoch weniger vielversprechende Ergebnisse zeigte. Somit scheint die Reihenfolge der AS entscheidend zu sein. Für eine genaue Beurteilung müssten jedoch weitere Experimente mit D3D3-FITC durchgeführt werden. Ebenfalls interessant ist die Sequenz „RRRPR“ von AS 11 - 15 der RD2D3-FITC-Sequenz. Diese ist analog der Sequenz „KKRPK“ von AS 23 - 27 des PrPs, welche für eine Bindung von A β -Oligomeren benötigt wird. Um jedoch Aussagen treffen zu können, dass dieses Sequenzmotiv entscheidend ist, müssten weitere D-Peptide, bestehend aus denselben AS wie RD2D3-FITC, aber mit anderer Anordnung, untersucht werden. Dennoch kann anhand der Sequenzen und Effektivitäten von RD2-FITC und RD2D3-FITC ein erster Eindruck gewonnen werden, welche Voraussetzungen ein D-Peptid für eine erfolgreiche Unterbindung der A β -PrP-Interaktion erfüllen muss. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die A β -PrP-Interaktion dazu genutzt werden kann nach Substanzen zu suchen, die in der Lage sind die Ausbildung von A β -PrP-Komplexen zu unterbinden. Dazu war die vorherige detaillierte Charakterisierung der A β -PrP-Komplexe entscheidend.

4.6 Modell der A β -PrP-Komplexe

All die oben aufgeführten Ergebnisse und Schlussfolgerungen können dazu verwendet werden ein Modell zu erstellen, wie die A β -PrP-Komplexe aussehen könnten. Liegt PrP(23-144) im Überschuss vor, so wird ein A β /PrP-Verhältnis von 4 : 1 innerhalb der Komplexe erhalten (in A β -Monomeräquivalenten, vgl. Kapitel 3.7.5). Um die Frage zu klären wie viele PrP-Moleküle an ein A β -Oligomer binden, ist die Größe der Oligomere entscheidend. Diese kann anhand der in dieser Arbeit gezeigten

Daten nicht exakt bestimmt, aber dennoch eingegrenzt werden (siehe Kapitel 4.4.1). Die Herstellungsbedingungen von A β -Oligomeren sowie deren Analysemethoden nach Brener et al. [128] sind sehr ähnlich zu den hier verwendeten Methoden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die hier entstandenen A β -Oligomere in ähnlicher Größenordnung liegen wie die von Brener et al. (vgl. Kapitel 4.4.1). Deren Ergebnisse korrespondieren mit A β -Oligomeren, die aus etwa 23 A β -Monomeren bestehen [128]. Unter der Annahme, dass die vorliegenden A β -Oligomere gleich groß sind, binden durchschnittlich etwa sechs PrP-Moleküle an ein A β -Oligomer, sofern alle Bindestellen besetzt sind (Abb. 4.3 B).

Die AFM-Bilder von A β -PrP-Komplexen bei PrP-Sättigung (Abb. 3.25 C und Abb. 3.26 D) zeigen bis zu 1 μm hohe Strukturen mit glatten Substrukturen, die aufgrund der Klebrigkeit von PrP schwierig per AFM darzustellen sind. Mit Hilfe des Modells können diese Strukturen dadurch erklärt werden, dass durch das Überangebot von PrP alle Bindestellen auf den A β -Oligomeren mit PrP besetzt sind, die innerhalb der Komplexe entstandenen Substrukturen dadurch enger miteinander verknüpft sind und die Oberfläche deshalb glatter wird (Abb. 4.3 B, rechts unten). Liegt keine PrP-Sättigung vor, so ist der A β -Anteil innerhalb der Komplexe höher, erkennbar an den steigenden A β /PrP-Stöchiometrien bei abnehmender eingesetzter PrP-Konzentration (vgl. Kapitel 3.7.5). Die Stöchiometrien spiegeln die Strukturen der Komplexe, die über AFM erkennbar sind, wider. Diese ist bei niedrigeren PrP(23-144)-Konzentrationen lockerer und zahlreiche kleinere Substrukturen sind erkennbar, die an „Himbeeren“ erinnern (Abb. 3.26 B und C). Diese lockeren Substrukturen entstehen dadurch, dass weniger PrP an die A β -Oligomere bindet und diese weniger quervernetzen kann (Abb. 4.3 A) als bei PrP-Überschuss. Insgesamt sind diese entstandenen A β -PrP-Komplexe flacher als die nach Zugabe von 40 μM PrP(23-144) zu 80 μM A β (Abb. 3.25).

Dieses Modell kann ebenfalls das Verhalten und die Stöchiometrien von PrP(23-111 Δ 41-94) erklären, auch wenn mit diesem PrP-Konstrukt keine AFM-Aufnahmen gemacht wurden. PrP(23-111 Δ 41-94) ist lediglich 35 AS lang und, die o.g. A β -Oligomergröße vorausgesetzt, etwa 25 Mal kleiner als ein Oligomer. Dadurch kann es aus sterischen Gründen nur etwa jede zweite Bindestelle besetzen, weil die A β -Oligomere dichter gepackt werden als mit PrP(23-144) oder PrP(23-230). Bei Einsatz von RD2D3-FITC bindet das D-Peptid anstelle von PrP an A β , wodurch sich die höheren A β /PrP-Verhältnisse erklären lassen. Strukturell wurden die A β -Peptid-Komplexe in dieser Arbeit nicht untersucht. Es gibt aber bereits elektronenmikroskopische Aufnahmen von A β -Peptid-Komplexen mit verschiedenen D-Peptiden, u.a. mit D3 [115, 160, 161].

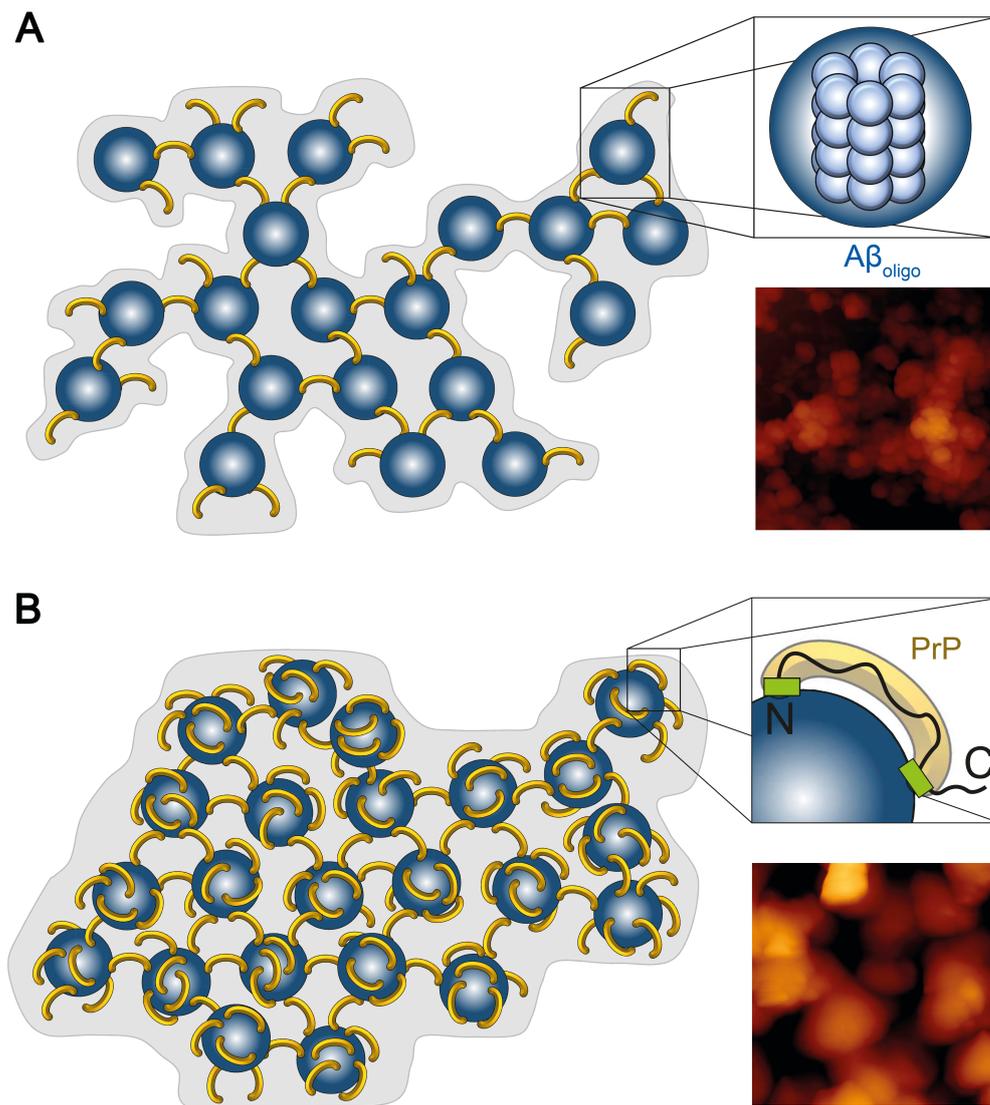


Abbildung 4.3: Modell der A β -PrP-Komplexe. Zur Übersicht werden die Modelle der A β -PrP-Komplexe zweidimensional dargestellt. Dunkelblaue Kreise symbolisieren A β -Oligomere, die sich durchschnittlich aus 24 A β -Monomeren (hellblaue Kreise, A rechts oben) zusammensetzen; gelbe Bögen symbolisieren PrP, Binderegionen sind in grün dargestellt (B rechts oben). Ausgehend von einer Stöchiometrie von 4 A β Monomeren : 1 PrP ergibt sich eine durchschnittliche Bindung von 6 PrP-Molekülen pro Oligomer bei PrP-Sättigung (B). Im Falle eines PrP-Unterschusses ist die Quervernetzung der A β -Oligomere durch PrP niedrig, die Komplexe sind insgesamt locker und feine Substrukturen erkennbar, symbolisiert durch den grauen Hintergrund (A). Das Modell erklärt die vielen feinen Strukturen, die in den AFM-Aufnahmen bei PrP-Unterschuss (hier: Probe generiert aus 80 μ M A β mit 1 μ M PrP(23-144)) zu erkennen sind (A rechts unten). Bei Sättigung der Probe mit PrP sind alle Bindestellen auf den A β -Oligomeren besetzt (B). Es gibt mehr Verknüpfungen innerhalb der Komplexe, die dadurch sehr kompakt sind, eine glatte Oberfläche aufweisen und weniger Unterstrukturen bilden. Die AFM-Aufnahme zeigt A β -PrP-Komplexe generiert aus 80 μ M A β mit 40 μ M PrP(23-144) (B rechts unten).

4.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die A β -PrP-Interaktion intensiv untersucht, strukturelle Erkenntnisse gewonnen und die Stöchiometrien zwischen A β und den verwendeten PrP-Mutanten bestimmt. Die Stöchiometrien konnten herangezogen werden, um den Einfluss von A β -bindenden D-Peptiden zu charakterisieren. Insbesondere an dieser Stelle könnte zukünftig angesetzt werden, um weitere D-Peptide oder andere Wirkstoffkandidaten zu untersuchen. Denn mit Hilfe der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse ist es möglich das Potential eines Wirkstoffes hinsichtlich dessen Einflusses auf die A β -PrP-Interaktion zu bestimmen.

Durch die Untersuchung weiterer D-Peptide mit derselben AS-Zusammensetzung wie RD2D3-FITC, jedoch anderer Anordnung, könnte möglicherweise ein Rückschluss auf die Sequenzmotive geschlossen werden, die für eine effektive Inhibierung der Bindung von A β -Oligomere an PrP benötigt werden. Hierfür bieten sich die beiden Homodimere D3D3-FITC sowie RD2RD2-FITC an, mit denen sowohl konzentrations- als auch zeitabhängige Versuche durchgeführt werden könnten. So könnte deren Analyse als Grundlage zum rationalen Design weiterer möglicherweise effektiverer D-Peptide dienen.

Ebenfalls wäre es interessant einen Komplex bestehend aus PrP(23-111 Δ 41-94) und A β über FK-NMR zu untersuchen, da dieses PrP-Konstrukt die für NMR-Auswertungen kritischen Octarepeats nicht enthält. So könnte hierüber untersucht werden, ob mit diesem sehr kurzen PrP-Konstrukt die Anordnung des A β innerhalb des Komplexes gleich der Anordnung in Anwesenheit von PrP(23-144) ist und welche AS von A β an dieser Bindung beteiligt sind (bei A β -Markierung). Alternativ könnte untersucht werden, wie sich das PrP(23-111 Δ 41-94) anordnet, um eine Bindung und Verknüpfung von A β -Oligomeren zu ermöglichen (bei PrP-Markierung). Für letzteres müsste das PrP(23-111 Δ 41-94) rekombinant isotopenmarkiert hergestellt werden. Deshalb wurde bereits im Rahmen dieser Arbeit das entsprechende Plasmid mit Hilfe von Shantha Elter erfolgreich kloniert. Erste Reinigungsversuche waren jedoch nicht erfolgreich, sodass an dieser Stelle noch optimiert werden muss.

5 Anhang

5.1 AFM von $A\beta$ -PrP(23-144)-Komplexen

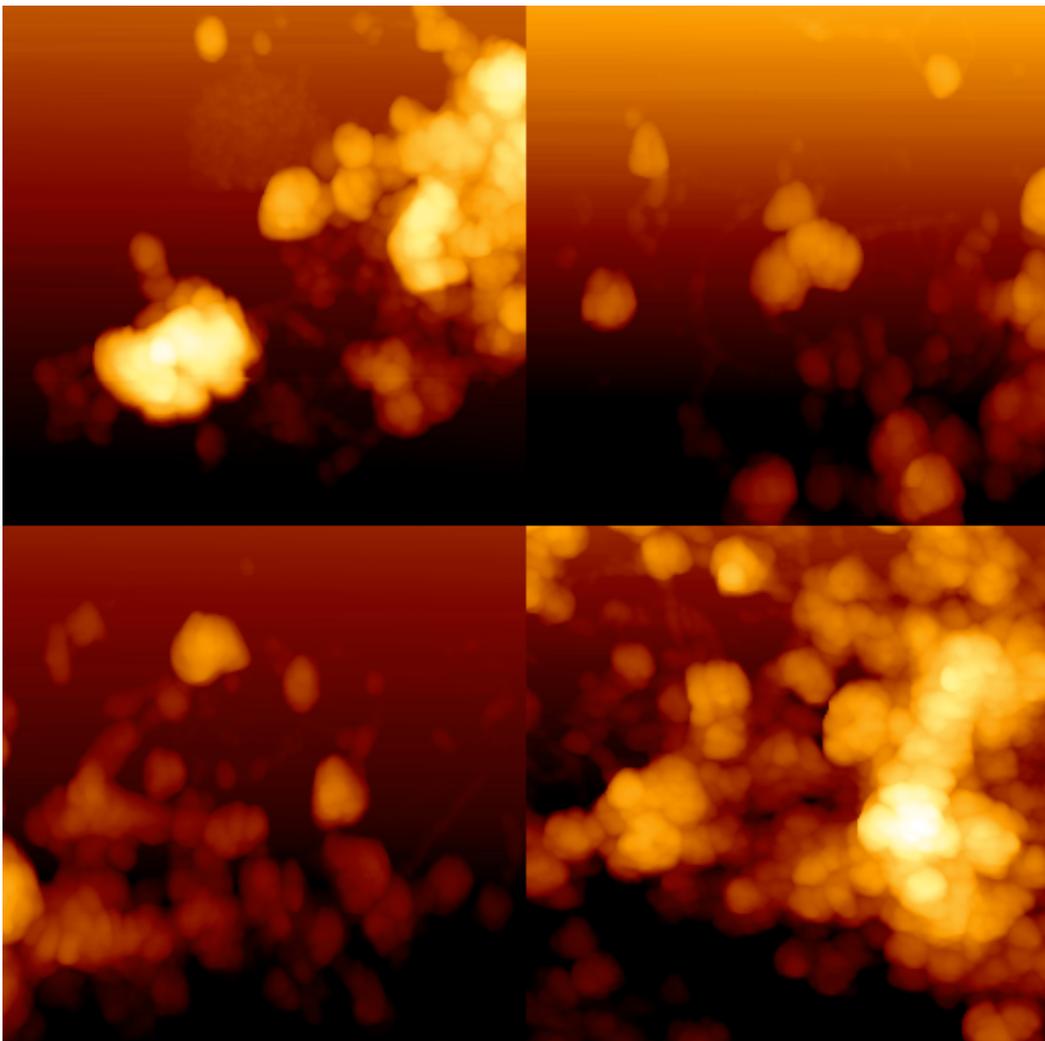


Abbildung 5.1: Vier $1 \times 1 \mu\text{m}$ AFM-Bilder von $A\beta$ -PrP-Komplexen im Verhältnis $80 \mu\text{M } A\beta : 1 \mu\text{M PrP(23-144)}$.

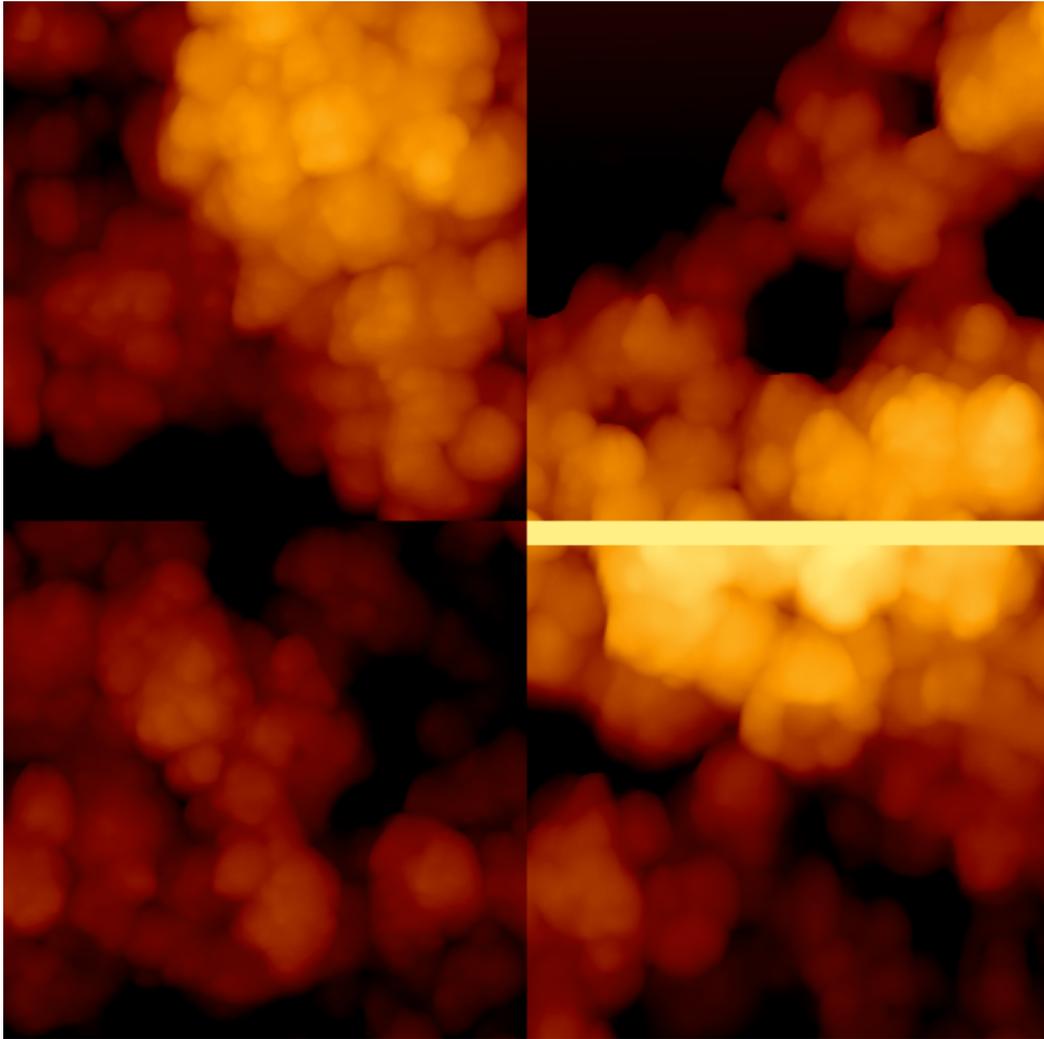


Abbildung 5.2: Vier $1 \times 1 \mu\text{m}$ AFM-Bilder von $\text{A}\beta$ -PrP-Komplexen im Verhältnis $80 \mu\text{M} \text{A}\beta : 2 \mu\text{M} \text{PrP}(23-144)$.

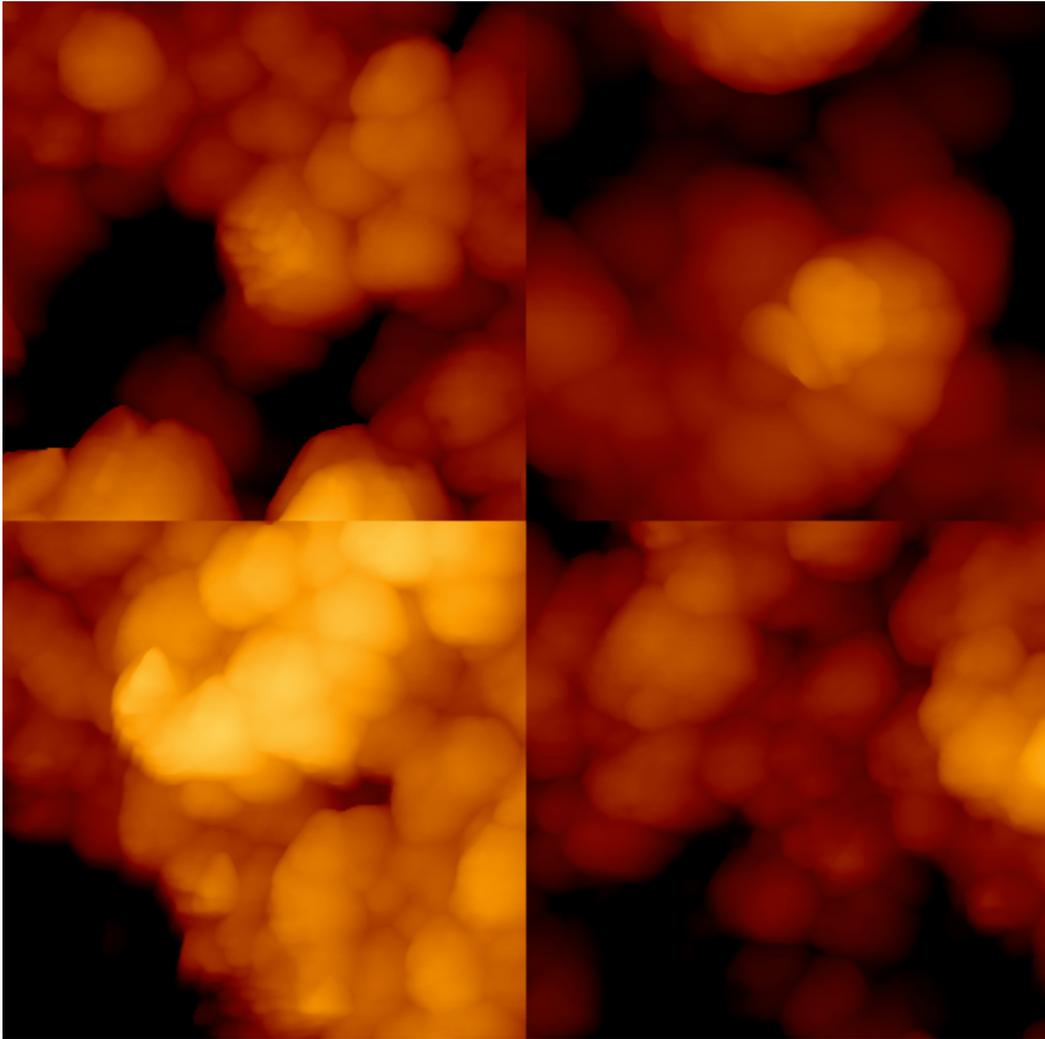


Abbildung 5.3: Vier 1 x 1 μm AFM-Bilder von A β -PrP-Komplexen im Verhältnis 80 μM A β : 5 μM PrP(23-144).

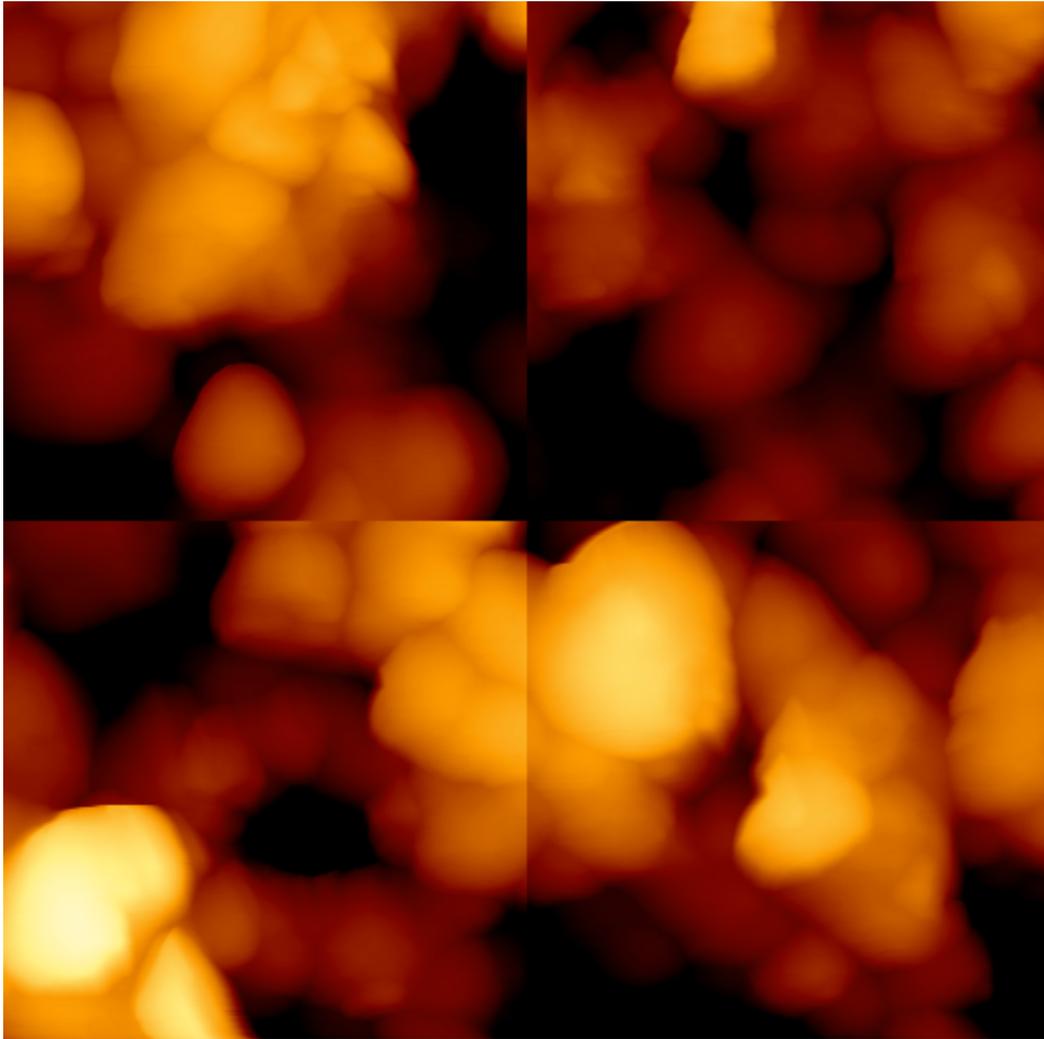


Abbildung 5.4: Vier $1 \times 1 \mu\text{m}$ AFM-Bilder von $\text{A}\beta$ -PrP-Komplexen im Verhältnis $80 \mu\text{M} \text{A}\beta : 40 \mu\text{M} \text{PrP}(23-144)$.

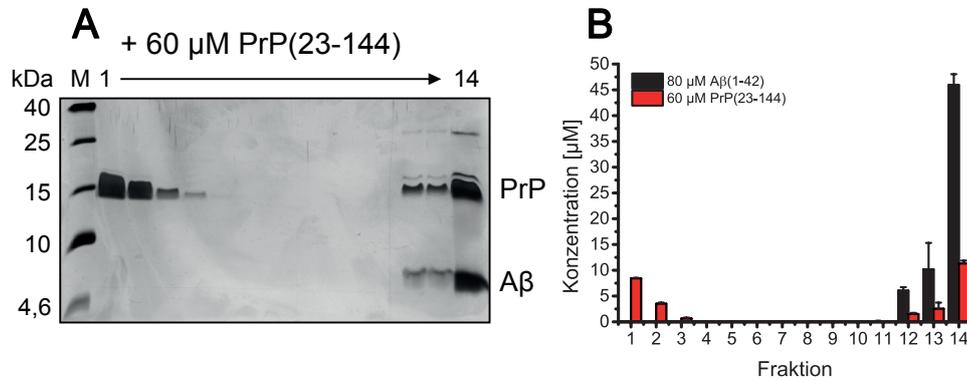
5.2 Verteilung von A β mit 60 μ M PrP(23-144)

Abbildung 5.5: Verteilung von 60 μ M PrP(23-144) mit 80 μ M A β (1-42) nach Saccharose-DGZ. A zeigt das mit Silber gefärbte Tris-Tricin-SDS-Gel und B das korrespondierende Histogramm. PrP(23-144) befindet sich im Überschuss und ist daher auch in den Fraktionen 1 - 4 nachweisbar. A β ist vollständig in A β -PrP-Komplexen gebunden und befindet sich ausschließlich in den Fraktionen 12 - 14.

5.3 HSQC-Spektren von PrP(23-230) und PrP(23-144)

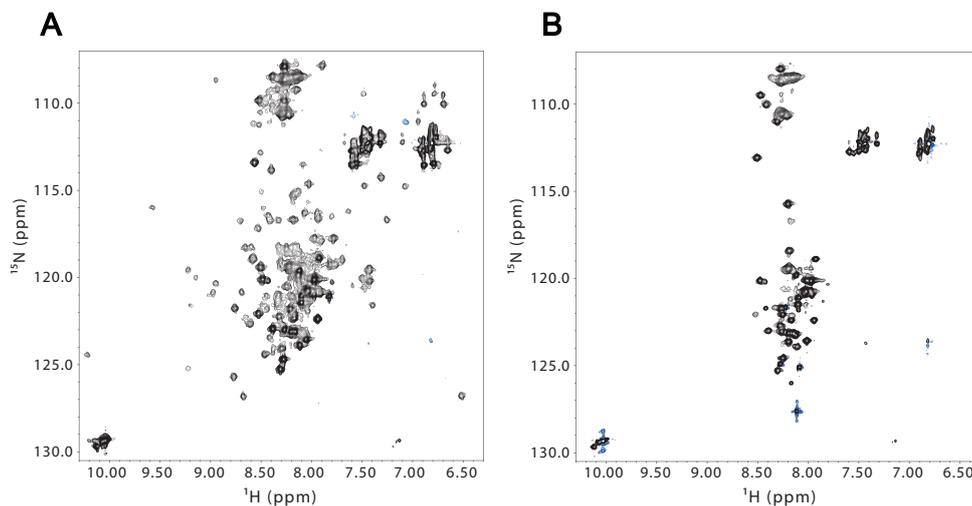


Abbildung 5.6: 1 H- 15 N HSQC-Spektren von PrP(23-230) und PrP(23-144). Spektrum von ca. 120 μ M PrP(23-230) in 30 mM Tris-HCl und 10 % D $_2$ O, pH 7,4 bei 20 $^{\circ}$ C und 800 MHz (A) sowie ein Spektrum von ca. 85 μ M PrP(23-144) in 30 mM Tris-HCl und 10 % D $_2$ O, pH 7,4 bei 20 $^{\circ}$ C und 800 MHz (B).

6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei vielen Menschen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dieter Willbold für die Möglichkeit meine Dissertation am ICS-6 des Forschungszentrums Jülich sowie dem Institut für Physikalische Biologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf anzufertigen. Vielen Dank für dieses spannende Thema, an dem ich bis zuletzt gerne geforscht habe, sowie für die Finanzierung meiner Arbeit. Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Georg Groth für die Übernahme des Koreferats sowie die Betreuung als Mentor. Meinem Betreuer, Dr. Lothar Gremer, möchte ich ganz besonders danken. Lieber Lothar, vielen Dank für die Unterstützung in den letzten Jahren! Ich habe viel von deinen „MacGyver-Fähigkeiten“ gelernt.

Ebenfalls danken möchte ich Prof. Dr. Henrike Heise und Anna König für die wirklich gute Zusammenarbeit über all die Jahre. Auch ein großes Dankeschön an Dr. Philipp Neudecker und Daniel Flender für die Flüssig-NMR-Messungen und -Auswertungen, an das Jülich-Düsseldorf Biomolekulare NMR-Center, sowie an Dr. Maren Thomaier und Dr. Tamar Ziehm für die Hilfe und Durchführung der BLI-Messungen. Ebenfalls vielen Dank an Dr. Wolfgang Hoyer, Dr. Hamed Shaykhalishahi und Dr. Aziz Gauhar für die Bereitstellung des PrP(23-144)-Konstrukts sowie an Reinhild Wurm für die Reinigung der TEV-Protease und an Elke Reinartz für die AFM-Messungen.

Weiterhin danken möchte ich den Menschen, ohne die schon längst das Chaos ausgebrochen wäre, und denen man nicht oft genug für ihre Arbeit und Organisation danken kann: Heidi Gruber, Astrid Wies, Elke Reinartz, Barbara Schulten und Bernd Esters!

Auch ein Dankeschön an meine Studenten: Florian Schmitz, Lisa Galle und Luis Macorano. Ich habe euch gerne betreut und ihr habt gute Arbeit geleistet. Insbesondere dir, Flo, ein großes Dankeschön für die Reinigung des PrP(90-230) sowie für die Suche nach einem geeigneten vial insert. Danke auch an meine Kollegen,

mit denen ich lange Zeit das Büro geteilt habe: Dr. Rajen Brass, Ilka Ostermann, Dr. Aldino Viegas, Dr. Sabine Schriek, Nicola Vettore und Steffen Mielenbrink. Wir hatten immer eine sehr angenehme Atmosphäre; danke dafür!

Dr. Mario Schneider danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung der LaTeX-Vorlage sowie für seine Hilfe mir dieses Programm näher zu bringen. Ebenfalls sei an dieser Stelle allen gedankt, denen ich immer eine Frage zu LaTeX stellen durfte: Prof. Dr. Gerhard Steger, Dr. Michael Würdehoff, Nicola Vettore, Steffen Mielenbrink und Emil Dandanell Agerschou.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei allen Korrekturlesern: Dr. Lothar Gremer, Lisa Galle, Anna König, Elke Reinartz, Raphaela Plonka und meinem Vater Gerhard Rösener.

An dieser Stelle möchte ich mich von ganzem Herzen bei Shantha Elter, Lisa Galle und Elke Reinartz bedanken. Ohne euch und eure intensive Unterstützung, Diskussionen, Ratschläge oder einfach den Kaffee zwischendurch wäre die Zeit bei weitem nicht so schön gewesen. Danke für alles!

Insgesamt möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Physikalische Biologie für eine tolle Zeit und ein angenehmes Arbeitsklima danken. Neben allen oben genannten danke an Dr. Ingrid Span, Dr. Luitgard Nagel-Steger, Dr. Oliver Bannach, Dr. Manuel Etzkorn, Dr. Anna Bronder, Dr. Adeline Bieker, Dr. Oleksandr Brener, Dr. Tommy Agyenim, Dr. Thibault Viennet, Dr. Christina Decker, Dr. Franziska Weirich, Dr. Timo Piechatzek, Dr. Julian Victor, Alessia Peduzzo, Hannah Rosenbach, Tao Zhang, Laetitia Heid, Patrick Meckelburg und Kimberley Lothmann. Ebenfalls auch ein großes Dankeschön an meine Kollegen aus dem ICS-6 des Forschungszentrums Jülich und deren stetige Hilfsbereitschaft!

Vielen Dank auch an alle Mitarbeiter des iGRAD für die interessanten Kurse, insbesondere ein Danke an Gudrun Jähn.

Den „Aggregates“, namentlich Dr. Oliver Bannach, Dr. Manuel Etzkorn, Dr. Mario Schneider und Dr. Michael Würdehoff, danke ich für viele tolle Konzerte.

Ich danke meiner Familie für die Unterstützung sowie die Geduld und das Verständnis für meinen chronischen Zeitmangel. Ein ganz besonderes Dankeschön möchte ich an meine Freunde richten, die mir ebenfalls sehr viel Verständnis und Kraft entgegengebracht haben. Danke, dass ihr seit so vielen Jahren an meiner Seite seid!

Meinem Freund Theo danke ich für seine große Unterstützung. Theo, du hast mir von Anfang an viel Kraft gegeben und bei vielen Problemen geholfen; hast immer ein offenes Ohr für mich und bist für mich da. Ευχαριστώ!

7 Abkürzungsverzeichnis

Aβ	Amyloid- β
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
AFM	Rasterkraftmikroskopie (<i>Atomic Force Microscopy</i>)
Amp	Ampicillin
APLP1	<i>Amyloid-β precursor-like protein 1</i>
APP	Amyloid-Precursor-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BACE1	<i>β-site APP cleaving enzyme 1</i>
BCS	<i>bathocuproine sulfonate</i>
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
bzw.	beziehungsweise
Cam	Chloramphenicol
CD	Circulardichroismus
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
CSB	Chicago Sky Blue 6B
DARR	<i>Dipolar Assisted Rotational Resonance</i>
ddH₂O	hochreines Wasser aus einer Milli-Q-Anlage
DGZ	Dichtegradientenzentrifugation
DSS	2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonat
DTT	Dithiothreitol
D₂O	Deuteriumoxid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FID	<i>free induction decay</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

FK-NMR	Festkörper-NMR-Spektroskopie
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HFIP	Hexafluoroisopropanol
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitäts-Chromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	Lysogeny Broth
MAS	<i>magic angle spinning</i>
mGluR5	metabotroper Glutamatrezeptor 5
MTEP	3-((2-Methyl-4-thiazolyl)ethynyl)pyridin
NaPi	Natriumphosphat
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
o.g.	oben genannt
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PDS	<i>Proton-Driven Spin Diffusion</i>
PICUP	<i>Photo-Induced Crosslinking of Unmodified Proteins</i>
PrP	Prion-Protein
PSD	postsynaptische Dichte
QIAD	<i>quantitative determination of interference with Aβ aggregate size distribution</i>
RP-HPLC	<i>reversed-phase high-performance liquid chromatography</i>
RU	<i>resonance units</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEC	Größenausschluss-Chromatographie
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
TB	Terrific Broth
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>

TFA	Trifluoressigsäure
TGS	Tris-Glycin-SDS
TMEM30B	Transmembranprotein 30B
Tricin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
z.B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

2.1	In dieser Arbeit verwendete synthetische Peptide	28
2.2	Saccharoselösungen für die DGZ	34
2.3	Acetonitrilgradient zur Reinigung von PrP(23-144) und PrP(23-230) mittels RP-HPLC	46
2.4	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Tris-Glycin-SDS-PAGE	49
2.5	Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die Tris-Tricin-SDS-PAGE	49
2.6	Durchführung einer Silberfärbung von SDS-PAGE-Gelen	51
2.7	Zusammensetzung des Saccharosegradienten für die DGZ	53
2.8	Acetonitrilgradient zur Trennung von A β , PrPs und D-Peptiden aus Dichtegradientenfractionen mittels RP-HPLC	54
2.9	Zusammensetzung des Iodixanolgradienten für die DGZ	55
3.1	Mittelwerte und Standardabweichungen der Stöchiometrien von A β zu PrP aller untersuchten PrP-Konstrukte innerhalb der A β -PrP-Komplexe aus den Dichtegradientenfractionen 11 - 14	92
3.2	Anzahl der in der Sequenz vorhandenen Aminosäuren und Anzahl der gefundenen Resonanzen	103
3.3	Mittelwerte und Standardabweichungen der A β /PrP(23-144)-Stöchiometrien innerhalb der A β -PrP-Komplexe aus den Dichtegradientenfractionen 11 - 14 bei verschiedenen RD2-FITC- und PrP(23-144)-Konzentrationen	117
3.4	Mittelwerte und Standardabweichungen der A β /PrP(23-144)-Stöchiometrien innerhalb der A β -PrP-Komplexe aus den Dichtegradientenfractionen 11 - 14 bei verschiedenen RD2D3-FITC-Konzentrationen und verschiedenen Zugabereihenfolgen	124

Abbildungsverzeichnis

1.1	Prozessierung des APP.	4
1.2	Schema verschiedener A β -Spezies und Umwandlungsarten.	5
1.3	Struktur des Prion-Proteins.	8
1.4	Prozessierung des Prion-Proteins.	10
1.5	A β -Bindestellen auf dem Prion-Protein.	12
1.6	Signalweiterleitung über mGluR5 und Fyn-Kinase.	16
1.7	NMDA-Rezeptor-Regulation durch Kupfer und PrP.	18
1.8	Mögliche Therapieansatzpunkte gegen Alzheimer.	21
1.9	Strukturen der D-enantiomeren Peptide D3 und RD2.	23
2.1	Aminosäuresequenz von humanem PrP(23-230).	29
2.2	Aminosäuresequenz von humanem PrP(23-144).	30
2.3	Aminosäuresequenz von humanem PrP(90-230).	30
3.1	Chromatogramm eines SEC-Laufes zur Reinigung von PrP(23-230) und korrespondierende SDS-PAGE.	63
3.2	Chromatogramm eines RP-HPLC-Laufes zur Reinigung von PrP(23-230) und korrespondierende SDS-PAGE.	64
3.3	Chromatogramm eines IMAC-Laufes zur Reinigung von PrP(23-144).	66
3.4	SDS-PAGE zur Analyse der IMAC-Elutionsfraktionen und Überprüfung des TEV-Schnitts.	67
3.5	Chromatogramm eines RP-HPLC-Laufes zur Reinigung von PrP(23-144) und korrespondierende SDS-PAGE.	68
3.6	SDS-PAGE und RP-HPLC Chromatogramme von gereinigtem PrP(23-144), PrP(90-230) und PrP(23-230).	69
3.7	A β -Verteilung in einem Iodixanolgradienten bei Verwendung verschiedener Puffersysteme.	71
3.8	Vergleich der RP-HPLC-Chromatogramme einer Fraktion nach Iodixanol-DGZ und Saccharose-DGZ.	72

3.9	Verteilung von Standardproteinen in einem Saccharosedichtegradienten.	73
3.10	Schema der in dieser Arbeit verwendeten PrP-Konstrukte.	74
3.11	CD-Spektren von PrP(23-230), PrP(23-144) und PrP(90-230).	75
3.12	^1H - ^{15}N HSQC-Spektren von PrP(23-230).	76
3.13	^1H - ^{15}N HSQC-Spektren von PrP(23-144) bei unterschiedlichen pH-Werten.	77
3.14	^1H - ^{15}N HSQC-Spektren von PrP(23-144) bei verschiedenen Temperaturen.	78
3.15	Schematische Darstellung des angepassten QIAD Assays.	79
3.16	Verteilung von inkubiertem $\text{A}\beta$ im Saccharosedichtegradienten.	80
3.17	Verteilung aller PrP-Konstrukte im Saccharosedichtegradienten.	82
3.18	Verteilung von PrP(23-230) mit $\text{A}\beta(1-42)$ im Saccharosedichtegradienten.	84
3.19	Verteilung von PrP(23-144) mit $\text{A}\beta(1-42)$ im Saccharosedichtegradienten.	87
3.20	Verteilung von PrP(90-230) mit $\text{A}\beta(1-42)$ im Saccharosedichtegradienten.	89
3.21	Verteilung von PrP(23-111 Δ 41-94) mit $\text{A}\beta(1-42)$ im Saccharosedichtegradienten.	91
3.22	Stöchiometrien der $\text{A}\beta$ -PrP-Komplexe aller untersuchten PrP-Konstrukte bei verschiedenen Konzentrationen.	93
3.23	$\text{A}\beta$ - bzw. PrP-Menge in den $\text{A}\beta$ -PrP-Komplexen in Relation zur Gesamtproteinmenge.	95
3.24	Analyse der Ausgangsmaterialien mittels AFM.	96
3.25	4 x 4 μm AFM-Bilder von $\text{A}\beta$ -PrP-Komplexen.	97
3.26	1 x 1 μm AFM-Bilder von $\text{A}\beta$ -Oligomeren und $\text{A}\beta$ -PrP-Komplexen.	98
3.27	PDSD-Spektren von $\text{A}\beta$ -PrP-Komplexen mit ^{13}C - ^{15}N markiertem PrP(23-144) oder PrP(23-230).	100
3.28	PDSD-Spektrum von $\text{A}\beta$ -PrP-Komplexen mit ^{13}C - ^{15}N markiertem $\text{A}\beta(1-42)$ und nicht-markiertem PrP(23-144).	102
3.29	Verteilung der FK-NMR-Probe im Saccharosedichtegradienten.	104
3.30	Verschiedene $\text{A}\beta$ -Konformere innerhalb der $\text{A}\beta$ -PrP-Komplexe und deren Verknüpfungen.	105
3.31	Sekundäre chemische Verschiebungen der $\text{A}\beta$ -Konformere innerhalb der $\text{A}\beta$ -PrP-Komplexe berechnet aus der Differenz der CA- und CB-Verschiebungen abzüglich der <i>random coil</i> Werte.	106

3.32	PDSD-Spektren von A β -PrP(23-144)-Komplexen mit ^{13}C - ^{15}N markiertem A β (1-42) und nicht-markiertem PrP(23-144).	107
3.33	Verteilung von PrP(23-144) mit A β (1-42) in Anwesenheit von Chicago Sky Blue 6B (CSB) im Saccharosedichtegradienten.	109
3.34	Verteilung von 40 μM RD2-FITC allein oder 40 μM RD2-FITC mit 10 μM PrP(23-144) im Saccharosedichtegradienten.	112
3.35	Verteilung von A β , PrP(23-144) und RD2-FITC im Saccharosedichtegradienten bei verschiedenen PrP(23-144)-Konzentrationen.	114
3.36	Verteilung von A β , PrP(23-144) und RD2-FITC im Saccharosedichtegradienten bei einer RD2-FITC-Konzentration von 500 μM	116
3.37	Verteilung von 40 μM RD2D3-FITC allein und 20 μM RD2D3-FITC mit 10 μM PrP(23-144) im Saccharosedichtegradienten.	118
3.38	Verteilung von 80 μM A β , 40 μM PrP(23-144) und 20 μM RD2D3-FITC im Saccharosedichtegradienten bei unterschiedlicher Reihenfolge der RD2D3-FITC-Zugabe.	120
3.39	Verteilung von 80 μM A β , 40 μM PrP(23-144) und 40 μM RD2D3-FITC im Saccharosedichtegradienten bei unterschiedlicher Reihenfolge der RD2D3-FITC-Zugabe.	122
3.40	A β /PrP-Stöchiometrien innerhalb der A β -PrP-Komplexe in Anwesenheit von 20 μM oder 40 μM RD2D3-FITC und verschiedenen Zugabe-Reihenfolgen von RD2D3-FITC.	125
4.1	A β -Verteilung nach Hinzufügen von 10 μM der verschiedenen PrP-Varianten.	135
4.2	Aminosäuresequenzen von PrP, RD2 und RD2D3.	147
4.3	Modell der A β -PrP-Komplexe.	150
5.1	Vier 1 x 1 μm AFM-Bilder von A β -PrP-Komplexen im Verhältnis 80 μM A β : 1 μM PrP(23-144).	153
5.2	Vier 1 x 1 μm AFM-Bilder von A β -PrP-Komplexen im Verhältnis 80 μM A β : 2 μM PrP(23-144).	154
5.3	Vier 1 x 1 μm AFM-Bilder von A β -PrP-Komplexen im Verhältnis 80 μM A β : 5 μM PrP(23-144).	155
5.4	Vier 1 x 1 μm AFM-Bilder von A β -PrP-Komplexen im Verhältnis 80 μM A β : 40 μM PrP(23-144).	156
5.5	Verteilung von 60 μM PrP(23-144) mit 80 μM A β (1-42) im Saccharosedichtegradienten	157
5.6	^1H - ^{15}N HSQC-Spektren von PrP(23-230) und PrP(23-144).	157

Literaturverzeichnis

- [1] Martin Prince, Adelina Comas-Herrera, Martin Knapp, Maëlen Guerchet, and Maria Karagiannidou. World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia. Coverage, Quality and costs now and in the future. pages 1–140, 2016.
- [2] Horst Bickel. Die Häufigkeit von Demenzerkrankungen. Informationsblatt 1. Technical report, 2016.
- [3] Alois Alzheimer. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*, 64:146–8, 1907.
- [4] George G. Glenner and Caine W. Wong. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 120(3):885–890, 1984.
- [5] Colin L Masters, Gail Simms, Nicola A Weinman, G Multhaup, B L McDonald, and K Beyreuther. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(12):4245–9, 1985.
- [6] Frank M. LaFerla, Kim N. Green, and Salvatore Oddo. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(7):499–509, 2007.
- [7] Inge Grundke-Iqbal, Khalid Iqbal, Y. C. Tung, Maureen Quinlan, Henryk M Wisniewski, and L. I. Binder. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (τ) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(13):4913–4917, 1986.
- [8] Yasuo Ihara, Nobuyuki Nukina, Reiko Miura, and Midori Ogawara. Phosphorylated Tau Protein Is Integrated into Paired Helical Filaments in Alzheimer's Disease. *Journal of Biochemistry*, 99:1807–1810, 1986.
- [9] Kenneth S Kosik, Catharine L Joachim, and Dennis J Selkoe. Microtubule-associated protein tau (τ) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83:4044–4048, 1986.
- [10] Tony Wyss-Coray. Inflammation in Alzheimer disease: driving force, bystander or beneficial response? *Nature Medicine*, 12:1005–1015, 2006.
- [11] William R Markesbery. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(1):134–147, 1997.

- [12] R. A. Sperling, C. R. Jack, and P. S. Aisen. Testing the Right Target and Right Drug at the Right Stage. *Science Translational Medicine*, 3(111):1–5, 2011.
- [13] John Hardy. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends in Neurosciences*, 20(4):154–159, 1997.
- [14] Christian Haass and Dennis J Selkoe. Cellular processing of β -amyloid precursor protein and the genesis of amyloid β -peptide, 1993.
- [15] Tobias M J Allinson, Edward T Parkin, Anthony J Turner, and Nigel M Hooper. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *Journal of neuroscience research*, 74(May):342–352, 2003.
- [16] Peer-Hendrik Kuhn, Huanhuan Wang, Bastian Dislich, Alessio Colombo, Ulrike Zeitschel, Joachim W Ellwart, Elisabeth Kremmer, Steffen Rossner, and Stefan F Lichtenthaler. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *The EMBO journal*, 29(17):3020–32, 2010.
- [17] Kristina Endres and Thomas Deller. Regulation of Alpha-Secretase ADAM10 In vitro and In vivo: Genetic, Epigenetic, and Protein-Based Mechanisms. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10, 2017.
- [18] Frank M. LaFerla. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(11):862–872, nov 2002.
- [19] Robert Vassar, Brian D Bennett, Safura Babu-Khan, Steve Kahn, Elizabeth A Mendiaz, Paul Denis, David B Teplow, Sandra Ross, Patricia Amarante, Richard Loeloff, Yi Luo, Seth Fisher, Janis Fuller, Steven Edenson, Jackson Lile, Mark A Jarosinski, Anja Leona Biere, Eileen Curran, Teresa Burgess, Jean-Claude Louis, Frank Collins, James Treanor, Gary Rogers, and Martin Citron. β -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE. *Science*, 286(5440):735 LP – 741, 1999.
- [20] Dennis J. Selkoe. Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature Cell Biology*, 6(11):1054–1061, 2004.
- [21] Iryna Benilova, Eric Karran, and Bart De Strooper. The toxic A β oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nature Neuroscience*, 15(3):349–357, 2012.
- [22] Dennis J Selkoe. Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological Reviews*, 81(2):741–766, 2001.
- [23] Dennis J Selkoe and John Hardy. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6):595–608, 2016.
- [24] John A Hardy and Gerald A Higgins. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science*, 256(6):3–5, 1992.

- [25] Dominic M Walsh, Igor Klyubin, Julia V Fadeeva, William K Cullen, Roger Anwyl, Michael S Wolfe, Michael J Rowan, and Dennis J Selkoe. Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature*, 416(6880):535–539, 2002.
- [26] D M Walsh, I. Klyubin, J V Fadeeva, M J Rowan, and D J Selkoe. Amyloid- β oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition. *Biochemical Society Transactions*, 30(4):552–557, 2002.
- [27] Lothar Gremer, Daniel Schölzel, Carla Schenk, Elke Reinartz, Jörg Labahn, Raimond B G Raveli, Markus Tusche, Carmen Lopez-Iglesias, Wolfgang Hoyer, Henrike Heise, Dieter Willbold, and Gunnar F Schröder. Fibril structure of amyloid- β (1–42) by cryo-electron microscopy. *Science*, 358(6359):116–119, 2017.
- [28] Joseph M Castellano, Jungsu Kim, Floy R Stewart, Hong Jiang, R. B. DeMattos, Bruce W Patterson, Anne M Fagan, John C Morris, Kwasi G Mawuenyega, Carlos Cruchaga, Alison M Goate, Kelly R Bales, Steven M Paul, Randall J Bateman, and David M Holtzman. Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- β Peptide Clearance. *Science Translational Medicine*, 3(89):89ra57–89ra57, 2011.
- [29] Heledd H. Jarosz-Griffiths, Elizabeth Noble, Jo V. Rushworth, and Nigel M. Hooper. Amyloid- β receptors: The good, the bad, and the prion protein. *Journal of Biological Chemistry*, 291(7):3174–3183, 2016.
- [30] David A Harris. Cellular biology of prion diseases. *Clinical microbiology reviews*, 12(3):429–444, 1999.
- [31] David R Taylor and Nigel M Hooper. The prion protein and lipid rafts (Review). *Molecular Membrane Biology*, 23(1):89–99, 2006.
- [32] Hermann C Altmeyen, Berta Puig, Frank Dohler, Dana K Thurm, Clemens Falker, Susanne Krasemann, and Markus Glatzel. Proteolytic processing of the prion protein in health and disease. *American journal of neurodegenerative disease*, 1(1):15–31, 2012.
- [33] Marie-Angela Wulf, Assunta Senatore, and Adriano Aguzzi. The biological function of the cellular prion protein: an update. *BMC Biology*, 15(1), 2017.
- [34] Takashi Onodera. Dual role of cellular prion protein in normal host and Alzheimer’s disease. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 93(4):155–173, 2017.
- [35] Rafael Linden. The Biological Function of the Prion Protein: A Cell Surface Scaffold of Signaling Modules. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(77):1–19, 2017.
- [36] S. Prusiner. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542):136–144, 1982.
- [37] G C Telling. Prion protein genes and prion diseases: studies in transgenic mice. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 26(3):209–220, 2000.

- [38] Stanley B Prusiner. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23):13363–13383, 1998.
- [39] A. Aguzzi and A. M. Calella. Prions: Protein Aggregation and Infectious Diseases. *Physiological Reviews*, 89(4):1105–1152, 2009.
- [40] R Zahn, A Liu, T Lührs, R Riek, C von Schroetter, F López García, M Billeter, L Calzolari, G Wider, and K Wüthrich. NMR solution structure of the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(1):145–50, 2000.
- [41] J. Stöckel, Jiri Safar, A.C. Wallace, F.E. Cohen, and S.B. Prusiner. Prion Protein Selectively Binds Copper (II) Ions. *Biochemistry*, 37(20):7185–7193, 1998.
- [42] Lisa Marie Galle. Selektion von Prion-Protein-bindenden Peptiden mittels Phagendisplay. *Masterarbeit*, (September), 2015.
- [43] Christian Dumpitak. Untersuchungen zu Struktur und Funktion von Polysacchariden und alterungsassozierten Proteinmodifikationen bei Prionen. *Doktorarbeit*, 2003.
- [44] Shu G. Chen, David B. Teplow, Piero Parchi, Jan K. Teller, Pierluigi Gambetti, and Lucila Autilio-Gambetti. Truncated Forms of the Human Prion Protein in Normal Brain and in Prion Diseases, 1995.
- [45] Saioa R. Elezgarai and Emiliano Biasini. Common therapeutic strategies for prion and Alzheimer's diseases. *Biological Chemistry*, 397(11):1115–1124, 2016.
- [46] Laura Westergard, Jessie A Turnbaugh, and David A Harris. A naturally occurring C-terminal fragment of the prion protein (PrP) delays disease and acts as a dominant-negative inhibitor of PrPSc formation. *Journal of Biological Chemistry*, 286(51):44234–44242, 2011.
- [47] Marie Victoire Guillot-Sestier, Claire Sunyach, Charlotte Druon, Sabine Scarzello, and Frédéric Checler. The α -secretase-derived N-terminal product of cellular prion, N1, displays neuroprotective function in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 284(51):35973–35986, 2009.
- [48] Nicole T Watt, David R. Taylor, Andrew Gillott, Daniel A. Thomas, W. Sumudhu S. Perera, and Nigel M. Hooper. Reactive Oxygen Species-mediated β -Cleavage of the Prion Protein in the Cellular Response to Oxidative Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 280(43):35914–35921, 2005.
- [49] Hilary E M McMahon, Alain Mangé, Noriyuki Nishida, Christophe Créminon, Danielle Casanova, and Sylvain Lehmann. Cleavage of the amino terminus of the prion protein by reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, 276(3):2286–2291, 2001.
- [50] Hermann C Altmeppen, Johannes Prox, Susanne Krasemann, Berta Puig, Katharina Kruszewski, Frank Dohler, Christian Bernreuther, Ana Hoxha, Luise Linsenmeier, Beata Sikorska, Pawel P Liberski, Udo Bartsch, Paul Saftig, and Markus Glatze. The sheddase ADAM10 is a potent modulator of prion disease. *eLife*, 2015(4):1–50, 2015.

- [51] B. Kundu, N. R. Maiti, E. M. Jones, K. A. Surewicz, D. L. Vanik, and W. K. Surewicz. Nucleation-dependent conformational conversion of the Y145Stop variant of human prion protein: Structural clues for prion propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21):12069–12074, 2003.
- [52] J. J. Helmus, K. Surewicz, P. S. Nadaud, W. K. Surewicz, and C. P. Jaronec. Molecular conformation and dynamics of the Y145Stop variant of human prion protein in amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(17):6284–6289, 2008.
- [53] J J Helmus, K Surewicz, W K Surewicz, and C P Jaronec. Conformational Flexibility of Y145Stop Human Prion Protein Amyloid Fibrils Probed by Solid-State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 132(7):2393–2403, 2010.
- [54] Eric M. Jones, Bo Wu, Krystyna Surewicz, Philippe S. Nadaud, Jonathan J. Helmus, Shugui Chen, Christopher P. Jaronec, and Witold K. Surewicz. Structural polymorphism in amyloids: New insights from studies with Y145Stop prion protein fibrils. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49):42777–42784, 2011.
- [55] Jin-Kyu Choi, Ignazio Cali, Krystyna Surewicz, Qingzhong Kong, Pierluigi Gambetti, and Witold K Surewicz. Amyloid fibrils from the N-terminal prion protein fragment are infectious. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(48):13851–13856, nov 2016.
- [56] Theint Theint, Philippe S. Nadaud, Krystyna Surewicz, Witold K. Surewicz, and Christopher P. Jaronec. ¹³C and ¹⁵N chemical shift assignments of mammalian Y145Stop prion protein amyloid fibrils. *Biomolecular NMR Assignments*, 11(1):75–80, 2017.
- [57] Juha Laurén, David A. Gimbel, Haakon B. Nygaard, John W. Gilbert, and Stephen M. Strittmatter. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid- β oligomers. *Nature*, 457(7233):1128–1132, 2009.
- [58] Haakon B. Nygaard and Stephen M. Strittmatter. Cellular Prion Protein Mediates the Toxicity of β -Amyloid Oligomers. *Archives of Neurology*, 66(11):1325–1328, nov 2009.
- [59] Shugui Chen, Satya P. Yadav, and Witold K. Surewicz. Interaction between human prion protein and amyloid- β ($A\beta$) oligomers: Role of N-terminal residues. *Journal of Biological Chemistry*, 285(34):26377–26383, 2010.
- [60] Brian R. Fluharty, Emiliano Biasini, Matteo Stravalaci, Alessandra Sclip, Luisa Diomede, Claudia Balducci, Pietro La Vitola, Massimo Messa, Laura Colombo, Gianluigi Forloni, Tiziana Borsello, Marco Gobbi, and David A. Harris. An N-terminal fragment of the prion protein binds to amyloid- β oligomers and inhibits their neurotoxicity in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 288(11):7857–7866, 2013.
- [61] Nadine D. Younan, Claire J. Sarell, Paul Davies, David R. Brown, and John H. Viles. The cellular prion protein traps Alzheimer's $A\beta$ in an oligomeric form and disassembles amyloid fibers. *FASEB Journal*, 27(5):1847–1858, 2013.

- [62] Mino Kang, Su Yeon Kim, Seong Soo A An, and Young Ran Ju. Characterizing affinity epitopes between prion protein and β -amyloid using an epitope mapping immunoassay. *Experimental & Molecular Medicine*, 45(8):e34, 2013.
- [63] Bruno Vincent, Erwan Paitel, Paul Saftig, Yveline Frobert, Dieter Hartmann, Bart De Strooper, Jacques Grassi, Elvira Lopez-Perez, and Frédéric Checler. The Disintegrins ADAM 10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol-esters-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *Journal of Biological Chemistry*, 246(41):37743–37746, oct 2001.
- [64] Edward T Parkin, Nicole T Watt, Ishrut Hussain, Elizabeth A Eckman, Christopher B Eckman, Jean C Manson, Herbert N Baybutt, Anthony J Turner, and Nigel M Hooper. Cellular prion protein regulates beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(26):11062–7, 2007.
- [65] Krzysztof Nieznanski, Krystyna Surewicz, Shugui Chen, Hanna Nieznanska, and Witold K Surewicz. Interaction between prion protein and A β amyloid fibrils revisited. *ACS Chem Neurosci*, 5(5):340–345, 2014.
- [66] Krzysztof Nieznanski, Jin Kyu Choi, Shugui Chen, Krystyna Surewicz, and Witold K. Surewicz. Soluble prion protein inhibits amyloid- β (A β) fibrillization and toxicity. *Journal of Biological Chemistry*, 287(40):33104–33108, 2012.
- [67] Kristina A. Ganzinger, Priyanka Narayan, Seema S. Qamar, Laura Weimann, Rohan T. Ranasinghe, Adriano Aguzzi, Christopher M. Dobson, James McColl, Peter St. George-Hyslop, and David Klenerman. Single-molecule imaging reveals that small amyloid- β 1-42 oligomers interact with the cellular prion protein (PrPC). *ChemBioChem*, 15(17):2515–2521, 2014.
- [68] Thomas L. Williams, Jin Kyu Choi, Krystyna Surewicz, and Witold K. Surewicz. Soluble Prion Protein Binds Isolated Low Molecular Weight Amyloid- β Oligomers Causing Cytotoxicity Inhibition. *ACS Chemical Neuroscience*, 6(12):1972–1980, 2015.
- [69] Frank Dohler, Diego Sepulveda-Falla, Susanne Krasemann, Hermann Altmepfen, Hartmut Schlüter, Diana Hildebrand, Inga Zerr, Jakob Matschke, and Markus Glatzel. High molecular mass assemblies of amyloid- β oligomers bind prion protein in patients with Alzheimer's disease. *Brain*, 137(3):873–886, 2014.
- [70] Mikhail A Kostylev, Adam C Kaufman, Haakon B Nygaard, Pujan Patel, Laura T Haas, Erik C Gunther, Alexander Vortmeyer, and Stephen M Strittmatter. Prion-Protein-interacting Amyloid- β Oligomers of High Molecular Weight Are Tightly Correlated with Memory Impairment in Multiple Alzheimer Mouse Models. *The Journal of biological chemistry*, 290(28):17415–38, jul 2015.
- [71] Andrew J. Nicoll, Silvia Panico, Darragh B. Freir, Daniel Wright, Cassandra Terry, Emmanuel Risse, Caroline E. Herron, Tiernan O'Malley, Jonathan D. F. Wadsworth, Mark A. Farrow, Dominic M. Walsh, Helen R. Saibil, and John Collinge. Amyloid- β nanotubes are associated with prion protein-dependent synaptotoxicity. *Nature Communications*, 4, 2013.

- [72] C. Balducci, M. Beeg, M. Stravalaci, A. Bastone, A. Scip, E. Biasini, L. Tapella, L. Colombo, C. Manzoni, T. Borsello, R. Chiesa, M. Gobbi, M. Salmona, and G. Forloni. Synthetic amyloid- β oligomers impair long-term memory independently of cellular prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(5):2295–2300, 2010.
- [73] Anna Maria Calella, Mélissa Farinelli, Mario Nuvolone, Osvaldo Mirante, Rita Moos, Jeppe Falsig, Isabelle M Mansuy, and Adriano Aguzzi. Prion protein and A β -related synaptic toxicity impairment. *EMBO Molecular Medicine*, 2(8):306–314, 2010.
- [74] Moustapha Cissé, Pascal E Sanchez, Daniel H Kim, Kaitlyn Ho, Gui-Qiu Yu, and Lennart Mucke. Ablation of Cellular Prion Protein Does Not Ameliorate Abnormal Neural Network Activity or Cognitive Dysfunction in the J20 Line of Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*, 31(29):10427–10431, 2011.
- [75] Helmut W Kessels, Louis N Nguyen, Sadegh Nabavi, and Roberto Malinow. The prion protein as a receptor for amyloid- β . *Nature*, 466(7308):E3–E4, 2010.
- [76] D. A Gimbel, Haakon B Nygaard, Erin E Coffey, Erik C Gunther, J. Lauren, Zachary A Gimbel, and Stephen M Strittmatter. Memory Impairment in Transgenic Alzheimer Mice Requires Cellular Prion Protein. *Journal of Neuroscience*, 30(18):6367–6374, 2010.
- [77] Wataru Kudo, Hyun-Pil Hyoung-gon Lee, Wen-Quan Zou, Xinglong Wang, George Perry, Xiongwei Zhu, Mark A Smith, Robert B Petersen, and Hyun-Pil Hyoung-gon Lee. Cellular prion protein is essential for oligomeric amyloid- β -induced neuronal cell death. *Human molecular genetics*, 21(5):1138–44, 2012.
- [78] Ji Won Um, Haakon B Nygaard, Jacqueline K Heiss, Mikhail A Kostylev, Massimiliano Stagi, Alexander Vortmeyer, Thomas Wisniewski, Erik C Gunther, and Stephen M Strittmatter. Alzheimer amyloid- β oligomer bound to postsynaptic prion protein activates Fyn to impair neurons. *Nature Neuroscience*, 15(9):1227–1235, 2012.
- [79] Darragh B. Freir, Andrew J. Nicoll, Igor Klyubin, Silvia Panico, Jessica M. Mc Donald, Emmanuel Risse, Emmanuel A. Asante, Mark A. Farrow, Richard B. Sessions, Helen R. Saibil, Anthony R. Clarke, Michael J. Rowan, Dominic M. Walsh, and John Collinge. Interaction between prion protein and toxic amyloid β assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. *Nature Communications*, 2(May):336, 2011.
- [80] Andrew E Barry, Igor Klyubin, Jessica M Mc Donald, Alexandra J Mably, Michael A Farrell, Michael Scott, Dominic M Walsh, and Michael J Rowan. Alzheimer’s Disease Brain-Derived Amyloid- β -Mediated Inhibition of LTP In Vivo Is Prevented by Immunotargeting Cellular Prion Protein. *Journal of Neuroscience*, 31(20):7259–7263, 2011.
- [81] Clive Bate and Alun Williams. Amyloid- β -induced synapse damage is mediated via cross-linkage of cellular prion proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 286(44):37955–37963, 2011.

- [82] H. You, S. Tsutsui, S. Hameed, T. J. Kannanayakal, L. Chen, P. Xia, J. D. T. Engbers, S. A. Lipton, P. K. Stys, and G. W. Zamponi. $A\beta$ neurotoxicity depends on interactions between copper ions, prion protein, and N-methyl-D-aspartate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5):1737–1742, 2012.
- [83] Christian Peters, María Paz Espinoza, Scarlet Gallegos, Carlos Opazo, and Luis G. Aguayo. Alzheimer's $A\beta$ interacts with cellular prion protein inducing neuronal membrane damage and synaptotoxicity. *Neurobiology of Aging*, 36(3):1369–1377, 2015.
- [84] Tatsuo Suzuki and Kuniko Okumura-Noji. NMDA receptor subunits epsilon 1 (NR2A) and epsilon 2 (NR2B) are substrates for Fyn in the postsynaptic density fraction isolated from the rat brain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 216:582–588, 1995.
- [85] Takanobu Nakazawa, Shoji Komai, Tohru Tezuka, Chihiro Hisatsune, Hisashi Umemori, Kentaro Semba, Masayoshi Mishina, Toshiya Manabe, and Tadashi Yamamoto. Characterization of Fyn-mediated tyrosine phosphorylation sites on GluR ϵ 2 (NR2B) subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1):693–699, 2001.
- [86] Ji Won Um and Stephen M Strittmatter. Amyloid- β induced signaling by cellular prion protein and Fyn kinase in Alzheimer disease. *Prion*, 7(1):37–41, 2013.
- [87] Megan Larson, Mathew A Sherman, Fatou Amar, Mario Nuvolone, Julie A Schneider, David A Bennett, Adriano Aguzzi, and Sylvain E Lesné. The Complex PrPc -Fyn Couples Human Oligomeric $A\beta$ with Pathological Tau Changes in Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, 32:16857–16871, 2012.
- [88] Haakon B Nygaard, Christopher H van Dyck, and Stephen M Strittmatter. Fyn kinase inhibition as a novel therapy for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 6(1):8, 2014.
- [89] Robert Perneczky, Panagiotis Alexopoulos, and Alexander Kurz. Soluble amyloid precursor proteins and secretases as alzheimer's disease biomarkers, 2014.
- [90] Hansen Wang, Carl He Ren, C Geeth Gunawardana, and Gerold Schmitt-Ulms. Overcoming barriers and thresholds – signaling of oligomeric Abeta through the prion protein to Fyn. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1):24, 2013.
- [91] JiWon Um, AdamC Kaufman, Mikhail Kostylev, JacquelineK Heiss, Massimiliano Stagi, Hideyuki Takahashi, MeghanE Kerrisk, Alexander Vortmeyer, Thomas Wisniewski, AnthonyJ Koleske, ErikC Gunther, HaakonB Nygaard, and StephenM Strittmatter. Metabotropic Glutamate Receptor 5 Is a Coreceptor for Alzheimer $A\beta$ Oligomer Bound to Cellular Prion Protein. *Neuron*, 79(5):887–902, 2013.
- [92] Santiago V. Salazar and Stephen M. Strittmatter. Cellular prion protein as a receptor for amyloid- β oligomers in Alzheimer's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 483(4):1143–1147, 2017.
- [93] Laura T. Haas, Santiago V. Salazar, Mikhail A. Kostylev, Ji Won Um, Adam C. Kaufman, and Stephen M. Strittmatter. Metabotropic glutamate receptor 5 couples cellular prion protein to intracellular signalling in Alzheimer's disease. *Brain*, 139(2):526–546, 2016.

- [94] David R Brown, Kefeng Qin, Jochen W Herms, Axel Madlung, Jean Manson, Robert Strome, Paul E Fraser, Theo Kruck, Alex von Bohlen, Walter Schulz-Schaeffer, Armin Giese, David Westaway, and Hans Kretzschmar. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, 390(6661):684–7, 1997.
- [95] Graham S Jackson, Ian Murray, Laszlo L P Hosszu, Nicholas Gibbs, Jonathan P Waltho, Anthony R Clarke, and John Collinge. Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15):8531–8535, 2001.
- [96] David R. Brown and Judyth Sassoon. Copper-Dependent Functions for the Prion Protein. *Molecular Biotechnology*, 22(2):165–178, 2002.
- [97] Peter K. Stys, Haitao You, and Gerald W. Zamponi. Copper-dependent regulation of NMDA receptors by cellular prion protein: implications for neurodegenerative disorders. *The Journal of Physiology*, 590(6):1357–1368, 2012.
- [98] Craig S. Atwood, Richard C. Scarpa, Xudong Huang, Robert D. Moir, Walton D. Jones, David P. Fairlie, Rudolph E. Tanzi, and Ashley I. Bush. Characterization of copper interactions with Alzheimer amyloid β peptides: Identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid β 1-42. *Journal of Neurochemistry*, 75(3):1219–1233, 2000.
- [99] Melanie D White, Michael Farmer, Ilaria Mirabile, Sebastian Brandner, John Collinge, and Giovanna R Mallucci. Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(29):10238–10243, 2008.
- [100] Kristina Endres, Falk Fahrenholz, Johannes Lotz, Christoph Hiemke, Stefan Teipel, Klaus Lieb, O. Tuscher, and Andreas Fellgiebel. Increased CSF APPs- levels in patients with Alzheimer disease treated with acitretin. *Neurology*, 83(21):1930–1935, nov 2014.
- [101] Jonah J. Scott-McKean, Krystyna Surewicz, Jin Kyu Choi, Vernon A. Ruffin, Ahlam I. Salameh, Krzysztof Nieznanski, Alberto C S Costa, and Witold K. Surewicz. Soluble prion protein and its N-terminal fragment prevent impairment of synaptic plasticity by $A\beta$ oligomers: Implications for novel therapeutic strategy in Alzheimer’s disease. *Neurobiology of Disease*, 91:124–131, 2016.
- [102] Andrew J Nicoll, Clare R Trevitt, M Howard Tattum, Emmanuel Risse, Emma Quarterman, Amaury Avila Ibarra, Connor Wright, Graham S Jackson, Richard B Sessions, Mark Farrow, Jonathan P Waltho, Anthony R Clarke, and John Collinge. Pharmacological chaperone for the structured domain of human prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(41):17610–17615, oct 2010.
- [103] Emmanuel Risse, Andrew J. Nicoll, William A. Taylor, Daniel Wright, Mayank Badoni, Xiaofan Yang, Mark A. Farrow, and John Collinge. Identification of a compound that disrupts binding of amyloid- β to the prion protein using a novel fluorescence-based assay. *Journal of Biological Chemistry*, 290(27):17020–17028, 2015.

- [104] Takahiro Aimi, Koichiro Suzuki, Tatsuya Hoshino, and Tohru Mizushima. Dextran sulfate sodium inhibits amyloid- β oligomer binding to cellular prion protein. *Journal of Neurochemistry*, 134(4):611–617, 2015.
- [105] Adam C. Kaufman, Santiago V. Salazar, Laura T. Haas, Jinhee Yang, Mikhail A. Kostylev, Amanda T. Jeng, Sophie A. Robinson, Erik C. Gunther, Christopher H. Van Dyck, Haakon B. Nygaard, and Stephen M. Strittmatter. Fyn inhibition rescues established memory and synapse loss in Alzheimer mice. *Annals of Neurology*, 77(6):953–971, 2015.
- [106] Alison Hamilton, Maryam Vasefi, Cheryl Vander Tuin, Robyn J. McQuaid, Hymie Anisman, and Stephen S G Ferguson. Chronic Pharmacological mGluR5 Inhibition Prevents Cognitive Impairment and Reduces Pathogenesis in an Alzheimer Disease Mouse Model. *Cell Reports*, 15(9):1859–1865, 2016.
- [107] Shinji Matsunaga, Taro Kishi, and Nakao Iwata. Memantine monotherapy for Alzheimer’s Disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE*, 10(4), 2015.
- [108] Latha Devi and Masuo Ohno. Cognitive benefits of memantine in Alzheimer’s 5XFAD model mice decline during advanced disease stages. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 144:60–66, 2016.
- [109] Marc H.V. Van Regenmortel and Sylviane Muller. D-peptides as immunogens and diagnostic reagents, 1998.
- [110] Howard M. Dintzis, David E. Symer, Renee Z. Dintzis, Laura E. Zawadzke, and Jeremy M. Berg. A comparison of the immunogenicity of a pair of enantiomeric proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 16(3):306–308, 1993.
- [111] T N Schumacher, L M Mayr, D L Minor, M A Milhollen, M W Burgess, and P S Kim. Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5257):1854–1857, 1996.
- [112] Katja Wiesehan, Katrin Buder, Reinhold P. Linke, Stephan Patt, Matthias Stoldt, Eberhard Unger, Bettina Schmitt, Enrico Bucci, and Dieter Willbold. Selection of D-amino-acid peptides that bind to Alzheimer’s disease amyloid peptide A β 1-42 by mirror image phage display. *ChemBioChem*, 4(8):748–753, 2003.
- [113] Katja Wiesehan and Dieter Willbold. Mirror-image phage display: Aiming at the mirror. *ChemBioChem*, 4(9):811–815, 2003.
- [114] Thomas Van Groen, Katja Wiesehan, Susanne A. Funke, Inga Kadish, Luitgard Nagel-Steger, and Dieter Willbold. Reduction of Alzheimer’s disease amyloid plaque load in transgenic mice by D3, a D-enantiomeric peptide identified by mirror image phage display. *ChemMedChem*, 3(12):1848–1852, 2008.

- [115] Susanne Aileen Funke, Thomas Van Groen, Inga Kadish, Dirk Bartnik, Luitgard Nagel-Steger, Oleksandr Brener, Torsten Sehl, Renu Batra-Safferling, Christine Moriscot, Guy Schoehn, Anselm H C Horn, Andreas Müller-Schiffmann, Carsten Korth, Heinrich Sticht, and Dieter Willbold. Oral treatment with the D-enantiomeric peptide D3 improves the pathology and behavior of alzheimer's disease transgenic mice. *ACS Chemical Neuroscience*, 1(9):639–648, 2010.
- [116] Thomas Van Groen, Inga Kadish, Susanne Aileen Funke, Dirk Bartnik, and Dieter Willbold. Treatment with D3 removes amyloid deposits, reduces inflammation, and improves cognition in aged A β PP/PS1 double transgenic mice. *Journal of Alzheimer's Disease*, 34(3):609–620, 2013.
- [117] Anne Elfgen, Beatrix Santiago-Schübel, Lothar Gremer, Janine Kutzsche, and Dieter Willbold. Surprisingly high stability of the A β oligomer eliminating all-D-enantiomeric peptide D3 in media simulating the route of orally administered drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 107(July):203–207, 2017.
- [118] Oleksandr Brener. Charakterisierung und gezielte Eliminierung von toxischen Proteinaggregaten. *Doktorarbeit*, 2014.
- [119] Leonie H E Leithold, Nan Jiang, Julia Post, Tamar Ziehm, Elena Schartmann, Janine Kutzsche, N. Jon Shah, Jörg Breitkreutz, Karl Josef Langen, Antje Willuweit, and Dieter Willbold. Pharmacokinetic Properties of a Novel D-Peptide Developed to be Therapeutically Active Against Toxic β -Amyloid Oligomers. *Pharmaceutical Research*, 33(2):328–336, 2016.
- [120] Olujide O. Olubiyi and Birgit Strodel. Structures of the Amyloid β -Peptides A β 1-40 and A β 1-42 as influenced by pH and a D-peptide. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(10):3280–3291, 2012.
- [121] O.O. Olubiyi, D. Frenzel, Dirk Bartnik, J.M. Gluck, O. Brener, Luitgard Nagel-Steger, Susanne Aileen Funke, Dieter Willbold, and Birgit Strodel. Amyloid Aggregation Inhibitory Mechanism of Arginine-rich D-peptides. *Current Medicinal Chemistry*, 21(12):1448–1457, 2014.
- [122] L Luers, G Panza, F Henke, T Agyenim, J Weiss, D Willbold, and E Birkmann. Amyloid Formation: Age-Related Mechanism in Creutzfeldt-Jakob Disease? *Rejuvenation Research*, 13(2-3):214–216, 2010.
- [123] Hamed Shaykhalishahi, Ewa A. Mirecka, Aziz Gauhar, Clara S R Grüning, Dieter Willbold, Torleif Hörd, Matthias Stoldt, and Wolfgang Hoyer. A β -hairpin-binding protein for three different disease-related amyloidogenic proteins. *ChemBioChem*, 16(3):411–414, 2015.
- [124] Rex M. C. Dawson, Daphne C. Elliott, William H. Elliott, and Kenneth M. Jones. *Data for Biochemical Research*. Oxford Science Publications, 3rd edition, 1986.
- [125] H Schägger and G von Jagow. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2):368–379, 1987.
- [126] Ed Harlow and David Lane. *Antibodies, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, (28):649–654, 1988.

- [127] Jochen Heukeshoven and Rudolf Dernick. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis*, 9(1):28–32, 1988.
- [128] Oleksandr Brener, Tina Dunkelmann, Lothar Gremer, Thomas van Groen, Ewa A. Mirecka, Inga Kadish, Antje Willuweit, Janine Kutzsche, Dagmar Jürgens, Stephan Rudolph, Markus Tusche, Patrick Bongen, Jörg Pietruszka, Philipp Oesterhelt, Karl-Josef Langen, Hans-Ulrich Demuth, Arnold Janssen, Wolfgang Hoyer, Susanne A. Funke, Luitgard Nagel-Steger, and Dieter Willbold. QIAD assay for quantitating a compound's efficacy in elimination of toxic A β oligomers. *Scientific Reports*, 5(1):13222, 2015.
- [129] Luis Filipe Macorano. Isolierung und Charakterisierung von oligomeren Amyloid- β (1-42) mittels Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation. *Bachelorarbeit*, 2014.
- [130] Josep Canet-Ferrer, Eugenio Coronado, Alicia Forment-Aliaga, and Elena Pinilla-Cienfuegos. Correction of the tip convolution effects in the imaging of nanostructures studied through scanning force microscopy. *Nanotechnology*, 25(39):395703, 2014.
- [131] Ouwen Zhang, Lewis E. Kay, J Paul Olivier, and Julie D Forman-Kay. Backbone ^1H and ^{15}N resonance assignments of the N-terminal SH3 domain of drk in folded and unfolded states using enhanced-sensitivity pulsed field gradient NMR techniques. *Journal of Biomolecular NMR*, 4(6):845–858, 1994.
- [132] M. Findeisen, T. Brand, and S. Berger. A ^1H -NMR thermometer suitable for cryoprobes. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 45(2):175–178, feb 2007.
- [133] Frank Delaglio, Stephan Grzesiek, Geerten W Vuister, Guang Zhu, John Pfeifer, and Ad Bax. NMRPipe: A multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *Journal of Biomolecular NMR*, 6(3):277–293, 1995.
- [134] Bruce A. Johnson and Richard A. Blevins. NMR View: A computer program for the visualization and analysis of NMR data. *Journal of Biomolecular NMR*, 4(5):603–614, 1994.
- [135] H Barkhuijsen, R. de Beer, W. M.M.J. Bovée, and D. van Ormondt. Retrieval of frequencies, amplitudes, damping factors, and phases from time-domain signals using a linear least-squares procedure. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 61(3):465–481, 1985.
- [136] John. Cavanagh, Wayne J. Fairbrother, III Palmer, and Nicholas J. Skelton. *Protein NMR spectroscopy : principles and practice*. Elsevier Science, 2nd edition, 1995.
- [137] Mark S. Friedrichs. A model-free algorithm for the removal of baseline artifacts. *Journal of Biomolecular NMR*, 5(2):147–153, 1995.
- [138] J L Markley, A Bax, Y Arata, C W Hilbers, R Kaptein, B D Sykes, P E Wright, and Kurt Wuethrich. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids - (IUPAC Recommendations 1998). *Pure And Applied Chemistry*, 70(1):117–142, 1998.

- [139] Nikolaus M Szeverenyi, Mark J Sullivan, and Gary E Maciel. Observation of spin exchange by two-dimensional fourier transform ^{13}C cross polarization-magic-angle spinning. *Journal of Magnetic Resonance (1969)*, 47(3):462–475, 1982.
- [140] M. Hohwy, C. M. Rienstra, C P Jaroniec, and R G Griffin. Fivefold symmetric homonuclear dipolar recoupling in rotating solids: Application to double quantum spectroscopy Chemical shift correlation spectroscopy in rotating solids: Radio frequency-driven dipolar recoupling and longitudinal exchange A general theo. *The Journal of Chemical Physics*, 110(10):7983–7992, 1999.
- [141] M. Baldus, A. T. Petkova, J. Herzfeld, and R. G. Griffin. Cross polarization in the tilted frame: Assignment and spectral simplification in heteronuclear spin systems. *Molecular Physics*, 95(6):1197–1207, 1998.
- [142] K Takegoshi, Shinji Nakamura, and Takehiko Terao. ^{13}C - ^1H dipolar-assisted rotational resonance in magic-angle spinning NMR. *Chemical Physics Letters*, 344(5-6):631–637, 2001.
- [143] B.M. Fung, A.K. Khitrin, and Konstantin Ermolaev. An Improved Broadband Decoupling Sequence for Liquid Crystals and Solids. *Journal of Magnetic Resonance*, 142(1):97–101, 2000.
- [144] S.P. Skinner, R.H. Fogh, W. Boucher, T.J. Ragan, L.G. Mureddu, and G.W. Vuister. CcpNmr AnalysisAssign: a flexible platform for integrated NMR analysis. *Journal of Biomolecular NMR*, 66(2):111–124, 2016.
- [145] David S Wishart, Colin G Bigam, Arne Holm, Robert S. Hodges, and Brian D Sykes. ^1H , ^{13}C and ^{15}N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects. *Journal of Biomolecular NMR*, 5(1):67–81, 1995.
- [146] Luis Filipe Macorano. Fluoreszenz-basierte Untersuchungen zur PrP-Amyloid- β -Interaktion. *Masterarbeit*, 2017.
- [147] David L. Vanik, Krystyna A. Surewicz, and Witold K. Surewicz. Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions. *Molecular Cell*, 14(1):139–145, 2004.
- [148] Daniel Flender. Sequenzspezifische Zuordnung der NMR-Resonanzen des N-terminalen Fragments des humanen Prion-Proteins bei verschiedenen pH-Werten. *Bachelorarbeit*, 2016.
- [149] Francesco Ravotti, Marielle Aulikki Wälti, Peter Güntert, Roland Riek, Anja Böckmann, and Beat H. Meier. Solid-state NMR sequential assignment of an Amyloid- β (1-42) fibril polymorph. *Biomolecular NMR Assignments*, 10(2):269–276, oct 2016.
- [150] Christofer Lendel, Morten Bjerring, Anatoly Dubnovitsky, Robert T. Kelly, Andrei Filippov, Oleg N. Antzutkin, Niels Chr Nielsen, and Torleif Härd. A hexameric peptide barrel as building block of amyloid- β protofibrils. *Angewandte Chemie - International Edition*, 53(47):12756–12760, 2014.

- [151] Leonie H E Leithold, Nan Jiang, Julia Post, Nicole Niemietz, Elena Schartmann, Tamar Ziehm, Janine Kutzsche, N. Jon Shah, Jörg Breitzkreutz, Karl Josef Langen, Antje Willuweit, and Dieter Willbold. Pharmacokinetic properties of tandem D-peptides designed for treatment of Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89:31–38, 2016.
- [152] I Mehlhorn, D Groth, J Stockel, B Moffat, D Reilly, D Yansura, W S Willett, M Baldwin, R Fletterick, F E Cohen, R Vandlen, D Henner, and S B Prusiner. High-Level Expression and Characterization Of a Purified 142-Residue Polypeptide Of the Prion Protein. *Biochem*, 35(17):5528–5537, 1996.
- [153] Ilia V Baskakov, Giuseppe Legname, Michael A Baldwin, Stanley B Prusiner, and Fred E Cohen. Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24):21140–21148, 2002.
- [154] Theint Theint, Philippe S Nadaud, Darryl Aucoin, Jonathan J Helmus, Simon P Pondaven, Krystyna Surewicz, Witold K Surewicz, and Christopher P Jaroniec. Species-dependent structural polymorphism of Y145Stop prion protein amyloid revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Nature Communications*, 8(1), 2017.
- [155] Manuel Morillas, Wieslaw Swietnicki, Pierluigi Gambetti, and Witold K Surewicz. Membrane Environment Alters the Conformational Structure of the Recombinant Human Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 274(52):36859–36865, 1999.
- [156] Lars Lüers. Biophysikalische Charakterisierung der spontanen und keiminduzierten Fibrillogenese des humanen Prion-Proteins im Hinblick auf die Untersuchung der Speziesbarriere. *Doktorarbeit*, 2013.
- [157] Erin Bove-Fenderson, Ryo Urano, John E. Straub, and David A. Harris. Cellular prion protein targets amyloid- β fibril ends via its C-terminal domain to prevent elongation. *Journal of Biological Chemistry*, page jbc.M117.789990, 2017.
- [158] Thomas van Groen, Sarah Schemmert, Oleksandr Brener, Lothar Gremer, Markus Tusche, Luitgard Nagel-Steger, Inga Kadish, Elena Schartmann, Dagmar Jürgens, Antje Willuweit, Janine Kutzsche, and Dieter Willbold. The A β oligomer eliminating D-enantiomeric peptide RD2 improves cognition without changing plaque pathology. *Scientific Reports*, 7:16275, 2017.
- [159] Janine Kutzsche, Sarah Schemmert, Markus Tusche, Jörg Neddens, Roland Rabl, Dagmar Jürgens, Oleksandr Brener, Antje Willuweit, Birgit Hutter-Paier, and Dieter Willbold. Large-scale oral treatment study with the four most promising D3-derivatives for the treatment of Alzheimer's disease. *Molecules*, 22(10):1693, oct 2017.
- [160] Antonia Nicole Klein, Tamar Ziehm, Markus Tusche, Johan Buitenhuis, Dirk Bartnik, Annett Boeddrich, Thomas Wiglenda, Erich Wanker, Susanne Aileen Funke, Oleksandr Brener, Lothar Gremer, Janine Kutzsche, and Dieter Willbold. Optimization of the All-D peptide D3 for A β oligomer elimination. *PLoS ONE*, 11(4):e0153035, apr 2016.

-
- [161] Stephan Rudolph, Antonia Nicole Klein, Markus Tusche, Christine Schlosser, Anne Elfgen, Oleksandr Brener, Charlotte Teunissen, Lothar Gremer, Susanne Aileen Funke, Janine Kutzsche, and Dieter Willbold. Competitive mirror image phage display derived peptide modulates amyloid beta aggregation and toxicity. *PLoS ONE*, 11(7):1–22, 2016.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Nadine Rösener