
Strukturelle Analyse der dynamischen
Konformationsänderung des Prion-Proteins in
Proteinmissfaltungskrankheiten

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (*Dr. rer. nat.*)

Eingereicht im Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik,
Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg

vorgelegt von
Anne Sommer
Hamburg
2015

Die praktischen Arbeiten wurden im Zeitraum von Februar 2010 bis September 2014 in der Nachwuchsgruppe von Dr. Lars Redecke im Laboratorium für Strukturbiologie von Infektion und Entzündung der Universitäten Hamburg und Lübeck sowie am Institut für Biochemie und Molekularbiologie des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg in den Laboratorien der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christian Betzel durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ch. Betzel

2. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer

Tag der Disputation: 07.08.2015

I. Inhaltsverzeichnis

II. Abkürzungsverzeichnis	V
III. Zusammenfassung	IX
IV. Summary	XI
1. Einleitung	1
1.1. Prionen-Erkrankungen	2
1.2. Der Erreger und die „Protein- <i>only</i> “-Theorie	4
1.3. Struktur und Funktion des Prion-Proteins	5
1.4. Aggregation des Prion-Proteins	8
1.5. Therapie von Prionen-Erkrankungen	11
1.6. Dynamische Lichtstreuung (DLS)	13
2. Zielsetzung der Doktorarbeit	15
3. Ergebnisse	17
3.1. Klonierung der Prion-Protein-Konstrukte	18
3.2. Optimierung der Prion-Protein-Herstellung	19
3.2.1. Rekombinante Genexpression in <i>E. coli</i>	19
3.2.2. Rückfaltung, Reinigung und Entfernung der Hexahistidinsequenz	20
3.3. Charakterisierung der Prion-Proteine	23
3.3.1. CD-spektroskopische Analyse	24
3.3.2. Hydrodynamische Radien und Proteinase K Sensitivität	24
3.3.3. Bestimmung der Schmelzpunkte	28
3.3.4. Strukturelle Charakterisierung von hPrP90-230+EFEA mit Hexahistidinsequenz in Lösung	31
3.4. Oxidativ-induzierte Umwandlung	33
3.4.1. Validierung des bestehenden UV-Versuchsaufbaus	33
3.4.1.1. Validierung des integrierten Online-DLS-Systems	34
3.4.1.2. Anpassung der UV-Bestrahlungsparameter	39
3.4.1.3. Charakterisierung der entstandenen oligomeren Spezies	42
3.4.1.4. Einfluss der Laserleistung auf die UV-induzierte Prion-Protein-Umwandlung	48
3.4.2. Herstellung der intermediären Zwischenzustände	55
3.4.2.1. Produktionsläufe im Kreislaufsystem	58
3.4.2.2. Produktionsläufe im Durchflusssystem	59
3.4.2.3. Isolierung des „dimeren“ Zwischenzustandes	61

3.4.2.4. Charakterisierung des Prion-Spezies-Gemisches	63
3.4.3. Metallkatalysierte oxidative Umwandlung	69
3.4.3.1. Analyse der Kupferbindung nach metallkatalysierter Umwandlung	70
3.5. Inhibition der oxidativen Umwandlung von Prion-Proteinen	73
3.5.1. Inhibition der metallkatalysierten oxidativen Umwandlung	73
3.5.1.1. Bestimmung der Peptid-Bindungsaffinitäten mittels Oberflächenplasmonen- resonanz (SPR)-Spektroskopie	79
3.5.1.2. Untersuchung des Faltungszustandes der PrP-Peptid-Komplexe nach metall- katalysierter Oxidation	81
3.5.2. Untersuchungen zur Inhibition der UV-induzierten Umwandlung	82
3.6. Kristallisation	83
3.6.1. <i>In-vivo</i> -Kristallisation	87
4. Diskussion	89
4.1. UV-Bestrahlungssystem mit integriertem Online-DLS-System	90
4.2. Anwendung des UV-Bestrahlungssystems zur Induktion der Umwandlung und Aggregation des Prion-Proteins	91
4.3. Das Prion-Protein als Übergangsmetall-bindendes Protein	96
4.4. Einfluss des GPI-Ankers auf die Umwandlung des Prion-Proteins	97
4.5. Inhibition der Prion-Protein-Umwandlung und Aggregation	98
4.6. Kristallisationsversuche	102
4.7. Ausblick	104
5. Material und Methoden	107
5.1. Material	107
5.1.1. Geräte	107
5.1.2. Verbrauchsmaterialien	109
5.1.3. Chemikalien	110
5.1.4. Kommerzielle Kristallisationslösungen, Kits und Enzyme	111
5.1.5. DNA und Proteingrößenmarker	111
5.1.6. Plasmide und Oligonukleotide	111
5.1.7. Bakterienstämme	114
5.1.8. Insektenzellen	115
5.1.9. Medien, Puffer und Lösungen	115
5.2. Methoden	119
5.2.1. Molekularbiologische Methoden	119

5.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	119
5.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese	120
5.2.1.3. Reinigung von PCR-Fragmenten	120
5.2.1.4. Restriktionsspaltung	120
5.2.1.5. Bestimmung von DNA-Konzentrationen	121
5.2.1.6. Ligation	121
5.2.1.7. Herstellung chemisch kompetenter Zellen	121
5.2.1.8. Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	122
5.2.1.9. Glycerin-Stammkulturen	122
5.2.1.10. Plasmidpräparation	123
5.2.1.11. DNA-Sequenzierung	123
5.2.1.12. Bac-to-Bac [®] System	123
5.2.1.13. Rekombinante Genexpression in <i>Sf9</i> -Zellen	125
5.2.1.14. Rekombinante Genexpression in <i>E. coli</i> -Zellen	126
5.2.1.15. Bestimmung der optischen Dichte (OD ₆₀₀)	128
5.2.2. Proteinbiochemische Methoden	128
5.2.2.1. Zellaufschluss und Protein-Rückfaltung	128
5.2.2.2. Regeneration der Ni-NTA-Agarose-Matrix	129
5.2.2.3. Abspaltung des 6 x His-Überhangs mittels TEV-Protease	129
5.2.2.4. Konzentration von Proteinlösungen	130
5.2.2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration	131
5.2.2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	131
5.2.2.7. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)	132
5.2.2.8. Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen	133
5.2.2.9. Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen	134
5.2.2.10. Western Blot	134
5.2.2.11. Proteinase K (PK) Sensitivitätstest	135
5.2.2.12. Dynamische Lichtstreuung (DLS)	135
5.2.2.13. UV-induzierte Umwandlung des Prion-Proteins	136
• Versuchsaufbau	136
• Kalibriergel zur Bestimmung der Proteinkonzentration	137
• Stabilitätstest	138
• Konzentration der UV-bestrahlten Proteinproben	138
• Affinitätschromatographie	139

• Größenausschlusschromatographie	139
• Ionenaustauschchromatographie	140
• Dichtegradienten-Ultrazentrifugation	140
5.2.2.14. Metallkatalysierte oxidative Umwandlung des Prion-Proteins	141
• Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration	142
• Dimerisierung der Peptide mit C-terminalem Cystein-Rest	142
5.2.2.15. Probenpräparation für die Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz (TXRF)- Analyse	143
5.2.2.16. Massenspektrometrie	144
• Proteolytische Spaltung mit Trypsin im Gel	144
5.2.2.17. Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie	145
5.2.2.18. Kleinwinkelbeugung (Small angle X-ray scattering - SAXS)	146
5.2.2.19. Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie	147
5.2.2.20. Proteinkristallisation	148
• Präkristallisationstest (PCT)	148
• Probenvorbereitung Kristallisation	149
• Kristallisationscreening	149
• Optimierung von Kristallisationsbedingungen	150
6. Literaturverzeichnis	151
7. Anhang	171
7.1. Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe	171
7.1.1. GHS- und Risikosymbole, H- und P-Sätze sowie R- und S-Sätze	176
7.1.2. Auflistung der verwendeten KMR-Stoffe	180
8. Danksagung	181
9. Lebenslauf	183
10. Eidesstattliche Versicherung	184

II. Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Bovines Serumalbumin
BSE	Bovine spongiforme Enzephalopathie
CD	Zirkulardichroismus
CJD	<i>Creutzfeldt-Jakob disease</i>
Cm	Chloramphenicol
CWD	<i>Chronic wasting disease</i>
Da	Dalton
deg	<i>Degree</i> (Winkelmaß)
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DLS	dynamische Lichtstreuung
D _{max}	maximaler Durchmesser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>2'-deoxynucleoside-5'-triphosphate</i>
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimidhydrochlorid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ESI	Elektrospray Ionisation
FFI	<i>Fatal familial insomnia</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
g	Erdbeschleunigung
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Syndrom
Gu-HCl	Guanidinium-Hydrochlorid
hPrP	humanes Prion-Protein

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kDa	Kilodalton
K _D	thermodynamische Dissoziationskonstante
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
M	Molar [mol L ⁻¹]
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MeSOX	Methioninsulfoxid
min	Minuten
μ M	Mikromolar [μ mol L ⁻¹]
mM	Millimolar [mmol L ⁻¹]
mPrP	murines Prion-Protein
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht [g mol ⁻¹]
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NHS	N-Hydroxysuccinimid
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
OR	<i>Octarepeat</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PK	Proteinase K
PQC-System	Protein-Qualitätskontroll-System
PrP	Prion-Protein
PRNP-Gen	Prion-Protein-Gen
PrP ^C	zelluläres Prion-Protein
PrP ^{Sc}	<i>Scrapie-like</i> Prion-Protein
R _g	Trägheitsradius
R _H	hydrodynamischer Radius

ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RU	<i>Response unit</i>
sCJD	<i>Sporadic CJD</i>
SAXS	<i>Small angle X-ray scattering</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
SV	Säulenvolumen
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylen-1,2-diamin
TEV	Tobacco Etch Virus
TOF	<i>Time of flight</i>
Tricin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSE	<i>Transmissible spongiform encephalopathy</i>
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	Volumen per Volumen
vCJD	<i>Variant CJD</i>
w/v	Masse per Volumen
ZNS	zentrales Nervensystem

III. Zusammenfassung

Prion-Proteine können durch eine Konformationsänderung, die beispielsweise oxidativ induziert werden kann, in ihre β -Faltblatt-reiche pathogene Isoform umgewandelt werden, welche als alleiniger Erreger der übertragbaren spongiformen Enzephalopathien angesehen wird. Eine hochauflösende Struktur der PrP^{Sc}-Isoform sowie detaillierte Kenntnisse über den Mechanismus der Umwandlung und deren Initialisierung sind bis heute nicht vorhanden, obwohl die Forschung auf diesem Gebiet sehr umfangreich ist.

Zur Gewinnung neuer Erkenntnisse wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Herstellung der Prion-Proteine optimiert, daraufhin ein UV-System zur oxidativ-induzierten Konformationsänderung etabliert und die Radienbestimmung von Proteinen mittels DLS-System im Fluss untersucht. Während der UV-Bestrahlungsexperimente konnten neben der Bildung einer löslichen, oligomeren Spezies Aggregations-Intermediate detektiert werden, deren Herstellung für weitere Isolierungs- und Charakterisierungsexperimente optimiert wurde. Die Produktion der gewünschten Aggregations-Intermediate mittels UV-Bestrahlung war sowohl im Kreislaufsystem als auch im Durchflusssystem erfolgreich. Die anschließende Isolierung der hergestellten Spezies von den PrP-Monomeren unter Anwendung verschiedener biochemischer Trennmethode blieb jedoch erfolglos, daher erfolgte die Charakterisierung mit den bestrahlten Mischfraktionen. Die Proben wurden mittels DLS, CD-Spektroskopie und nativer PAGE analysiert, dabei wurde deutlich, dass es sich bei den hergestellten Aggregations-Intermediaten nicht um „dimere“ und „trimere“ Zwischenstufen handelt. Es konnte gezeigt werden, dass in der Proteinlösung nicht nur die in der SDS-PAGE-Analyse detektierten spezifischen Zwischenprodukte vorlagen und dass die erzeugten Spezies bereits diffuse oligomere Strukturen aufwiesen. Mit zunehmender Bestrahlungszeit und der Bildung höherer Aggregate entsprach der charakteristische Faltungszustand der Prion-Proteine nicht mehr dem der zellulären Form des Prion-Proteins. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die oxidativ-induzierte spezifische Umwandlung des Prion-Proteins nicht über einzelne spezifische Zwischenzustände verläuft, sondern von Anfang an diffuse oligomere Zustände aufweist, welche im weiteren Verlauf der oxidativen Schädigung kovalente Vernetzungen ausbilden und schließlich die löslichen, spezifischen Oligomere formen.

Des Weiteren konnte die Inhibition der PrP-Aggregation durch spezifische Peptide nachgewiesen werden. Der inhibitorische Effekt konnte sowohl in einem etablierten oxidativen metallkatalysierten Assay als auch durch das UV-induzierte Umwandlungssystem bestätigt werden. Die Ergebnisse der CD-spektroskopischen Analysen deuten darauf hin, dass die

vielversprechendsten Peptide das Prion-Protein in der zellulären, vorwiegend α -helikalen Form stabilisieren und dabei eine hohe Bindungsaffinität im μM -Bereich aufweisen.

Diese Resultate müssen zukünftig verifiziert und vertieft werden, um detailliertere Erkenntnisse einerseits über den molekularen Ablauf des UV-induzierten Umwandlungsmechanismus von der zellulären Form des Prion-Proteins in seine pathogene Isoform und andererseits über die Bindung der inhibierenden Peptide als Grundlage zur Entwicklung eines Medikaments für Prionen-Erkrankungen zu liefern.

Abschließend lässt sich festhalten, dass wichtige neue Einblicke in den UV-induzierten Umwandlungs- und Aggregationsmechanismus des Prion-Proteins gewonnen wurden und außerdem noch neue, vielversprechende Peptide identifiziert wurden, die möglicherweise zu effektiven PrP-Umwandlungsinhibitoren optimiert werden können.

IV. Summary

Prion proteins can be converted by an oxidatively induced conformational change into a β -sheet enriched pathogenic isoform, which is considered to be the causative agent of transmissible spongiform encephalopathies. High-resolution structures of the PrP^{Sc} isoform as well as detailed knowledge of the fundamental mechanism that trigger the conversion and aggregation process of PrP have not been obtained so far, although extensive research has been performed during the past decade in this area.

To increase the current knowledge, the preparation protocol for recombinant prion protein was optimized in this work, followed by the establishment of an UV irradiation setup to induce conformational changes by oxidative damage of the PrP molecules. Moreover, an online DLS system was tested and applied to determine the radius of particles in solution directly in flow. In addition to the formation of a specific soluble oligomer species, different aggregation intermediates have been detected during UV irradiation experiments. The preparation of these intermediates has been optimized for isolation and further characterization experiments. The production of the required aggregation intermediates by UV irradiation was successful both in a circulation system and in a flow-through system. However, subsequent trials to isolate these species by different biochemical methods was not successful. Thus, the characterization was performed with the irradiated mixed fractions. Investigation of the intermediate samples by DLS, CD spectroscopy and native PAGE indicated that it was no "dimeric" and "trimeric" intermediate in the produced aggregation intermediates. It could be shown that there were not just the specific intermediates detected in the SDS-PAGE analysis of the protein solution, but that these generated species had already diffuse oligomeric structures. With increasing irradiation time and higher aggregates formation the characteristic folding state of the prion protein no longer corresponded to the cellular form of the prion protein. The results suggest that the oxidative-induced specific conversion of the prion protein does not have individual specific intermediate states runs. The first diffuse oligomeric states will be formed in the further course of oxidative damage, then covalent crosslinks and finally the specific soluble oligomer will be developed.

Furthermore, specific and highly efficient inhibition of the PrP conversion and aggregation process was detected in the presence of specific peptides. The inhibitory effect was successfully confirmed by applying both metal-catalyzed and UV-induced oxidation of the PrP molecules. The results of the CD spectroscopic analysis suggest that the most promising peptides stabilize

the prion protein in the cellular, predominantly α -helical fold, exhibiting binding affinities in the μM range.

These results must be verified in the future and enhanced, to provide more detailed insights on the one hand of the molecular process of UV-induced conversion mechanism of the cellular form of the prion protein into its pathogenic isoform and on the other hand of the binding of inhibiting peptides as a basis for the development of a drug for prion diseases.

In conclusion, it can be stated, that important new insights into the UV-induced conversion and aggregation mechanism of PrP obtained and also new and promising peptides were identified, which possibly can be optimized to effective folding inhibitors for the PrP.

1. Einleitung

Durch die immer weiter ansteigende Lebenserwartung der Menschen aufgrund der ständigen Fortschritte in der Medizin und Technik besteht ein erhöhtes Risiko an einer degenerativen Krankheit wie Alzheimer, Parkinson oder den Prionen-Erkrankungen zu leiden, welche durch fehlgefaltete Proteine ausgelöst werden (Reynaud, 2010). Das Protein-Qualitätskontroll (PQC)-System baut in gesunden Zellen fehlgefaltete Proteine ab. Bei einer Überlastung des PQC-Systems können sich jedoch fehlgefaltete Proteine anreichern. Diese Begebenheit tritt vermehrt in alternden Zellen sowie in Zellen von Personen mit einem genetischen Defekt auf. Die fehlgefalteten Proteine können mit der Zeit durch das PQC-System abgebaut werden oder aufgrund ihrer Proteineigenschaften toxische Oligomere und höhere, oftmals amyloide Aggregate ausbilden. (Gregersen *et al.*, 2006).

Proteine sind wichtig für den Organismus, weil sie an vielen Prozessen der Zelle direkt beteiligt sind. Ist ihre Funktion durch eine Fehlfaltung gestört, können die Folgen für die Zelle beziehungsweise den Organismus schwerwiegend sein. Die Protein-Fehlfaltung zeichnet sich durch eine umfangreiche Konformationsänderung aus, bei der meist ein charakteristischer Übergang von α -Helix-reichen in β -Faltblatt-dominierte Strukturen stattfindet. Dabei werden hydrophobe Aminosäurereste freigesetzt, so dass der Konformationswechsel direkt mit der toxischen Oligomerisierung und Aggregation der beteiligten Proteine einhergeht und es letztendlich zur Ausbildung von amyloiden Strukturen kommt (Abbildung 1) (Reynaud, 2010).

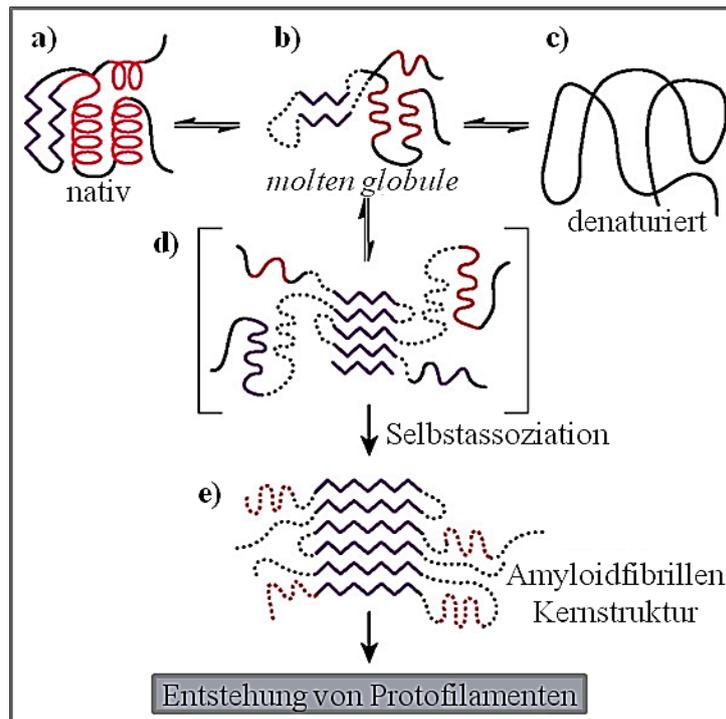


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aggregationsmechanismus fehlgefalteter Proteine. b) Ein teilweise gefalteter, *molten globule*-ähnlicher Zwischenzustand eines Proteins kann sowohl aus dem a) nativen als auch aus dem c) denaturierten Zustand während der Faltung entstehen. d) Die β -Faltblatt-Domänen (lila) assoziieren mit sich selbst und initiieren dadurch die Oligomerbildung. Durch weitere Anlagerung von Proteinen entstehen Protofilamente und letztendlich e) amyloide Fibrillen, deren stabile Kernstruktur überwiegend von den β -Faltblatt-Strukturen gebildet wird. Rot: α -Helix-Struktur; gestrichelte Linien: undefinierte Struktur (Modifiziert nach Selkoe, 2003).

1.1. Prionen-Erkrankungen

Prionen-Erkrankungen, die auch als übertragbare spongiforme Enzephalopathien (*Transmissible spongiform encephalopathy*, TSE) bezeichnet werden, gehören zu den Pathologien, die durch Proteinefehlfaltungen ausgelöst werden. Diese seltenen, aber in der Regel tödlich verlaufenden progressiven Neurodegenerationen kommen sowohl beim Menschen als auch bei Tieren vor (Colby und Prusiner, 2011). Prionen-Krankheiten können genetisch, iatrogen oder sporadisch auftreten. Auslöser ist eine Konformationsänderung des Prion-Proteins (PrP), welches membranständig von Säugerzellen präsentiert wird (Prusiner, 1991). Im Gegensatz zu allen anderen neurodegenerativen Krankheiten sind nach heutigem Kenntnisstand die Prionen-Krankheiten die einzigen, die zwischen Individuen übertragen werden können, was auf eine Art infektiösen Charakter schließen lässt. Zu den beim Menschen auftretenden TSEs gehören beispielsweise die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD), das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSSS), die tödliche familiäre Schlaflosigkeit (*Fatal familial insomnia*, FFI) und Kuru, während die Traberkrankheit (*Scrapie*) Schafe und

Ziegen, die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) Rinder und die *Chronic wasting disease* (CWD) Elch- und Hirscharten betrifft.

In den frühen 1920er Jahren wurde zum ersten Mal von zwei Medizinern unabhängig voneinander eine Prionen-Erkrankung beim Menschen beschrieben (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921). Heutzutage wird bei der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) zwischen der iatrogenen und der sporadischen CJD-Form sowie einer neuartigen *variant* CJD (vCJD) unterschieden. Die vCJD wird durch den Umgang und Verzehr von Rinderprodukten, die mit fehlgefalteten Prionen kontaminiert sind, hervorgerufen. Bei der iatrogenen CJD findet eine Übertragung von Mensch zu Mensch auf medizinischem Wege beispielsweise durch die Transfusion von Prionen-infiziertem Blut statt. Die häufigste CJD (ein Fall pro eine Million Menschen) ist allerdings die sporadische Krankheitsform, welche vor allem ältere Menschen betrifft und deren Ursache bisher unbekannt ist (Aguzzi *et al.*, 2007).

Gerstmann, Strüssler und Scheinker beschrieben im Jahr 1936 die klinischen Merkmale und die Neuropathologie einer ungewöhnlichen vererbaren progressiven Ataxie, bei der zahlreiche Amyloid-Plaques im Gehirn auftraten (Gerstmann *et al.*, 1936). 1992 wurde durch molekulargenetische Studien die genetische Anomalie des GSSS identifiziert. Anstelle eines Prolins wird im Codon 102 der PRNP-Gensequenz beim GSSS die Aminosäure Leucin kodiert (Hsiao *et al.*, 1989). Die genetische Prionen-Erkrankung FFI, welche mit Mutationen in einem oder mehreren Loci innerhalb der PRNP-Gensequenz assoziiert wird, wurde 1986 zum ersten Mal beschrieben (Lugaresi *et al.*, 1986). Kuru trat im 20. Jahrhundert epidemieartig beim Volk der Fore im Hochland von Papua-Neuguinea auf und wurde durch rituell praktizierten Kannibalismus übertragen. Durch das Verbot des Kannibalismus in den späten 1950er Jahren nahm die Zahl der Erkrankungen stetig ab, heutzutage sind keine Fälle mehr bekannt (Mead *et al.*, 2009).

Die Traberkrankheit (*Scrapie*) ist seit Mitte des 18. Jahrhunderts bekannt und somit die erste beschriebene Prionen-Erkrankung. 1936 wurde *Scrapie* erstmals experimentell übertragen (Cuille und Chelle, 1936). Bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) wurde im November 1986 als neue *Scrapie*-ähnliche Krankheit identifiziert, die betroffenen Rinder wiesen charakteristische spongiforme Läsionen im Gehirn auf (Wells *et al.*, 1987). Die epidemieartige Ausbreitung von BSE vor allem in Großbritannien, aber auch in Frankreich und Irland erreichte ihren Höchststand 1992 (Smith und Bradley, 2003). Diese Krankheitsfälle wurden auf den Einsatz von konzentrierten Futtermitteln (Kraftfutter) zurückgeführt, dessen Hauptbestandteil Fleisch- und Knochenmehl aus der Verwertung von toten Tierkörpern und Schlachtabfällen war, die vermutlich bereits mit fehlgefalteten Prionen infiziert waren. Ein weiterer Bestandteil

des Tierfutters war Talg (tierisches Fett), welches jedoch nicht als Infektionsüberträger gilt (Wilesmith *et al.*, 1988 und 1991). *Chronic wasting disease* (CWD) wurde erstmals 1967 bei in Gefangenschaft gehaltenen Maultierhirschen einer Wildforschungseinrichtung in Colorado (USA) identifiziert. Ursprünglich wurde angenommen, dass CWD mit den durch die Gefangenschaft oder durch Mangelernährung oder Vergiftung hervorgerufenen Belastungen in Verbindung steht. Später wurde durch histologische Untersuchungen jedoch festgestellt, dass es sich bei der Krankheit ebenfalls um eine spongiforme Enzephalopathie handelt (Williams und Young, 1980)

Alle dargestellten neurodegenerativen Erkrankungen sind neben langen, symptomlosen Inkubationsperioden vor allem durch charakteristische spongiforme Veränderungen im Hirngewebe gekennzeichnet, verbunden mit Proteinablagerungen aus amyloiden Plaques und letztendlich dem Verlust von Nervenzellen (Prusiner, 1982 und 1998).

1.2. Der Erreger und die „Protein-only“-Theorie

Zunächst wurde angenommen, dass die Auslöser neurodegenerativer Erkrankungen, im Gegensatz zu Viren oder Bakterien, ausschließlich aus Proteinen bestehen und in der Lage sind, sich in Abwesenheit von Nukleinsäuren zu replizieren (Alper *et al.*, 1967; Griffith, 1967). Stanley Prusiner prägte dann in den frühen 1980er Jahren den Begriff „Prion“ (*Proteinaceous infectious only*) und beschrieb damit diese neue Klasse von infektiösen Krankheitserregern, welche die dargestellten degenerativen Hirnerkrankungen bei Menschen und Tieren verursachen (Prusiner, 1982). Nach weiteren Untersuchungen führten die Erkenntnisse von Stanley Prusiner 1982 zum Postulat der „Protein-only“-Theorie, nach der es sich bei dem Erreger um ein einzelnes wirtskodiertes, krankheitsauslösendes Protein handelt, dass sich im Krankheitsfall durch einen autokatalytischen Prozess in eine infektiöse Isoform umwandelt (Prusiner, 1998).

PrP kann folglich in mehreren stabilen Konformationen auftreten, welche in die zelluläre, nicht-pathogene Isoform PrP^C und in die fehlgefaltete infektiöse Isoform PrP^{Sc} eingeteilt werden (Colby und Prusiner, 2011). Da die Konformationsänderung des PrP^C durch bereits gebildetes PrP^{Sc} induziert wird, kann sich die pathogene Isoform des PrP selbst replizieren und sich somit im Organismus ausbreiten bzw. fremde Organismen infizieren. Die „Protein-only“-Theorie war zunächst umstritten, da einerseits angenommen wurde, dass die Existenz von mehreren stabilen Konformationen eines einzelnen Proteins ohne zusätzliche posttranslationale Modifikation nicht möglich sei, und andererseits, dass die native Struktur eines globulären Proteins eindeutig von der primären Aminosäuresequenz festgelegt wäre (Anfinsen, 1973). Auch die Replikation

eines Agens in Abwesenheit von Nukleinsäuren wurde anfangs nicht anerkannt (Kimberlin, 1982). Heute ist die „Protein-only“-Theorie allgemein akzeptiert. Hierzu trug vor allem die Demonstration bei, dass reines bakteriell hergestelltes PrP in eine selbst-replizierende, PrP^{Sc}-ähnliche Konformation rückgefaltet werden kann, mit der gesunde Mäuse infiziert werden können (Legname *et al.*, 2004).

1.3. Struktur und Funktion des Prion-Proteins

PrP ist ein im Laufe der Evolution hoch konserviertes Glykoprotein, das in einem breiten Spektrum von Organismen vorhanden ist. Bei Säugetieren erfolgt die Expression der PRNP-Gensequenz ubiquitär in hohen Konzentrationen im Zentralnervensystem (ZNS) (Spielhauer und Schätzl, 2001). Der globuläre, C-terminale Teil des PrP^C weist in Säugetieren eine sehr hohe Sequenz- und Strukturidentität auf. Die Sequenzidentität von Nicht-Säugetier-PrP^C ist sehr viel geringer im Gegensatz zur Strukturidentität, die im hohen Maße erhalten bleibt (Calvete *et al.*, 1994). Das PrP wird durch ein Exon kodiert, welches in Abhängigkeit von der Spezies eine Polypeptidkette von etwa 250 bis 260 Aminosäureresten bildet (Oesch *et al.*, 1985; Schätzl *et al.*, 1995; Wopfner *et al.*, 1999). Durch posttranslationale Modifikationen werden die N-terminale hydrophobe Signalsequenz von 22 Resten, die den Transport zum Endoplasmatischen Retikulum und zum Golgi Apparat initiiert, und die C-terminale hydrophobe GPI-Anker-Signalsequenz von etwa 23 Resten, welche die Membraninsertion vermittelt, abgespalten (Udenfriend und Kodukula, 1995; Hölscher *et al.*, 2001; Basler *et al.*, 1986; Bazan *et al.*, 1987). Das reife PrP^C (210 Aminosäuren in Säugetieren) besteht aus einem flexiblen, unstrukturierten N-Terminus und einer globulären C-terminalen Domäne mit drei α -Helices, H1 (AS 144-153), H2 (AS 172-192) und H3 (AS 200-225), sowie einem doppelsträngigen, antiparallelen β -Faltblatt, S1 (AS 129-130) und S2 (AS 162-163) (Wüthrich und Riek, 2001). Das PrP enthält eine *Octapeptid-Repeat*-Region in der flexiblen N-terminalen Domäne, eine einzelne Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren 179 und 214, sowie zwei Glykosylierungsstellen am Asparagin 180 und 196 (Turk *et al.*, 1988; Caughey *et al.*, 1989; Haraguchi *et al.*, 1989; Stahl und Prusiner, 1991). Die Primärstruktur des zellulären PrP und dessen posttranslationale Modifikationen sind in Abbildung 2 dargestellt.

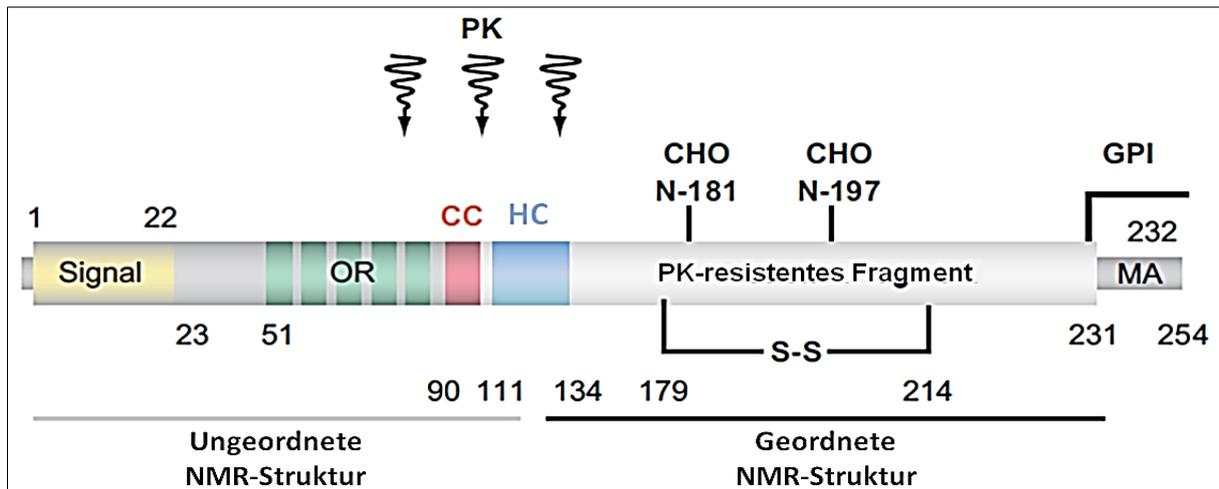


Abbildung 2: Primärstruktur des zellulären PrP mit dem sekretorischen Signalpeptid am N-Terminus. Zahlen kennzeichnen die Positionen der jeweiligen Aminosäuren. Der Proteinkinase K (PK)-resistente Kern von PrP^{Sc} ist grau dargestellt, die ungefähren Schnittstellen der PK in PrP^{Sc} sind durch Pfeile angedeutet. OR (grün), *Octapeptid-Repeat-Region*; CC (rot), geladene Cluster; HC (blau), hydrophober Kern; S-S, Disulfid-Brücke; MA, Membranankerregion; GPI, Glykosylphosphatidylinositol; CHO, fakultative Glykosylierungsstellen; NMR, kernmagnetische Resonanz (Modifiziert nach Heikenwalder *et al.*, 2007).

Bei der Isolierung von PrP^C aus Hamstern wurde eine Mischung von nicht-glykosylierten, monoglykosylierten und diglykosylierten Proteinen beobachtet. Das PrP^C enthält zahlreiche glykosylierte Varianten von mindestens 52 verschiedenen Verzweigungen N-verknüpfter Oligosaccharide (Rudd *et al.*, 1999). Am C-Terminus wird das PrP^C durch einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Zellmembran verbunden (Abbildung 3) (Stahl *et al.*, 1987; Caughey und Raymond, 1991).

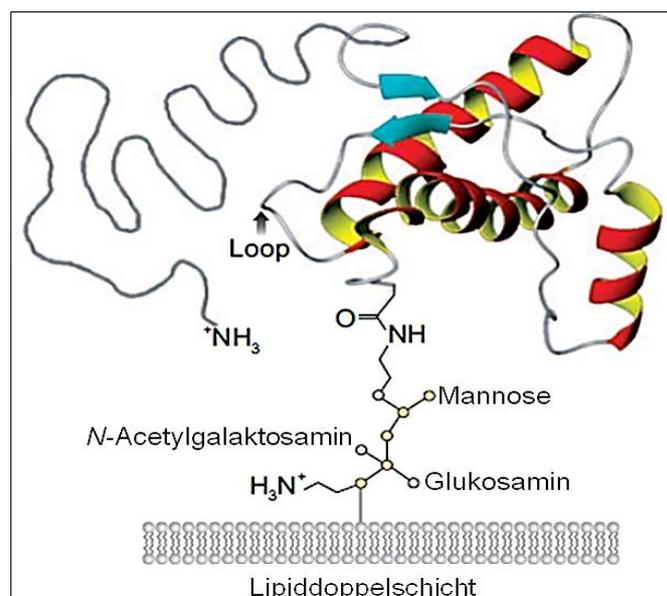


Abbildung 3: Tertiäre Struktur des zellulären PrP ohne Glykosylierungen auf der Grundlage von NMR-Strukturen: PrP^C ist über einen GPI-Anker an die Lipiddoppelschicht gebunden. Die α -Helices sind rot, die antiparallelen β -Faltblätter blau, der unstrukturierte N-Terminus grau und die Zuckerreste des GPI-Ankers als farbige Kreise dargestellt (Modifiziert nach Aguzzi *et al.*, 2008).

PrP^C und PrP^{Sc} weisen die gleiche Aminosäuresequenz auf, chemisch und physikalisch unterscheiden sie sich jedoch signifikant voneinander. Während PrP^{Sc} in Detergentien unlösliche Aggregate bildet, ist PrP^C sehr gut löslich. PrP^C bildet anscheinend ebenfalls kleine Mengen an unlöslichen Komplexen, die durch Ultrazentrifugation einer PrP^C-Lösung nachgewiesen werden konnten (Yuan *et al.*, 2006; Kucziusa *et al.*, 2011). Des Weiteren zeigt infektiöses PrP^{Sc} gegenüber Proteinase K eine erhöhte Resistenz, während die zelluläre Form rasch abgebaut wird (Prusiner, 1998; Horiuchi und Caughey, 1999). Der deutliche strukturelle Unterschied wurde mittels spektroskopischer Methoden wie der Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie identifiziert. Während PrP^C von α -helikalen Sekundärstrukturelementen dominiert wird und nur ein sehr kurzes β -Faltblatt-Motiv aufweist, sind beim PrP^{Sc} größere Mengen an β -Faltblättern und weniger α -Helices detektierbar (Riesner, 2003).

PrP^C wurde isoliert, gereinigt und charakterisiert, ohne genaue Kenntnisse über die physiologische Rolle zu haben. In einer Vielzahl von Berichten wurde PrP^C mit manchmal scheinbar widersprüchlichen Funktionen in Verbindung gebracht. *In-vivo*- und *in-vitro*-Studien zeigten, dass PrP^C Kupfer bindet (Brown und Besinger, 1998; Brown *et al.*, 1997). Außerdem wurde festgestellt, dass das PRNP-Gen überwiegend in Neuronen des Gehirns und des peripheren Nervensystems sowie in der Plazenta exprimiert wird (Hay *et al.*, 1987; Alfaidy *et al.*, 2013).

Es wurden transgene Mäuse mit einem PrP-*Knockout* generiert, diese waren vollständig lebensfähig und zeigten augenscheinlich ein normales Verhalten, was grundlegend auf eine nicht-essentielle Rolle des PrP schließen lässt. Diese Mäuse waren gegen eine Infektion mit Prionen resistent, da sie kein PrP^C zur Umwandlung in PrP^{Sc} besaßen (Büeler *et al.*, 1992; Büeler *et al.*, 1993). Auch wenn die *Knockout*-Mäuse keine auffälligen Defizite aufwiesen, zeigten sie dennoch eine verwirrende Vielfalt an Anomalien wie ein veränderter zirkadianer Rhythmus und Geruchssinn, Unregelmäßigkeiten in der neuronalen Übertragung und der elektrischen Aktivität, defekte Proliferation und Differenzierung der neuralen Vorläuferzellen und der hämatopoetischen Stammzellen, erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Hypoxie, Ischämie und Krampfanfällen sowie eine erhöhte Resistenz gegen mikrobielle Infektionen (Tobler *et al.*, 1996; Fischer *et al.*, 1996; Collinge *et al.*, 1994; Nishida *et al.*, 1997; Watarai *et al.*, 2003; Maglio *et al.*, 2004; Spudich *et al.*, 2005; Steele *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Le Pichon *et al.*, 2009). Keine dieser Anomalien lieferte einen konstruktiven Anhaltspunkt für die physiologische Funktion des zellulären PrP. PrP^C wurden gleichwohl verschiedene Rollen bei der Antwort auf oxidativen Stress, Signaltransduktion, Zelladhäsion, Neuroprotektion, zellulären Homöostase, synaptischen Funktion, T-Zell-Regulation, Immunsystemfunktion,

Embryogenese, Zellproliferation und Differenzierung von gewebespezifischen Stammzellen zugeschrieben (Collinge *et al.*, 1994; Nico *et al.*, 2005; Linden *et al.*, 2008; Zomosa-Signoret *et al.*, 2008; Martins *et al.*, 2009; Haigh *et al.*, 2010; Resenberger *et al.*, 2011; Schneider *et al.*, 2011; Lopes und Santos, 2012). Außerdem wurde eine Beteiligung von PrP^C an der Modulation der Phagozytose und Autophagozytose beschrieben sowie aufgrund seiner Lokalisierung auch eine Funktion als Membranrezeptor, Adhäsionsmolekül oder Transporter postuliert (de Almeida *et al.*, 2005; Oh *et al.*, 2008; Chiesa und Harris, 2009). Dem PrP werden jedoch immer häufiger auch Schutzfunktionen zugesprochen, da in den Knockout-Mäusen eine erhöhte Schädigung durch Oxidation erkennbar war. Auch die Ergebnisse einer Vielzahl verschiedener Zellkulturstudien ließen darauf schließen, dass PrP^C die Fähigkeit zum Schutz gegen verschiedene Arten von Zellstress, einschließlich einer hohen Sensitivität gegenüber der Toxizität von Kupfer und einer erhöhten Anfälligkeit der Neuronen für oxidative Schädigung, die normalerweise den Zelltod induziert, besitzt (Brown *et al.*, 1998; Brown, 2000; Nishimura *et al.*, 2004; Westergard *et al.*, 2007). Somit könnte das PrP als schützendes endogenes Antioxidans fungieren, welches reaktive Sauerstoffspezies (ROS) abfängt, um die DNA und andere Proteine vor Schädigung zu bewahren (Requena *et al.*, 2004; Younan *et al.*, 2012).

Die genaue biologische Rolle von PrP^C bleibt schwer definierbar, da es scheinbar mit einer Vielzahl von Interaktionspartnern mit deutlichen Unterschieden je nach Zelltyp und/oder physiologischen Zustand interagiert. Diese verschiedenen zellulären Proteine sind beispielsweise Transmembranrezeptoren, Metallionentransporter, Signalmoleküle, sowie Zytoskelett-assoziierte Proteine. Die Vielfalt an Interaktionspartnern lässt vermuten, dass PrP^C eine Schlüsselkomponente in einem vielseitigen Signalkomplex der Gerüstproteine ist und die Aktivierung von verschiedenen biologischen Signalwegen ermöglicht.

1.4. Aggregation des Prion-Proteins

Durch die Theorie der freien Radikale wird die Schädigung von DNA, RNA, Lipiden und Proteinen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) erklärt. ROS werden im Körper durch eine Vielzahl von Enzymen erzeugt und als Nebenprodukt der Zellatmung gebildet (McLennan und Degli, 2000). Die Menge der durch oxidativen Stress geschädigten Makromoleküle erhöht sich mit dem Alter (Mendoza-Nunez *et al.*, 2007). Altern wird allgemein als ein erhöhtes Risiko für Erkrankungen und dem „Tod auf Zeit“ angesehen (Hayflick, 2007). Die durch ROS beschädigten Moleküle können durch das Versagen von Reparatur- und Abbausystemen akkumulieren und die zellulären Systeme beeinträchtigen (Kirkwood, 2005). ROS oxidieren vor allem Seitenketten von Aminosäureresten sowie das Proteinerückgrat und erzeugen Protein-

Protein-Quervernetzungen. Es werden vor allem Methionin, Histidin und Cystein durch die Oxidation beeinflusst, da diese Aminosäurereste am empfindlichsten gegenüber ROS sind (Redecke *et al.*, 2009). Die Methionin-Reste werden zum Beispiel zu Methioninsulfoxid (MeSOX) und Cystein-Reste zu Disulfiden umgewandelt. Vor allem durch die Oxidation der Methionin- und Histidin-Seitenketten konnte eine Destabilisierung der PrP^C-Struktur und eine damit verbundene Induktion der Konformationsänderung nachgewiesen werden (Baskakov und Breydo, 2007; Colombo *et al.*, 2009; Requena *et al.*, 2001; Redecke *et al.*, 2006). Nur die Oxidation von Methionin und Cystein kann durch körpereigene Schutzsysteme erkannt und repariert werden. Durch MeSOX-Reduktasen und Disulfidreduktasen werden die Aminosäuren entweder in ihre ursprüngliche Form reduziert oder aber das Protein mit den oxidierten Aminosäureresten wird vollständig abgebaut. Im Gegensatz dazu ist eine Reduktion von oxidierten aromatischen Aminosäureresten oder von 2-Oxo-Histidin nicht möglich. Außerdem weisen die körpereigenen Schutzmechanismen nur begrenzte Kapazitäten auf, die mit zunehmendem Alter ausgelastet bzw. überlastet sind, da die Erhöhung der oxidativen Schädigung mit dem steigenden Alter korreliert. Die Zunahme an oxidativ-modifizierten Proteinen kann zur Akkumulation von Proteinaggregaten führen. Daher werden oxidativer Stress und die daraus resultierenden Protein-Modifikationen mittlerweile mit den neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert, die durch aggregierte Proteinablagerungen charakterisiert sind (Stadtman, 1992; Berlett und Stadtman, 1997; Kirkwood, 2005).

Ein direkter Zusammenhang von Prionen-Erkrankungen und somit der Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} mit oxidativem Stress wurde bereits in verschiedenen Studien *in vitro* untersucht (Milhavet und Lehmann, 2002). Dabei wurde oxidativer Stress simuliert, indem PrP^C mit Hilfe von Wasserstoffperoxid, Metallkatalyse oder UV-Strahlung oxidiert wurde (Requena *et al.*, 2001 und 2004; Redecke *et al.*, 2006; Thakur und Rao, 2008; Redecke *et al.*, 2009).

Die in Säugern hoch konservierten N-terminalen *Octarepeat*-Regionen (AS 51-91) des PrP^C beinhalten vier Histidin-Reste, an denen Übergangsmetallionen binden können (Abbildung 4) (Sulkowski, 1992). Neben einer hohen Affinität zu Cu(II), durch die eine funktionelle Rolle des PrP im Cu(II) Stoffwechsel postuliert wurde, konnte aber auch eine schwächere Bindung von anderen zweiwertigen Kationen wie Zn(II), Fe(II), Ni(II) und Mn(II) nachgewiesen werden (Viles *et al.*, 1999; Burns *et al.*, 2002; Millhauser, 2004; Choi *et al.*, 2006). Außerhalb der *Octarepeat*-Regionen befinden sich zwei weitere Histidin-Reste (AS 96 und 111), die als Kupferbindungsstellen fungieren (Burns *et al.*, 2003). Pushie *et al.* schlug 2009 einen zweistufigen Mechanismus für die Rolle des Kupfers bei der sporadischen Prionen-Pathogenese durch oxidative Schädigung vor. Im ersten Schritt kommt es zu einer β -Spaltung der

N-terminalen Domäne des PrP, wodurch sich die Konformation des Proteins ändert und die Aminosäurereste His96 und His111 zugänglich werden. Kupfer bindet im zweiten Schritt an die Histidin-Reste 96/111, wodurch eine lokale β -Faltblattstruktur induziert werden kann, die ausreicht, um die weitere Fehlfaltung in der strukturierten C-terminalen Domäne einzuleiten. Des Weiteren wurde festgestellt, dass das verkürzte Protein (AS 92-230) infektiös und damit der N-Terminus mit der *Octarepeat*-Region nicht essentiell für PrP^{Sc} ist (Burns *et al.*, 2003).

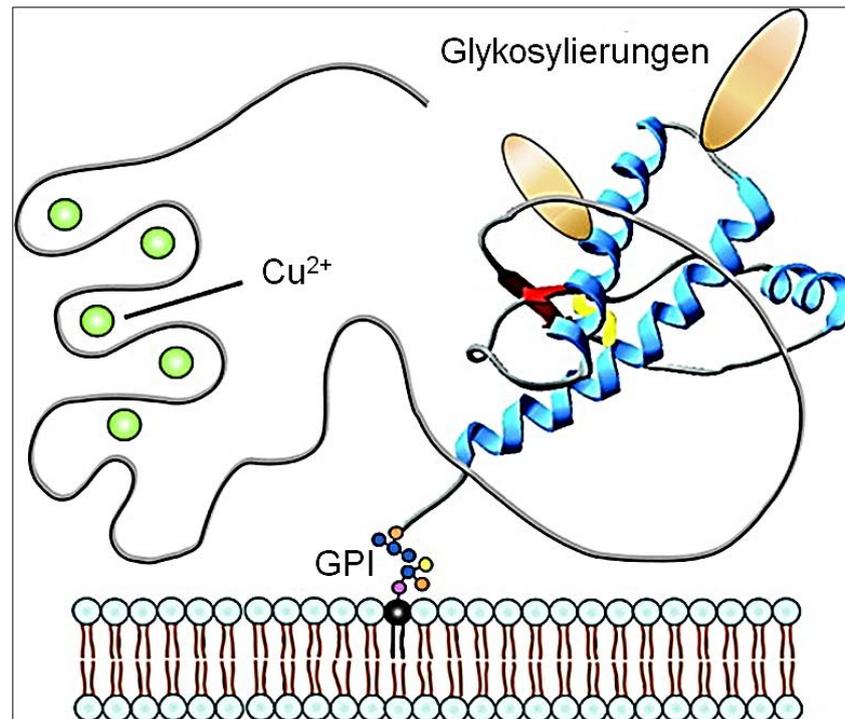


Abbildung 4: Tertiäre Struktur des zellulären PrP mit den Glykostrukturen (beige) und dem an die Lipiddoppelschicht gebundenen GPI-Anker. Die α -Helices sind blau, die antiparallelen β -Faltblätter rot, die Disulfidbrücke gelb, die unstrukturierte N-terminale Domäne grau mit den gebundenen Kupferionen grün und die Zuckerreste des GPI-Ankers als farbige kleine Kreise dargestellt (Modifiziert nach Cobb und Surewicz, 2009).

Oxidativer Stress kann ebenfalls durch UV-Bestrahlung induziert werden. Es ist schon länger bekannt, dass UV-Strahlung Krankheiten wie Hautkrebs hervorrufen kann. Dabei werden die zellulären Schädigungen durch Strahlung von der Sonne im UVA- (315-380 nm) und UVB-Bereich (280-315 nm), die die Erdatmosphäre durchdringt und bis zur Erdoberfläche gelangt, ausgelöst (Marrot und Meunier, 2008). Das PrP wird durch die UV-Bestrahlung direkt und indirekt oxidativ geschädigt. Die direkte Schädigung erfolgt indem bei der Absorption des einfallenden Lichtes ein Photon Energie auf entsprechende aromatische Aminosäureketten wie Tryptophan und Tyrosin überträgt und dadurch die Ausbildung von radikalischen Strukturen initiiert. Durch die Generierung von ROS während der UV-Bestrahlung durch die Anwesenheit von Sauerstoff wird das PrP indirekt oxidativ beeinträchtigt. Die generierten ROS verursachen

dann wiederum oxidative Modifikationen im PrP vor allem an den empfindlichen Aminosäureresten Methionin, Histidin und Cystein (Thakur und Rao, 2008; Redecke *et al.*, 2009).

Die verschiedenen Methoden der Oxidation des PrP resultieren alle in einer vergleichbaren Destabilisierung der PrP^C-Struktur und einer damit verbundenen Konformationsänderung zur thermodynamisch stabileren PrP^{Sc}-Isoform, welche zunächst in Form von höheren löslichen oligomeren Strukturen auftreten, die sich weiter zu hochmolekularen Aggregaten zusammenlagern (Baskakov *et al.*, 2001).

1.5. Therapie von Prionen-Erkrankungen

Aufgrund des Fehlens erfolgreicher Behandlung oder Heilung durch therapeutische oder prophylaktische Therapien verlaufen Prionen-Erkrankungen derzeit in der Regel immer tödlich. Da die Krankheit nicht durch Bakterien oder Viren sondern durch die Fehlfaltung des PrP selbst ausgelöst wird, helfen weder Antibiotika noch Virostatika. Strategien zur Entwicklung von Therapien beruhen einerseits auf einer Stabilisierung des zellulären PrP durch chemische Chaperone (Cortez und Sim, 2014). Andererseits wird versucht die Bildung von fehlgefaltetem PrP zu verlangsamen beziehungsweise die PrP-Umwandlung durch den Einsatz von Verbindungen, die die Interaktion von PrP^C mit PrP^{Sc} inhibieren, komplett zu hemmen (Caughey und Race, 1992; Caughey und Raymond, 1993; Priola *et al.*, 2000). Es sind jedoch ebenso wenige Details über den Mechanismus der Konformationsänderung bekannt wie über die detaillierte dreidimensionale Struktur des PrP^{Sc}, was die Fortschritte auf diesem Gebiet stark behindert (Caughey *et al.*, 2009). Durch das Screening in verschiedenen Zellkulturmodellen, die PrP^{Sc} akkumulieren und chronisch verbreiten, wurde eine Reihe von Verbindungen mit Anti-Akkumulations-Eigenschaften identifiziert (Vilette, 2008). Dazu gehört unter anderem der Azofarbstoff Kongorot, das sulfatierte Glykan Dextransulfat, die verzweigten Polyamine Polyamidoamin, Polypropylenimin und Polyethylenimin, kationische Lipopolyamine, das lysosomotrope Amin Chlorpromazin, Cysteinproteaseinhibitoren, die Tetrapyrrol-Moleküle Phthalocyanine und Porphyrine, sowie synthetische PrP-Peptidfragmente (Chabry *et al.*, 1998; Chabry *et al.*, 1999 Winklhofer und Tatzelt, 2000; Doh-ura *et al.*, 2000; Trevitt und Collinge, 2006). Außerdem konnten zuweilen die niedermolekularen Verbindungen cpd-B, Anle-138b, 2-Aminothiazol, Pentosanpolysulfat (PPS), Quinacrin, Thioflavin, Amphotericin B und Tetracyclin in Hamster- bzw. Mausmodellen und sogar bei an CJD-erkrankten Menschen zur Verlängerung der Inkubationszeit der Krankheit bzw. teilweise in Zellkultur sogar zur Hemmung der PrP^{Sc}-Bildung führen (Pocchiari *et al.*, 1987; Xi *et al.*, 1992; Demaimay *et al.*,

1997; Doh-ura., 2003; Doh-ura *et al.*, 2004; Kawasaki *et al.*, 2007; Klajnert *et al.*, 2007; Larramendy-Gozaló *et al.*, 2007; De Luigi *et al.*, 2008; Tsuboi *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2013; Wagner *et al.*, 2013; Berry *et al.*, 2013). Es zeigte sich jedoch, dass die Wirksamkeit dieser Verbindungen hoch stammspezifisch ist und dass möglicherweise zukünftige Behandlungen von Prionen-Krankheiten eine Kombination von mehreren Wirkstoffen erfordert (Klingenstein *et al.*, 2006; Sarkar und Rubinsztein, 2008; Berry *et al.*, 2013). Die inhibierend-wirkenden Verbindungen konnten die Lebensdauer bei einer Prionen-Erkrankung nachgewiesenermaßen verlängern, jedoch weder den Krankheitsverlauf abwenden noch die Krankheit heilen. Dass in den meisten Fällen die Effekte sehr begrenzt waren, deutet darauf hin, dass der komplexe biologische Vorgang der Prionen-Bildung in Organismen schwer zu stoppen oder zu verzögern ist (Vilette, 2008). Ein weiterer Ansatz ist die Verringerung der PRNP-Expression durch die Regulation von Transkriptionsfaktoren beziehungsweise des Proteintransports zur Plasmamembran, um das verfügbare PrP^C für die Umwandlung zu reduzieren (Gilch *et al.*, 2001; Tilly *et al.*, 2003; Bellingham *et al.*, 2009). Es wird beispielsweise versucht die Phosphorylierung von eIF2 α mit bestimmten Inhibitoren zu verringern, um die Proteintranslation herabzusetzen, welche zur Toxizität der Prionen beiträgt (Moreno *et al.*, 2012). Auch die Blockierung des LRP/LR Lamininrezeptors besitzt eine wichtige Funktion in der Zelladhäsion, Apoptose, Virusbindung und Prion-Bindung. *In-vitro*-Experimente zeigen, dass die Blockierung des LRP/LR-Rezeptors die Prionen-Infektiosität reduziert (Vana *et al.*, 2009; Pflanz *et al.*, 2009). Die Gabe eines Mittels, das eine ähnliche Wirkung wie die Superoxid-Dismutase (SOD) aufweist, welche als Radikalfänger fungiert, hatte ebenfalls eine verlängerte Lebensdauer von mit *Scrapie* infizierten Tieren zur Folge (Brazier *et al.*, 2008). Diese Beobachtung verdeutlicht wiederum, dass die Prionen-Erkrankungen im engen Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen.

Trotz teilweise ermutigender Ergebnisse müssen bei der wahrscheinlich multifaktoriellen Prionen-Pathogenese viele Faktoren berücksichtigt werden, die zur Toxizität beitragen (Aguzzi und Falsig, 2012). So sollten auch therapeutische Strategien wie die Stimulierung von zellulären Abbauwegen zur Verringerung der Menge an PrP^{Sc} miteinbezogen werden (Goold *et al.*, 2014). Es gibt gute experimentelle Studien *in vitro* und *in vivo* in Zellkultur, die das Potential von bestimmten Wirkstoffen zur Inhibition bzw. Verlangsamung der PrP-Umwandlung/Aggregation zeigten, diese wurden jedoch noch nicht oder nur teilweise in Tierversuchen getestet. Die therapeutische Wirksamkeit ist dabei abhängig von der Fähigkeit der Inhibitoren die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, um ins Parenchym des Gehirns zu gelangen, wo sich der größte Teil des PrP^{Sc} ansammelt und die Pathogenese der TSEs auftritt.

Trotz der vielen verschiedenen Ansätze gibt es bis heute noch keine wirksame Behandlung für Prionen-Erkrankungen.

1.6. Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Die Methode der dynamischen Lichtstreuung wird auch als quasielastische Lichtstreuung (QELS) oder Photonen-Korrelations-Spektroskopie (PCS) bezeichnet und wird zur Bestimmung der Größe von Partikeln in Lösung verwendet (Goldburg 1999). Dabei wird mit einem monochromatischen Lichtstrahl, etwa einem Laserstrahl, eine Lösung mit Teilchen in Brownscher Molekularbewegung bestrahlt (Berne und Pecora, 1976; Goodman, 1976; Pecora, 1985). Trifft das Licht auf das in thermischer Wechselwirkung bewegte Teilchen, so ändert sich die Intensität des gestreuten Lichts in Abhängigkeit von der Größe des Teilchens (Berne und Pecora, 1976). Die durch das Molekül verursachte Streuung des Lichts wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet (Young, 1981). Die Streuintensität ist Äquivalent zu der Photonenzahl (Anzahl der Photonen pro Zeiteinheit in kHz). Diese auch als Zählrate beschriebene Signalstärke der DLS-Messungen ist direkt von der Partikelgröße in Lösung abhängig. Je größer die Moleküle, umso intensiver ist das zugehörige Streusignal. Die Anzahl der detektierten Photonen wird normalerweise pro Sekunde angegeben. Dies hilft bei der Bestimmung der Probenqualität durch Überwachen der Stabilität als eine Funktion der Zeit und wird zur Einstellung der Geräteparameter verwendet. Aus der gemessenen Diffusionsgeschwindigkeit der Moleküle in Lösung wird mit Hilfe einer entsprechenden Software der Diffusionskoeffizient der Teilchen bestimmt, die Kugelgrößenverteilung berechnet und die Bewegung des Teilchens im Medium unter Verwendung einer Autokorrelationsfunktion beschrieben. Mit dem Diffusionskoeffizient D kann der hydrodynamische Radius R_H mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung (Formel 1) berechnet werden.

$$R_H = \frac{k T}{6 \pi \eta D}$$

Formel 1: Berechnung des hydrodynamischen Radius R_H [m]: D = Diffusionskoeffizienten [m^2/s], k = Boltzmann-Konstante [J/K], T = Temperatur [K], η = Viskosität [Ns/m^2]

DLS-Geräte arbeiten meist bei einem festen Winkel (90°) und rotem Licht (675 nm). In der Strukturbiologie werden sie zur Bestimmung der Verteilung der hydrodynamischen Radien von Molekülen und der Dispersität einer Lösung angewendet. Durch die hydrodynamischen Radien kann die molekulare Masse und der Aggregationszustand der Moleküle abgeschätzt werden.

Durch dieses Verfahren ist es möglich, die Aggregation von Molekülen vom Monomer zum Dimer, Trimer, Tetramer bis hin zu Oligomeren und höheren Aggregaten zu verfolgen. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass ein zehnmal größeres Teilchen eine Million Mal mehr Licht streut, wodurch kleine Teilchen völlig überstrahlt werden können. Daher kann das starke Streulicht der großen Partikel die Detektion von kleineren Partikeln stören, auch wenn diese gegebenenfalls in höherer Konzentration vorliegen. DLS-Messungen können auch im Fluss durchgeführt werden, dies wurde bereits mit Polystyrol-Latexpartikeln und einer modifizierte Autokorrelationsfunktion gezeigt (Chowdhury *et al.*, 1984). Sowohl die Größe als auch die Geschwindigkeit der Partikel konnte mit einer besseren Genauigkeit bestimmt werden als bei den herkömmlichen DLS-Datenanalyseverfahren (Leung *et al.*, 2006). Nach unserem heutigen Kenntnisstand wurden jedoch noch keine DLS-Messungen mit Proteinen im Fluss gezeigt.

2. Zielsetzung der Doktorarbeit

Der Umwandlungsmechanismus des PrP ist trotz intensiver Forschung bisher weitgehend unbekannt. Doch ohne detaillierte Kenntnisse über den Verlauf der Umwandlung des PrP^C in PrP^{Sc} ist die gezielte Inhibition des Prozesses und somit die Entwicklung einer Strategie zur Therapie der Prionen-Erkrankungen schwierig.

Daher soll im Rahmen dieser Arbeit die oxidativ-induzierte PrP-Umwandlung untersucht und die möglichen Intermediate auf dem Aggregationsweg identifiziert werden.

Der Aggregationsprozess soll mittels eines etablierten UV-Bestrahlungssystems induziert und online mit Hilfe von DLS-Technik im Fluss analysiert werden. Zunächst muss jedoch das vorhandene Bestrahlungssystem durch die Implementierung der DLS-Technik optimiert und mit Modellproteinen etabliert werden. Außerdem sollen die genomischen Fragmente der humanen PrP-Konstrukte (90-230, 90-230+EFEA, 121-230, 121-230+EFEA) sowie des murinen PrP (89-231) mit einer TEV-Protease-Schnittstelle versehen, in den Expressionsvektor pRSET A kloniert, die rekombinante Herstellung der Proteine optimiert und nach etablierten Methoden die Proteine gereinigt und rückgefaltet werden, bevor das UV-System zur PrP-Umwandlung angewendet wird. Durch die Änderung von Parametern bei der UV-Bestrahlung soll der Einfluss dieser auf die PrP-Umwandlung untersucht werden. Die möglichen stabilen Intermediate und Endprodukte sollen isoliert und in Lösung mittels CD-Spektroskopie, DLS-Technik und SAXS-Messungen charakterisiert werden, um Veränderungen des Faltungszustandes, den Grad der Aggregation und die mögliche Struktur zu detektieren. Des Weiteren sollen massenspektrometrischen Analysen zur Ermittlung des Oxidationszustandes des PrP durchgeführt werden.

Außerdem soll die mögliche Inhibition des Umwandlungsprozesses von PrP durch Peptide untersucht werden. Dazu sollen ausgewählte Peptide von PrP-Bindungspartnern durch die Anwendung der metallkatalysierten oxidativen PrP-Umwandlung getestet und bei inhibierend-wirkenden Peptiden die Bindung an das PrP charakterisiert werden.

Die erhaltenen Erkenntnisse der UV-induzierten PrP-Umwandlung sollen neue Details zum Umwandlungsmechanismus und der dabei gebildeten Intermediate liefern. Die identifizierten Peptidinhibitoren könnten als Basis für die Entwicklung von neuartigen Inhibitoren der Prionen-Erkrankungen dienen.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die humanen Prion-Proteine (hPrP) 90-230 und 121-230 sowie das murine Prion-Protein (mPrP) 89-231 untersucht. Das hPrP90-230 bzw. mPrP89-231 hat ein Molekulargewicht von 16 kDa und besteht aus dem gefalteten C-Terminus sowie einem Teil (AS 90-124) des ungefalteten N-Terminus des Prion-Proteins (PrP), wohingegen hPrP121-230 vorwiegend den gefalteten C-Terminus des PrP mit einem Molekulargewicht von 13 kDa darstellt.

Natives PrP ist durch einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Membranoberfläche der Zellen verbunden, dieses Glykolipid wird posttranslational an den C-Terminus des Proteins angefügt. Glykosylphosphatidylinositol besitzt eine amphipathische Struktur und verankert das Protein in der äußeren Schicht der Zellmembran. Der C-Terminus des PrP ist durch eine Phosphodiesterbindung zwischen dem Protein und Phosphoethanolamin an ein Kohlenhydratgerüst aus drei Mannose-Resten und einem N-Acetylglukosamin gebunden, welches wiederum glykosidisch mit Inositol verbunden ist (Abbildung 5). Die Phosphatidylinositol-Gruppe ist aufgrund des Phosphat-Restes insgesamt negativ geladen. Die Verankerung des Proteins in die Zellmembran erfolgt über zwei Fettsäure-Reste an der Phosphatidylinositol-Gruppe. Der GPI-Anker besteht folglich aus einem lipophilen und einem hydrophilen Anteil.

Um eventuelle strukturelle und funktionelle Auswirkungen des nativen C-terminalen GPI-Ankers auf das PrP ansatzweise zu untersuchen, wurden zusätzlich zu den humanen Konstrukten mit Wildtyp-Sequenz (hPrP90-230 und hPrP121-230) entsprechende Konstrukte hergestellt, die am C-Terminus zusätzlich die vier Aminosäurereste Glutamat (E), Phenylalanin (F), Glutamat (E) und Alanin (A) aufweisen. Durch die negative Ladung und den hydrophilen Charakter dieses EFEA-Anhangs sollten die grundlegenden Eigenschaften des GPI-Ankers direkt am C-terminalen Ende des hPrP nachgeahmt werden.

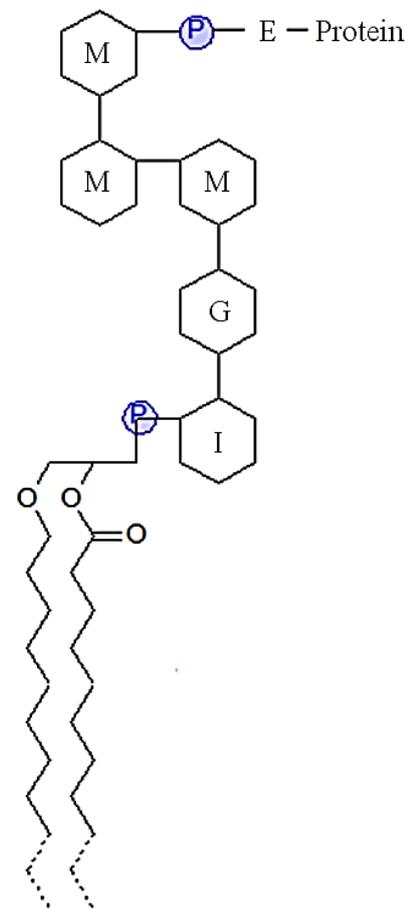


Abbildung 5: Darstellung des Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers mit den Mannose-Resten (M), N-Acetylglukosamin (G), Inositol (I), Phosphat-Resten (P) und den Fettsäure-Resten (Modifiziert nach Christie, 2014).

3.1. Klonierung der Prion-Protein-Konstrukte

Die Plasmide für die Genexpression der zuvor beschriebenen PrP-Konstrukte waren in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden. Allerdings beinhalteten alle eine Faktor Xa-Protease-Schnittstelle zwischen der spezifischen Gensequenz und der N-terminalen Hexahistidinsequenz des verwendeten pRSET A-Vektors. Da jedoch wiederholt Probleme bei der Restriktion mit der Faktor Xa-Protease auftraten und die Effizienz der Abspaltung generell nur sehr gering war, wurde die Nukleotidsequenz der Faktor Xa-Schnittstelle zunächst gegen die einer TEV-Protease-Schnittstelle ausgetauscht. So sollte eine effizientere Abspaltung der Hexahistidinsequenz nach der Proteinreinigung ermöglicht werden.

Für die entsprechenden Klonierungen wurden die drei Wildtyp PrP-Konstrukte sowie die beiden humanen PrP-Konstrukte mit C-terminalem EFEA-Anhang verwendet. Über spezifische Oligonukleotide wurden alle Gensequenzen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den Sequenzen für die N-terminale TEV-Protease-Schnittstelle sowie für die Schnittstellen der Endonukleasen *Bam*HI (5'-Ende) und *Eco*RI (3'-Ende) versehen. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, gereinigt und in den ebenso geschnittenen bakteriellen Expressionsvektor pRSET A ligiert, welcher bereits eine Hexahistidinsequenz am N-Terminus der Zielproteine zur späteren Reinigung kodiert.

Auf die gleiche Weise wurden die drei Wildtyp PrP-Konstrukte in die Vektoren pFastBac 1 und pFastBac HT B zur rekombinanten Genexpression in Insektenzellen mit Hilfe des Bac-to-Bac-Expressionssystems (InvitrogenTM) kloniert. Hierzu wurden die Oligonukleotide für die PCR jedoch mit einem 5'-Startcodon anstelle der Sequenz für die TEV-Protease-Schnittstelle versehen, da der pFastBac HT B-Vektor neben einer N-terminalen Hexahistidinsequenz zur Reinigung der Proteine bereits die Erkennungssequenz für die TEV-Protease zur Abspaltung des *His-Tags* kodiert. Durch Genexpression der pFastBac 1-Konstrukte sollten die entsprechenden Proteine hingegen mit einem nativen N-Terminus ohne zusätzlichen Anhang erhalten werden.

Die ligierte Plasmid-DNA wurde in den Bakterienstamm *E.coli* DH5 α oder XL10 Gold eingeschleust. Die Transformanten wurden über Nacht in LB-Medium kultiviert und anschließend die amplifizierte Plasmid-DNA isoliert. Um den Erfolg der Klonierung zu überprüfen wurde eine Testrestriktion mit den Endonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI durchgeführt und diese zur Größenauftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Größe der geschnittenen, im Agarose-Gel detektierbaren DNA-Fragmente (Plasmide, Gensequenz) zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung der PrP-Konstrukte

Probe	Größe des geschnittenen DNA-Fragments [bp]
pRSET A	2 863
hPrP90-230 aus pRSET A	456
hPrP90-230+EFEA aus pRSET A	468
hPrP121-230 aus pRSET A	363
hPrP121-230+EFEA aus pRSET A	375
mPrP89-231 aus pRSET A	462
pFastBac 1	4 753
pFastBac HT B	4 850
hPrP90-230 aus pFastBac 1/HT B	438
hPrP121-230 aus pFastBac 1/HT B	345
mPrP89-231 aus pFastBac 1/HT B	444

Die Vektoren, die ein DNA-Fragment in der erwarteten Größe enthielten, wurden sequenziert, um eventuelle Mutationen in der Gensequenz ausschließen zu können. Dadurch wurde verifiziert, dass alle PrP-Konstrukte erfolgreich in die entsprechenden Vektoren kloniert wurden und für die weiteren Experimente verwendet werden konnten.

3.2. Optimierung der Prion-Protein-Herstellung

3.2.1. Rekombinante Genexpression in *E. coli*

Für die rekombinante Genexpression wurde zunächst der Bakterienstamm *E. coli* BL21(DE3)pLys S verwendet. Die kompetenten Zellen wurden mit dem pRSET A-Vektor, der die jeweilige Gensequenz beinhaltet, transformiert und über Nacht auf einer LB-Agarplatte mit den entsprechenden Antibiotika bei 37 °C inkubiert. Die Genexpression wurde wie in Abschnitt 5.2.1.14. beschrieben zunächst nach dem bereits im Labor etablierten Protokoll für vier Stunden bei 37 °C durchgeführt, die Zellen pelletiert und anschließend bei -20 °C gelagert. Zur Kontrolle der Expression wurde ein Expressionsprofil mittels SDS-PAGE erstellt.

Da die *E. coli*-Zellen während der Expression allerdings regelmäßig abstarben, wurde zunächst die Zusammensetzung des Mediums optimiert. Anstelle des Fermentationsmediums wurde sowohl LB-Medium als auch 2 x YT-Medium getestet. Außerdem wurde die Glukosekonzentration variiert und anstelle von Magnesiumsulfat- und Calciumchlorid-Lösung wurde dem Medium Ammoniumsulfat zugesetzt. Der weitere Verlauf des Expressionsprotokolls blieb zunächst unverändert. Da die Optimierung des Mediums jedoch zu keinem besseren Ergebnis

fürte, wurde zusätzlich der für die Genexpression verwendete *E. coli*-Stamm variiert, um gleichzeitig auch die Ausbeuten an Protein zu optimieren.

Der *E. coli*-Stamm BL21-AI ist für die Herstellung rekombinanter Proteine im großen Maßstab aus jedem T7-basierten Expressionsvektor geeignet. Die Konzentration der T7-RNA-Polymerase wird im Stamm BL21-AI streng reguliert. Dadurch können Gene exprimiert werden, die für andere BL21-Stämme, bei denen eine basale Expression der T7-RNA-Polymerase auftritt, toxisch wirken. Nach Einschleusung der pRSET A-Vektoren mit der zu exprimierenden Gensequenz in die kompetenten BL21-AI-Zellen resultierte das nachfolgend dargestellte Protokoll zur Genexpression in deutlich gesteigerten Proteinausbeuten. Mit einer einzelnen Kolonie der erhaltenen Transformanden wurde eine 200 mL Vorkultur bei 37 °C für etwa acht Stunden kultiviert und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Kultivierung für die Genexpression erfolgte bei 37 °C in 950 mL 2 x YT-Medium zunächst in Gegenwart von Glukose. Bei einer Zelldichte (OD_{600}) von 1,6 bis 1,8 wurde Arabinose zur Induktion hinzugegeben. Vier Stunden nach der Induktion wurde nochmals die optische Dichte der Zellsuspension bestimmt und die Zellen geerntet. Das Pellet wurde bei -20 °C gelagert und das Expressionsprofil erstellt, wie beispielhaft für die Konstrukte hPrP90-230+EFEA, hPrP121-230+EFEA und mPrP89-231 in Abbildung 6 gezeigt. Durch Anwendung des im Rahmen dieser Arbeit optimierten Genexpressionsprotokolls konnten die jeweiligen Proteinausbeuten generell um ein zehnfaches auf 60-100 mg/L Medium gesteigert werden.

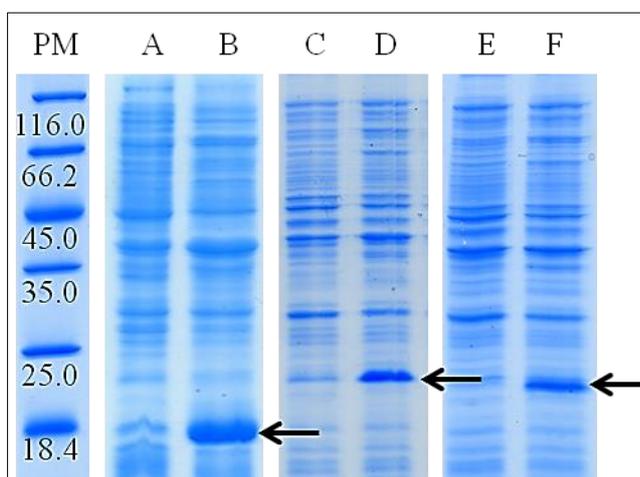


Abbildung 6: Expressionsprofil (15 % SDS-PAGE, Coomassie-Färbung) der in *E. coli* BL21-AI-Zellen rekombinant hergestellten PrP-Konstrukte hPrP121-230+EFEA (A, B), hPrP90-230+EFEA (C, D) sowie mPrP89-231 (E, F). Aufgetragen wurden zugehörige Proben jeweils vor (A, C, E) und vier Stunden nach der Induktion (B, D, F). Das Molekulargewicht des Proteinmarkers (PM) ist in kDa angegeben. Die Pfeile kennzeichnen die Proteinbanden der jeweiligen PrP-Konstrukte.

3.2.2. Rückfaltung, Reinigung und Entfernung der Hexahistidinsequenz

Nachdem die rekombinante Genexpression erfolgreich optimiert, die Proteinausbeuten stark erhöht und das Absterben der Bakterienzellen während der Expression minimiert werden

konnte, wurde der Zellaufschluss und die Rückfaltung des PrP nach dem bereits im Labor etablierten Protokoll durchgeführt.

Nach Zellaufschluss mittels Sonifizierung und Lösung des ungefalteten PrP in Guanidinium-Hydrochlorid-haltigem Puffer erfolgte die Reinigung durch Bindung der N-terminalen Hexahistidinsequenz an Ni-NTA-Agarose-Matrix. Die Faltung des Proteins wurde durch langsamen Pufferaustausch initiiert und die Proben der einzelnen Wasch- und Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Dieses Rückfaltungs- und Reinigungsprotokoll resultierte in homogenen PrP-Lösungen, wie beispielhaft für die Konstrukte hPrP121-230, hPrP90-230 sowie mPrP89-231 in Abbildung 7 gezeigt.

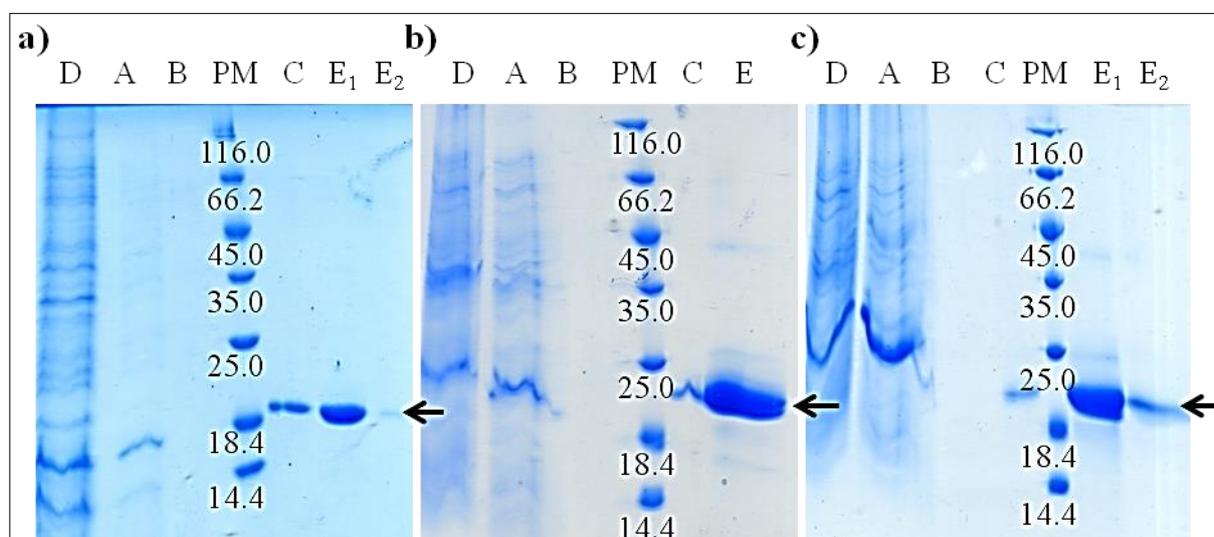


Abbildung 7: SDS-PAGE-Kontrolle (15 %, Coomassie-Färbung) der affinitätschromatographischen Reinigung der PrP-Konstrukte a) hPrP121-230, b) hPrP90-230 und c) mPrP89-231. Aufgetragen wurden jeweils der Durchlauf (D), die Waschschritte mit Puffer A (A), Puffer B (B) und Puffer C (C) sowie die Elutionsfraktionen (E bzw. E₁, E₂). Das Molekulargewicht des Proteinmarkers (PM) ist in kDa angegeben. Die Pfeile markieren die Proteinbande des jeweiligen PrP-Konstrukts.

Um für weitere Untersuchungen einen Einfluss der N-terminalen Hexahistidinsequenz auf die Ergebnisse ausschließen zu können, wurde diese mit Hilfe der Endopeptidase TEV entfernt. Hierzu wurden alle Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie, welche das lösliche PrP enthielten, vereinigt. Da die Imidazolkonzentration in der vereinigten Proteinlösung keinen Einfluss auf die Proteaseaktivität hatte, wurde auf eine Dialyse verzichtet. Die proteolytische Spaltung des Fusionsproteins erfolgte direkt mit der entsprechenden Menge TEV-Protease in Gegenwart von reduziertem und oxidiertem Glutathion in Tris-Puffer für 3-4 Stunden im Wasserbad bei 25 °C. Die anschließende Trennung des geschnittenen Proteins von der TEV-Protease und dem freien His-Tag funktionierte bei den Konstrukten hPrP90-230 und mPrP89-231 jedoch nicht so effizient wie erwartet mittels Affinitätschromatographie. Die

nachfolgende SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 8) zeigt, dass ein Teil des geschnittenen PrP ebenso wie der His-Tag und die TEV-Protease (mit His-Tag) mit der Matrix interagiert. Folglich ist die vermittelte Affinität durch die an der Proteinoberfläche gelegenen nativen Histidine ausreichend hoch, um einen Teil hPrP90-230 und mPrP89-231 auch ohne spezifische Hexahistidinsequenz an die Ni-NTA-Matrix zu binden. Daher war im Durchlauf nicht die gesamte Menge des geschnittenen PrP detektierbar, während alle Komponenten nach Imidazol-Zugabe koeluierten. Auch eine entsprechende Elution mittels Stufen- bzw. linearem Imidazol-Gradienten sowie der Versuch, die Proteine basierend auf ihrem unterschiedlichen Molekulargewicht mittels Größenausschlusschromatographie zu trennen, führte nicht zum gewünschten Erfolg. Daher wurde eine alternative Strategie entwickelt.

Die TEV-Protease gehört zur Familie der Cysteinproteasen, deren aktives Zentrum strukturell und funktionell den Serinproteasen ähnlich ist (Phan *et al.*, 2002). Folglich wurde versucht, die Affinität der TEV-Protease zu dem Serinproteaseinhibitor *p*-Aminobenzamidin, der an unlösliche Zelite gebunden vorlag, für die spezifische Abtrennung der Protease zu nutzen. Zum Proteingemisch wurde eine Spatelspitze des Inhibitors gegeben und der Ansatz für 30 Minuten bei RT auf einem Schüttler mit Kreisbewegung inkubiert. Anschließend wurde die Suspension über die Fritte eines Glassäulenkörpers getrennt. Die nachfolgende SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 8) zeigte, dass die TEV-Protease vollständig an *p*-Aminobenzamidin-Zelite gebunden hat und somit vom geschnittenen hPrP90-230 bzw. mPrP89-231 abgetrennt werden konnte.

hPrP121-230 weist zwei Histidine (His96, His111) weniger in der Aminosäuresequenz auf, wodurch die Affinität zur Ni-NTA-Agarose-Matrix signifikant verringert ist und ein entsprechender Interaktions-Effekt, wie bei den Konstrukten hPrP90-230 und mPrP89-231, nicht zu beobachten war. Daher konnte die Trennung nach der proteolytischen Spaltung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie im Batch-Verfahren erfolgen. Hierzu wurde das Proteingemisch in einem Säulenkörper mit entsprechender Matrix für 30 Minuten auf einem Schüttler mit Kreisbewegung inkubiert, der Durchlauf aufgefangen, die Matrix mit Tris-Puffer gewaschen und die gebundenen Moleküle mit Elutionspuffer von der Matrix eluiert. Die analytische SDS-PAGE aller Fraktionen zeigt (Abbildung 8), dass im Durchlauf der überwiegende Teil des geschnittenen PrP nachweisbar war, während in der Elutionsfraktion die TEV-Protease, ungeschnittenes PrP sowie der abgetrennte His-Tag detektiert wurden.

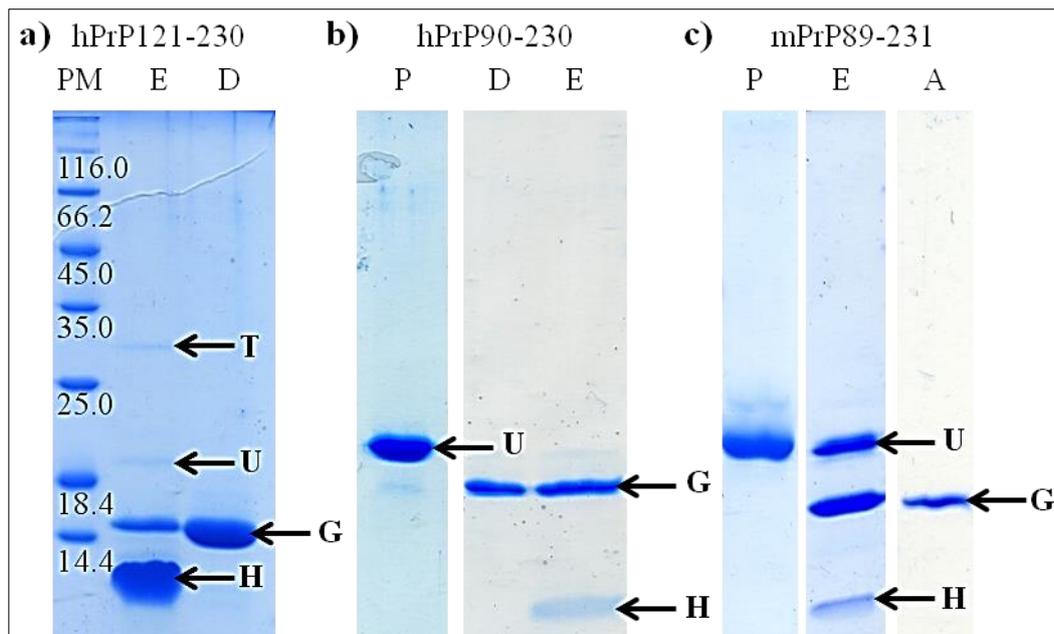


Abbildung 8: SDS-PAGE-Analyse (15 %, Coomassie-Färbung) der proteolytischen Spaltung (TEV-Protease) und Abtrennung der Hexahistidinsequenz von den PrP-Konstrukten. PM, Proteinmarker, Molekulargewichte sind in kDa angegeben. Oberhalb der SDS-Gele ist die jeweilige Fraktion angegeben: P, Proteinlösung vor Zugabe der TEV-Protease; D und E Durchlauf bzw. Elutionsfraktion der Ni-NTA-Affinitätschromatographie; A, Durchlauf nach Behandlung mit *p*-Aminobenzamidin-Zeliten. Die nachweisbaren Edukte und Produkte der proteolytischen Spaltung wurden jeweils zugeordnet: T, TEV-Protease, U, ungeschnittenes Protein, G, geschnittenes Protein und H, Hexahistidinsequenz. a) hPrP121-230 ohne His-Tag wurde überwiegend im Durchlauf nachgewiesen. b) Geschnittenes hPrP90-230 wurde zu gleichen Teilen im Durchlauf und in der Elutionsfraktion der Affinitätschromatographie detektiert. c) Nach längerer Inkubation mit TEV-Protease und anschließender Behandlung mit *p*-Aminobenzamidin-Zeliten wurde das gesamte geschnittene mPrP89-231 erfolgreich isoliert.

Nach der Trennung wurde das geschnittene PrP zum Pufferaustausch über Nacht bei 4 °C dialysiert, da die weiteren Experimente in Natriumacetat-Puffer (10 mM, pH 5,0) durchgeführt werden sollten. Das Dialysat wurde zentrifugiert, um Proteinpräzipitat zu entfernen, und die Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Mit Hilfe des gemessenen Absorptionswertes, dem Molekulargewicht (MW) sowie dem molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) des jeweiligen Proteins wurde die Konzentration der Proteinlösung ermittelt. Die Proteinlösungen wurden anschließend mit einer Amicon Ultra-Konzentrationseinheit bis zur gewünschten Konzentration eingengt.

3.3. Charakterisierung der Prion-Proteine

Nach der erfolgreichen Klonierung und Optimierung der rekombinanten Genexpression sowie der Reinigungsprozedur wurden die hergestellten PrP-Konstrukte in Lösung charakterisiert. Dazu wurde der Faltungszustand der Proteine mittels Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie

validiert, während der monomere Zustand des in Lösung befindlichen PrP durch Bestimmung der hydrodynamischen Radien mittels DLS-Messung nachgewiesen werden sollte.

3.3.1. CD-spektroskopische Analyse

Die CD-Spektren der fünf PrP-Konstrukte deuteten übereinstimmend auf eine vorwiegend α -helikale Konformation hin, welche sich durch ein Maximum bei einer Wellenlänge von 193 nm sowie zwei charakteristischen Minima bei 208 und 222 nm auszeichnet (Abbildung 9) (Holzwarth und Doty, 1965). Dies entsprach der erwarteten Sekundärstruktur des zellulären humanen und murinen PrP, die grundlegend aus drei dominierenden α -Helices und einem sehr kleinen, zweisträngigen β -Faltblatt besteht, wie die Strukturaufklärung mittels NMR-Spektroskopie zeigte (Zahn *et al.*, 2000). Die Spektren der N-terminal verkürzten Konstrukte hPrP121-230 und hPrP121-230+EFEA wichen durch ein stärker ausgeprägtes Minimum bei einer Wellenlänge von 208 nm etwas von dem allgemeinen Kurvenverlauf ab, dies spricht für einen leicht größeren prozentualen Anteil α -Helix und ist auf das Fehlen des ungefalteten N-terminalen Anteils zurückzuführen.

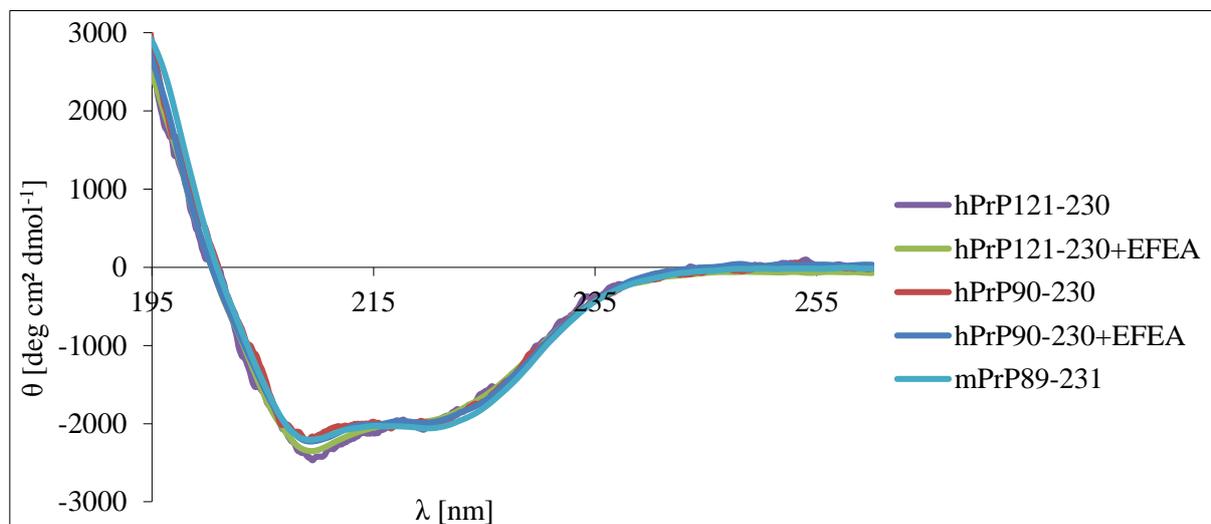


Abbildung 9: CD-Spektren der untersuchten PrP-Konstrukte. Konstrukte, die einen Teil des ungefalteten N-Terminus enthalten (hPrP90-230, hPrP90-230+EFEA, mPrP89-231), weisen einen einheitlichen Kurvenverlauf auf. Die CD-Spektren des PrP ohne ungefalteten N-terminalen Anteil (hPrP121-230, hPrP121-230+EFEA) zeigen im Bereich des Minimums bei etwa 208 nm einen leicht abweichenden Kurvenverlauf, welcher den verringerten ungefalteten Strukturanteil widerspiegelt. Untereinander sind beide Spektren jedoch übereinstimmend und charakteristisch für Proteine mit vorwiegend α -helikalen Sekundärstrukturen.

3.3.2. Hydrodynamische Radien und Proteinase K Sensitivität

Durch die CD-Spektroskopie wurde belegt, dass alle hergestellten PrP-Konstrukte einen zur zellulären Isoform des PrP vergleichbaren Sekundärstrukturgehalt aufweisen. Zur

Überprüfung, ob die Proteine erwartungsgemäß auch als Monomere in Lösung vorlagen, wurden DLS-Messungen durchgeführt. PrP neigt generell zur Aggregation, daher konnten brauchbare DLS-Ergebnisse nur dann erzielt werden, wenn die Proteine nicht zu hoch konzentriert ($< 3 \text{ mg/mL}$) und gebildete Aggregate zuvor durch Zentrifugation für mindestens 45 Minuten bei $16\,600 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ abgetrennt wurden.

hPrP121-230, dem der flexible, ungefaltete N-Terminus fehlt, weist mit $1,77 \text{ nm}$ bzw. $1,79 \text{ nm}$ (mit EFEA-Anhang) den kleinsten theoretischen hydrodynamischen Radius auf. Die durch DLS-Messungen ermittelten R_H -Werte für die entsprechenden Konstrukte mit und ohne C-terminalem EFEA-Anhang stimmen im Rahmen der Fehlergenauigkeit mit den berechneten Werten überein (Tabelle 2 und Abbildung 10). Folglich kann für diese Konstrukte der monomere Zustand in Lösung bestätigt werden. Für hPrP90-230 und mPrP89-231 wurden allerdings hydrodynamische Radien ermittelt, die um etwa 1 nm bis $1,5 \text{ nm}$ größer sind als die zugehörigen berechneten Werte. Diese erhöhten R_H -Werte lassen auf die Anwesenheit höherer Aggregate in der Lösung schließen. So weist zum Beispiel ein mPrP89-231-Tetramer einen theoretischen hydrodynamischen Radius von $3,03 \text{ nm}$ auf, während die berechneten Radien eines Tetramers von hPrP90-230 sowie hPrP90-230+EFEA bei $3,02$ bzw. $3,05 \text{ nm}$ liegen.

Tabelle 2: Vergleich der berechneten und mittels DLS-Messungen ermittelten hydrodynamischen Radien der verwendeten PrP-Konstrukte

PrP-Konstrukt	Berechneter R_H [nm]	Ermittelter R_H [nm]
hPrP121-230	1,77	$1,96 \pm 0,39$
+EFEA	1,79	$2,09 \pm 0,26$
hPrP90-230	1,90	$3,40 \pm 0,18$
+EFEA	1,92	$3,02 \pm 0,38$
mPrP89-231	1,91	$3,14 \pm 0,44$

Das zelluläre PrP wird durch eine hohe Sensitivität gegenüber Proteinase K (PK) charakterisiert, im Gegensatz zur β -Faltblatt-reichen und höher aggregierten PrP^{Sc}-Form, welche nicht komplett abgebaut wird. Daher werden die beiden PrP-Isoformen auch anhand des Ergebnisses der PK-Spaltung unterschieden. Die Sensitivität des hergestellten PrP gegen PK, welches eine Endopeptidase aus dem Schlauchpilz *Tritirachium album* ist und zur Familie der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen gehört, wurde folglich ebenfalls untersucht. Durch die geringe Substratspezifität der PK werden die Peptidbindungen nach hydrophoben, aromatischen und aliphatischen Aminosäureresten gespalten (Ebeling *et al.*, 1974).

Bereits nach 10-minütiger Inkubation von monomerem hPrP90-230 bzw. mPrP89-231 in Gegenwart von PK ist durch SDS-PAGE-Analyse bei dem überwiegenden Teil der Proteine die

Abspaltung des flexiblen, ungefalteten N-Terminus nachweisbar, während nach 20 Minuten beide PrP-Spezies vollständig ohne N-Terminus vorlagen (Abbildung 10). Der ungefaltete N-Terminus des PrP ist durch die PK leichter angreifbar und wird daher erwartungsgemäß zuerst gespalten, woraufhin der C-Terminus für die PK erst zugänglich wird. Das Konstrukt hPrP90-230+EFEA musste über 60 Minuten mit PK inkubiert werden, um das gleiche Resultat zu erzielen (Abbildung 10). Folglich wird durch die vier C-terminal angefügten Aminosäurereste, die den GPI-Anker simulieren sollen, die Stabilität gegenüber PK signifikant erhöht. Die resultierende C-terminale Domäne, welche vom Molekulargewicht her etwa dem PK-resistenten Teil im PrP^{Sc} entspricht (ca. 13 kDa), bleibt bei allen drei Konstrukten über 60 Minuten augenscheinlich stabil. Beim PrP^{Sc} bildet dieser gefaltete, PK-resistente C-Terminus vermutlich die Kernstruktur der amyloiden Fibrillen, so dass die verringerte PK-Sensitivität resultiert. Bei den humanen PrP-Konstrukten 121-230 und 121-230+EFEA ist hingegen mit fortschreitender Inkubationszeit in Gegenwart von PK eine leichte, aber kontinuierliche Abnahme der Proteinmenge erkennbar. Während die PK folglich direkt mit dem Abbau der verkürzten humanen PrP-Konstrukte 121-230 und 121-230+EFEA beginnt, wird bei den humanen PrP-Konstrukten 90-230 und 90-230+EFEA sowie dem murinen PrP 89-231 zunächst der ungefaltete N-Terminus gespalten und anschließend erfolgt dann erst der Abbau des gesamten Proteins.

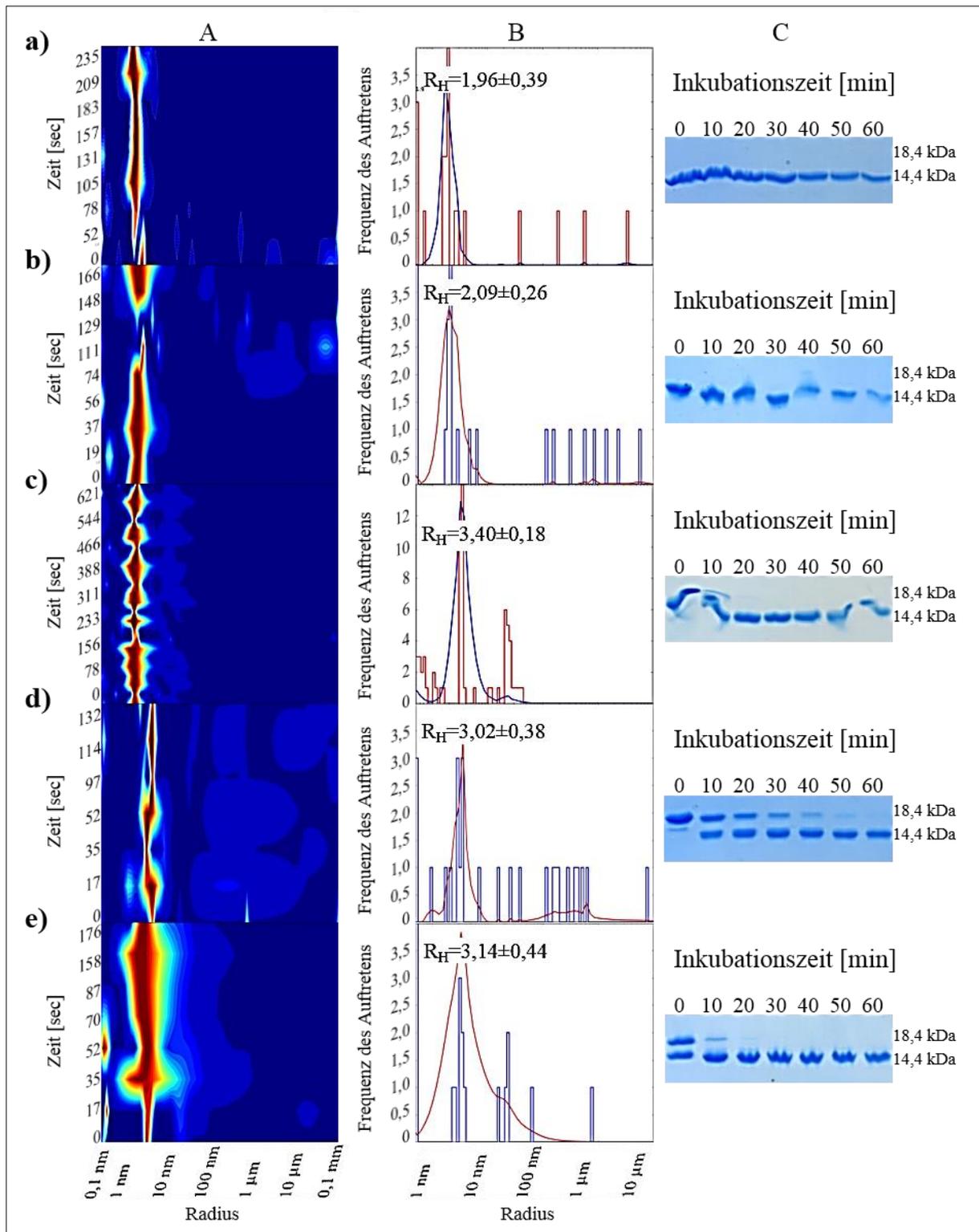


Abbildung 10: Bestimmung der hydrodynamischen Radien der hergestellten PrP-Konstrukte mittels DLS-Messung sowie Untersuchung der Sensitivität gegenüber Proteinase K (PK). Dargestellt wurde jeweils die Radienverteilung (A) und das dazugehörige Histogramm (B) der DLS-Messung von a) hPrP121-230, b) hPrP121-230+EFEA, c) hPrP90-230, d) hPrP90-230+EFEA, e) mPrP89-230. Außerdem wurden die verschiedenen PrP-Konstrukte für 60 Minuten bei 37°C mit PK im molaren Verhältnis 1:500 (PK:Protein) inkubiert und der PK-Verdauungsansatz anschließend mittels (C) SDS-PAGE (15 %, Coomassie-Färbung) analysiert.

3.3.3. Bestimmung der Schmelzpunkte

Zur Untersuchung der Stabilität der Strukturen der verschiedenen PrP-Konstrukte wurden die Schmelzkurven der Proteine mittels CD-Spektroskopie im Temperaturbereich von 20 bis 96 °C aufgenommen. Besonderes Augenmerk wurde in diesem Zusammenhang auf den Einfluss der N-terminalen Hexahistidinsequenz sowie des C-terminalen EFEA-Anhangs auf die Stabilität der PrP-Struktur gelegt (Abbildung 11). Mit Hilfe des Programms Origin 9.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) wurden die zugehörigen Schmelzpunkte der Proteine ermittelt (Tabelle 3). Übereinstimmend korreliert die Abnahme der gemessenen Schmelzpunkttemperaturen mit der Anzahl der an PrP angefügten N- und C-terminalen Überhänge. So zeigten die Wildtyp PrP-Proteine generell die höchste Thermostabilität, während die Anfügung der N-terminalen Hexahistidinsequenz oder der C-terminalen EFEA-Sequenz sowie deren Kombination die zugehörigen Schmelzpunkte zu geringeren Temperaturen verschoben hat. Folglich haben beide Sequenzanhänge eine destabilisierende Wirkung auf die PrP-Struktur, die in einem vergleichbaren Größenbereich liegt.

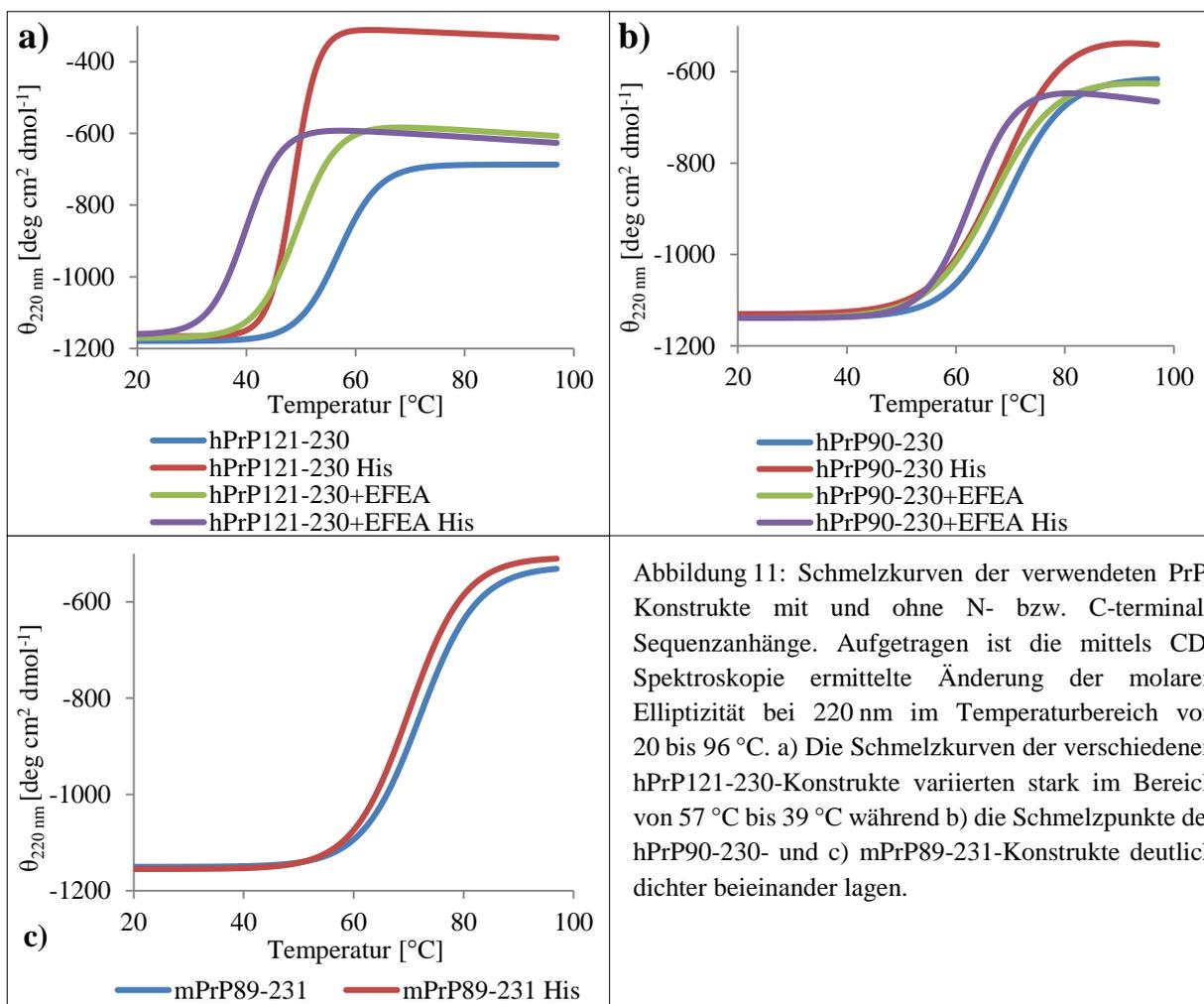


Abbildung 11: Schmelzkurven der verwendeten PrP-Konstrukte mit und ohne N- bzw. C-terminale Sequenzanhänge. Aufgetragen ist die mittels CD-Spektroskopie ermittelte Änderung der molaren Elliptizität bei 220 nm im Temperaturbereich von 20 bis 96 °C. a) Die Schmelzkurven der verschiedenen hPrP121-230-Konstrukte variierten stark im Bereich von 57 °C bis 39 °C während b) die Schmelzpunkte der hPrP90-230- und c) mPrP89-231-Konstrukte deutlich dichter beieinander lagen.

Tabelle 3: Ermittelte Schmelzpunkte der verwendeten PrP-Konstrukte

PrP-Konstrukte	Schmelzpunkt der Konstrukte [°C]			
	Wildtyp	+His	+EFEA	+EFEA+His
hPrP121-230	57	48	49	39
hPrP90-230	69	67	66	62
mPrP89-231	72	69	-	-

Im Vergleich zu den Konstrukten von hPrP121-230 sind die Schmelzpunkte der entsprechenden Konstrukte von hPrP90-230 und mPrP89-231 um mehr als 10 °C erhöht, was einen generell stabilisierenden Einfluss des flexiblen, ungefalteten N-Terminus auf die Struktur dieser PrP-Konstrukte impliziert. Hierfür spricht auch die mit einer maximalen Schmelzpunktniedrigung von 18 °C signifikant verstärkte Destabilisierung von hPrP121-230 durch Anfügung der N- bzw. C-terminalen Überhänge.

Vor und nach Aufnahme einer Schmelzkurve wurde zudem jeweils ein vollständiges CD-Spektrum der entsprechenden Probe aufgenommen, um irreversible Änderungen in der Sekundärstruktur der Proteine zu untersuchen. Generell unterscheiden sich die CD-Kurven der Konstrukte mit Hexahistidinsequenz vor und nach dem Erhitzen im Nulldurchgang von denen ohne, was auf den unstrukturierten His-Tag (43 AS inklusive Linker) zurückzuführen ist. Sowohl der N-Terminus als auch die Hexahistidinsequenz besitzen keine definierte Sekundärstruktur und erzeugen ein *Random coil*-typisches CD-Signal, welches charakteristisch ein sehr schwaches Maximum bei etwa 220 nm und ein ausgeprägtes Minimum um 200 nm aufweist (Holzwarth und Doty, 1965). Zusammen mit dem strukturierten C-Terminus entsteht das vollständige, α -helikal-dominierte CD-Signal der PrP-Konstrukte, welches je nach Größe der ungefalteten Bereiche unterschiedlich stark beeinflusst wird.

Eine thermisch-induzierte Konformationsänderung von der vorwiegend α -helikalen Struktur vor dem Erhitzen in eine β -Faltblatt-reiche Struktur nach Erreichen der Temperatur von 96 °C und anschließendem Abkühlen auf 20 °C war für alle Konstrukte des hPrP121-230 zu beobachten (Abbildung 12). Eine Verschiebung der Nulldurchgänge zu höheren Wellenlängen sowie eine Vereinigung der beiden typischen Minima α -helikaler Strukturen in ein dominierendes Minimum bei etwa 215 nm, welches β -Faltblatt-dominierte Struktur charakterisiert, ist deutlich erkennbar. Bei den hPrP90-230-Konstrukten war diese Umwandlung nicht in diesem Ausmaß wiederzufinden. Nur bei hPrP90-230+EFEA mit und ohne Hexahistidinsequenz konnten entsprechende Hinweise erhalten werden, die jedoch bei weitem nicht so eindeutig wie bei den hPrP121-230-Konstrukten sind. mPrP89-231 wies vor

und nach dem Erhitzen sowohl mit als auch ohne Hexahistidinsequenz eine vergleichbare vorwiegend α -helikale Sekundärstruktur auf. Diese Ergebnisse bekräftigen die bereits postulierte Stabilisierung der Struktur von hPrP90-230 und mPrP89-231 durch den vorhandenen flexiblen, ungefalteten N-Terminus, so dass eine thermische Umwandlung dieser PrP-Konstrukte inhibiert wird. Die Anfügung des C-terminalen EFEA-Anhangs hatte allerdings bei den humanen PrP-Konstrukten einen deutlich destabilisierenden Einfluss.

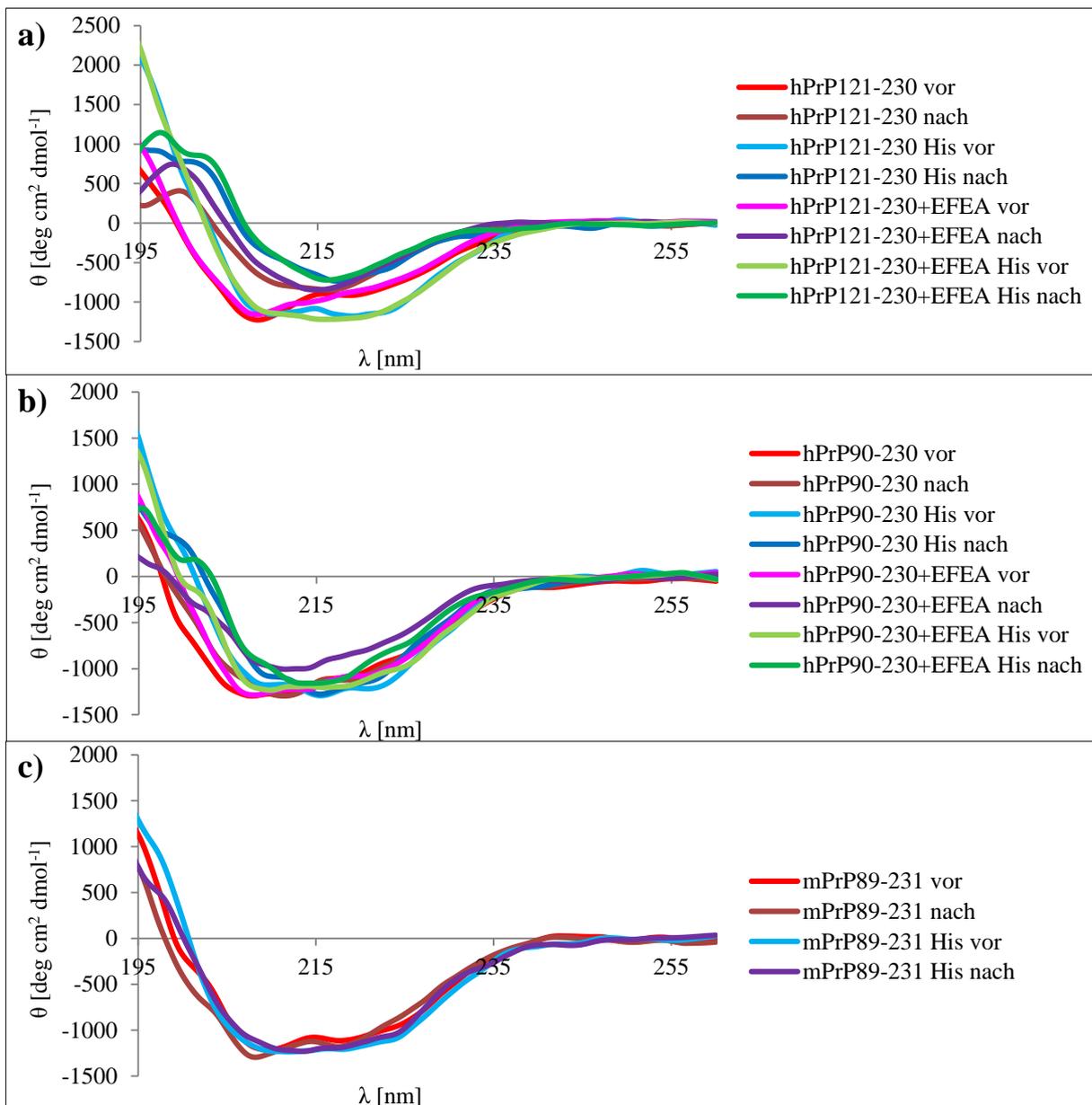


Abbildung 12: CD-Spektren der PrP-Konstrukte a) hPrP121-230, b) hPrP90-230 sowie c) mPrP89-231 vor Erhitzen auf 96 °C zur Aufnahme der zugehörigen Schmelzkurve sowie nach erneuter Abkühlung auf 20 °C.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass der durch den EFEA-Anhang simulierte GPI-Anker bezüglich der Sensitivität gegenüber Proteinase K eine stabilisierende, jedoch in

Bezug auf die Schmelzpunkttemperatur sowie die thermische Umwandlung eine destabilisierende Auswirkung auf die Proteine hat. Der flexible N-Terminus der PrP-Konstrukte verhält sich hingegen erwartungsgemäß sehr sensitiv gegenüber Proteinase K, stabilisiert jedoch die Struktur der Proteine und verhindert so eine thermisch-induzierte Umwandlung.

3.3.4. Strukturelle Charakterisierung von hPrP90-230+EFEA mit Hexahistidinsequenz in Lösung

Das humane PrP 90-230, welches einen Teil der flexiblen, ungefalteten N-terminalen Domäne umfasst, konnte bisher nicht kristallisiert werden, da insbesondere durch die Flexibilität der Aminosäurereste 90-125 der Kristallisationsprozess entscheidend behindert wird. Daher wurde das monomere humane PrP 90-230+EFEA im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Röntgenkleinwinkelstreuung (SAXS) direkt in Lösung untersucht, um Erkenntnisse über die Struktur, insbesondere über die Orientierung des unstrukturierten N-Terminus des PrP in Gegenwart der Hexahistidinsequenz zu erlangen. Die SAXS-Experimente wurden an dem Messplatz X33 der Synchrotronstrahlungsquelle DORIS III (HASYLAB/EMBL, DESY, Hamburg) bei einer Proben-Detektor Distanz von 2,7 m zu dem Pilatus 1M Detektor und einer Wellenlänge der Synchrotronstrahlung von $\lambda = 1,5 \text{ \AA}$ durchgeführt. Die Monodispersität der unterschiedlich konzentrierten PrP-Proben wurde zuvor mittels DLS-Messung überprüft. Das Beugungssignal des Proteinpuffers wurde jeweils von den Signalen der Proben abgezogen und die resultierenden Kurven entsprechend der Proteinkonzentration skaliert. Aus den SAXS-Daten wurde für hPrP90-230+EFEA+His ein Molekulargewicht von $17 \pm 3 \text{ kDa}$ ermittelt, der theoretischen Wert liegt bei 21 kDa. Das Programm GNOM wurde angewandt, um aus den experimentellen Rohdaten den zugehörigen Trägheitsradius (R_g) von $2,2 \pm 0,1 \text{ nm}$ und die maximale Größe des Moleküls (D_{\max}) von $7,2 \pm 1,0 \text{ nm}$ zu berechnen.

Um die Konformation des ungefalteten N-Terminus des PrP und der Hexahistidinsequenz zu untersuchen, wurde zunächst mit dem Programm RANCH (Random-Kette) ein Pool von Zufallsmodellen mit unterschiedlicher N-terminaler Konformation erzeugt, basierend auf der angegebenen Aminosäuresequenz und der bekannten Strukturinformation der C-terminalen Domäne des PrP. Anschließend wurde mit dem Programm GAJOE (*Genetic algorithm judging optimisation of ensembles*) ein Ensemble von Modellen ausgewählt, deren kombinierte theoretische Beugungsintensitäten die experimentellen SAXS-Daten am besten beschreiben, und die gemittelten theoretischen Beugungsintensitäten dieses Ensembles von Konformationen mit dem Programm EOM (*Ensemble Optimierung Methode*) an die experimentellen SAXS-

Daten angepasst. So konnten, basierend auf den SAXS-Daten, verschiedene mögliche Ausrichtungen des flexiblen N-Terminus und der anhängenden Hexahistidinsequenz postuliert werden, welche in Abbildung 13 zusammengestellt sind. Dabei wird deutlich, dass die Orientierung des ungefalteten N-Terminus in diesen Modellen so gut wie gar nicht variiert, im Gegensatz zu der des *His-Tags* und des C-terminalen EFEA-Anhanges. Das könnte darauf hinweisen, dass der flexible N-Terminus des Proteins eine bevorzugte Konformation aufweist, wenn ein N-terminaler *His-Tag* vorhanden ist, während die Hexahistidinsequenz an sich in zahlreichen Orientierungen rund um das Protein auftreten kann. Die vier am C-Terminus angefügten Aminosäuren sind ebenfalls sehr beweglich und variieren stark in ihrer Ausrichtung (Abbildung 13).

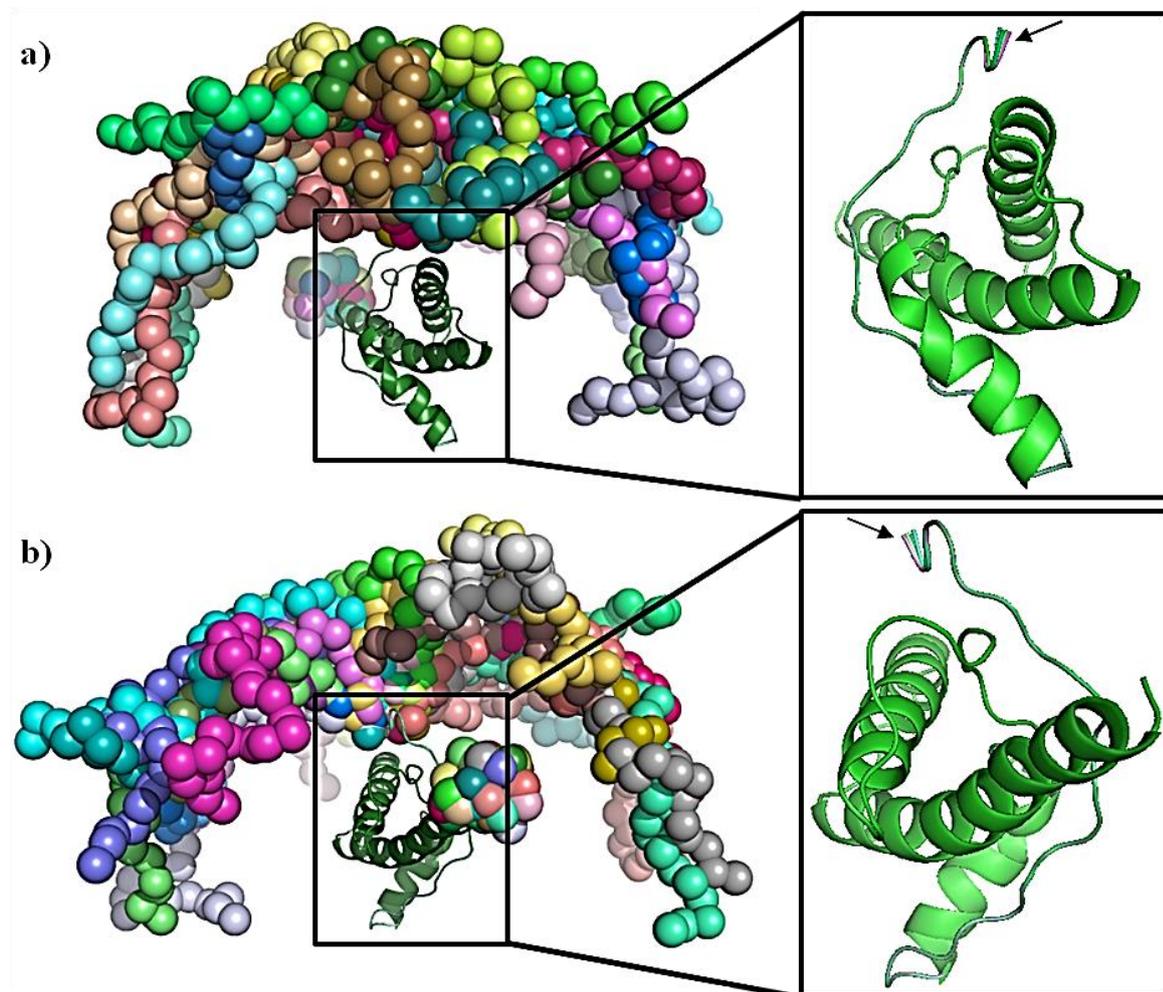


Abbildung 13: SAXS-Modell des humanen PrP 90-230+EFEA mit N-terminaler Hexahistidinsequenz. Die Struktur des hPrP90-230 ist als *Cartoon-Modell* gezeigt, während die Aminosäurereste der Polypeptidkette des N-terminalen *His-Tags* sowie des C-terminalen EFEA-Anhanges als raumausfüllende Kreise dargestellt sind. Jede Farbe repräsentiert eine mögliche Konformation der flexiblen Anhänge. Die Abbildungen a) und b) zeigen um 180° gedrehte Ansichten des Moleküls, welche mit dem Programm PyMOL erstellt wurden. In der vergrößerten Darstellung der Struktur des hPrP90-230 wurde jeweils der N-Terminus des PrP, dessen Orientierung nur minimal variiert, mit einem Pfeil markiert.

3.4. Oxidativ-induzierte Umwandlung

Nach der erfolgreichen Optimierung der PrP-Herstellung und der grundlegenden Charakterisierung der monomeren Proteine in Lösung sollte nun deren Umwandlung in eine zur infektiösen Isoform homologe Konformation untersucht werden. Aufgrund des bekannten Zusammenhangs zwischen der Oxidation des PrP und deren Konformationsänderung vom vorwiegend α -helikalen PrP^C in eine β -Faltblatt-reiche Struktur wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei bereits publizierte Verfahren angewandt (Redecke *et al.*, 2006 und 2009).

Der oxidative Stress kann einerseits mittels Fenton-Reaktion induziert werden, dabei wird Wasserstoffperoxid in Gegenwart von Eisen oder anderen zweiwertigen Metallionen, wie etwa Kupfer, in das hochreaktive Hydroxyl-Radikal gespalten ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Me}^{2+} \rightarrow \text{HO}^\bullet + \text{OH}^- + \text{Me}^{3+}$), welches dann die Seitenketten bestimmter Aminosäuren, insbesondere von Methionin und Histidin, oxidativ modifizieren kann (Redecke *et al.*, 2006).

Außerdem konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass durch UVB-Licht eine oxidative Schädigung des PrP induziert wird, die eine spezifische Umwandlung und Aggregation des PrP zur Folge haben kann (Redecke *et al.*, 2009). In Anbetracht der Tatsache, dass das verwendete UVB-Licht in dem Wellenlängenbereich des Sonnenlichts liegt, welches die Erde erreicht, sollte das zugehörige, bereits grundlegend etablierte *in-vitro*-Aggregationssystem im Rahmen dieser Arbeit weiter optimiert werden, um den Mechanismus der UV-Licht-induzierten Konformationsänderung des PrP besser zu verstehen. Die dabei entstehenden Produkte sollten anschließend analysiert und charakterisiert werden.

3.4.1. Validierung des bestehenden UV-Versuchsaufbaus

In Abbildung 14 ist der Aufbau des UV-Versuches dargestellt. Die Proteinlösung wird dabei vom Reservoir mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe über die Bestrahlungsküvette zur DLS-Küvette und anschließend wieder ins Reservoir geleitet. Beim Durchfließen der Bestrahlungsküvette wird die Proteinlösung von einem Titan:Saphir-Laser (Tsunami) bestrahlt und die Transmission am Messkopf hinter der Küvette gemessen. In der DLS-Küvette wird die Radienverteilung der bestrahlten Proteinlösung mit einem *SpectroProbe* 400-System (Xtal Concepts GmbH, Hamburg) im Fluss bestimmt, bevor diese wieder zurück ins Reservoir gelangt.

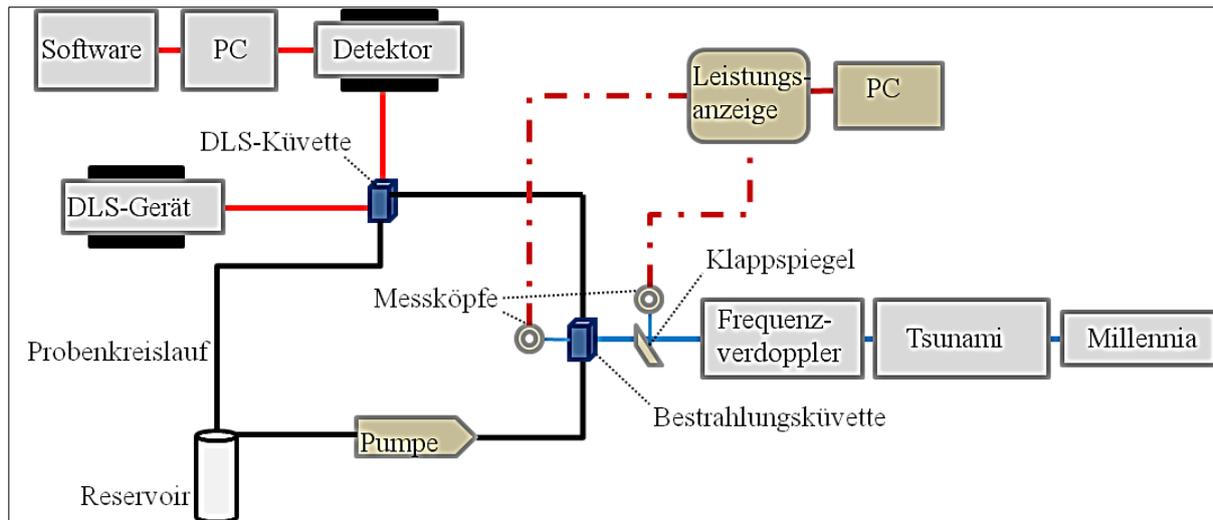


Abbildung 14: Schematische Darstellung des ursprünglichen optimierten Versuchsaufbaus für die UV-induzierte Umwandlung des PrP mit integrierter DLS-Messung im Fluss. Das jeweilige PrP-Konstrukt wurde von einem Tsunami, welcher ein gepulster Titan:Saphir-Laser ist, mit Frequenzverdoppler bzw. -verdreifacher bestrahlt. Aus dem Reservoir gelangte die Proteinlösung durch die peristaltische Pumpe über die Bestrahlungsküvette (Durchmesser 5 mm) in die DLS-Quarzküvette (Durchmesser 1 mm) zurück ins Reservoir. Mit den Messköpfen vor und hinter der Bestrahlungsküvette wurde die Leistung bzw. Transmission des Lasers aufgezeichnet. Die DLS-Messungen der Proteinlösungen wurden sowohl im Fluss als auch statisch durchgeführt. Für die statischen Messungen wurde der Laserstrahl mit dem Klappspiegel abgelenkt und die Pumpe angehalten.

3.4.1.1. Validierung des integrierten Online-DLS-Systems

Um den Prozess der Konformationsänderung sowie der damit verbundenen Assoziation der PrP-Konstrukte nachverfolgen zu können, musste das Online-DLS-System zunächst validiert werden. Zum Zeitpunkt des Aufbaus des Online-DLS-Systems stand keine Software zur Verfügung, um die Rohdaten mit der zugehörigen Fließgeschwindigkeit zu korrelieren. Daher mussten die aufgenommenen DLS-Messdaten zunächst mit der verfügbaren Software zur Interpretation statischer DLS-Messungen ausgewertet werden. Es wurde ein direkter Effekt der Strömungsgeschwindigkeiten der Partikel in Lösung auf die aus den Messdaten berechneten hydrodynamischen Radien (R_H) erwartet, daher sollten die Parameter Pumpgeschwindigkeit und Akkumulationszeit zunächst soweit optimiert werden, dass eine möglichst große Übereinstimmung der Partikelradien im Fluss mit denen der statischen Messungen erhalten wird.

Bei herkömmlichen statischen DLS-Messungen werden die Partikelgrößen aus der Brownschen Molekularbewegung der Teilchen in Lösung berechnet (Goldburg 1999). Die Diffusionsbewegung wird jedoch bei DLS-Messungen im Fluss von der translatorischen Bewegung der Teilchen in Lösung beeinflusst, was für die Berechnung der Partikelgrößen entsprechend berücksichtigt werden muss (Destremaut *et al.*, 2009; Leung *et al.*, 2006). Um die Auswirkung der Fließgeschwindigkeit auf den ermittelten hydrodynamischen Radius zu

beurteilen, wurden verschiedene Standardproteine mit unterschiedlichen Pumpgeschwindigkeiten als interne Kalibrierung mittels DLS-Messung untersucht. Dabei wurde die Abhängigkeit der durch die Software ermittelten R_H -Werte sowohl von der Fließgeschwindigkeit als auch vom Molekulargewicht und der Konzentration der Eichproteine näher betrachtet. Als Standardproteine wurden Lysozym (14,6 kDa), Thaumatin (22,4 kDa), BSA (66,5 kDa), Aldolase (158 kDa) und Ferritin (440 kDa) ausgewählt. Die hydrodynamischen Radien der verschiedenen Standardproteine wurden mittels statischer DLS-Messung bestimmt und die entsprechenden theoretischen R_H -Werte nach der Formel 4 im Abschnitt 5.2.2.12. berechnet (Tabelle 4). Mit steigendem Molekulargewicht der Proteine wurden die Abweichungen der gemessenen von den berechneten Werten größer, was mit einer suboptimalen globulären Proteinstruktur der Proteine mit hohem Molekulargewicht zusammenhängt.

Tabelle 4: Molekulargewicht (MW), Extinktionskoeffizient (ϵ), sowie statisch gemessene und theoretische hydrodynamische Radien (R_H) der verwendeten Standardproteine

Protein	MW [kDa]	ϵ [L mol⁻¹cm⁻¹]	R_H statisch gemessen [nm]	R_H theoretisch berechnet[nm]
Lysozym	14,6	36 940	2,0 ± 0,2	1,8
Thaumatin	22,4	29 420	2,2 ± 0,4	2,1
BSA	66,5	42 920	4,0 ± 0,1	3,5
Aldolase	158,0	36 370	5,4 ± 0,8	4,8
Ferritin	440,0	15 930	7,7 ± 0,8	6,1

Da das Totvolumen des Systems 1,2 mL betrug, wurden zur Kalibrierung jeweils 1,5 mL der entsprechenden Proteinlösung in Phosphat-Puffer (20 mM, pH 7,2) in das Reservoir gegeben und die tatsächliche Pumpgeschwindigkeit (Volumen pro Zeit) wurde ermittelt. Die Proteinlösung zirkulierte für 3 Minuten im System, bevor der Fluss gestoppt und nach 5 Minuten Regenerationszeit die statische DLS-Messung mit verschiedenen Akkumulationszeiten (2, 5, 10, 20, 30 Sekunden, jeweils 10 Wiederholungen) durchgeführt wurde. Nach dem erneuten Start des Flusses wurden die online DLS-Messungen mit den gleichen Parametern wie für die statische DLS-Messung vollzogen. Die Fließgeschwindigkeit wurde durch schrittweise Erhöhung um 0,5 mL/min von anfänglich 0,5 bis auf 5,5 mL/min variiert. Alle DLS-Messungen im Fluss wurden mit der entsprechenden statischen Messung der gleichen Proteinlösung verglichen.

Die Auswirkungen der Fließgeschwindigkeit auf die DLS-Messungen von Lysozym und BSA waren geringfügig (Abbildung 15). Eine signifikante Beeinflussung der R_H -Werte wurde

hingegen für Thaumatin und Aldolase beobachtet, deren Ausmaß stark von der jeweiligen Fließgeschwindigkeit abhing. Für Ferritin wurden nur im Geschwindigkeitsbereich zwischen 1,5 und 3,5 mL/min signifikante Abweichungen detektiert.

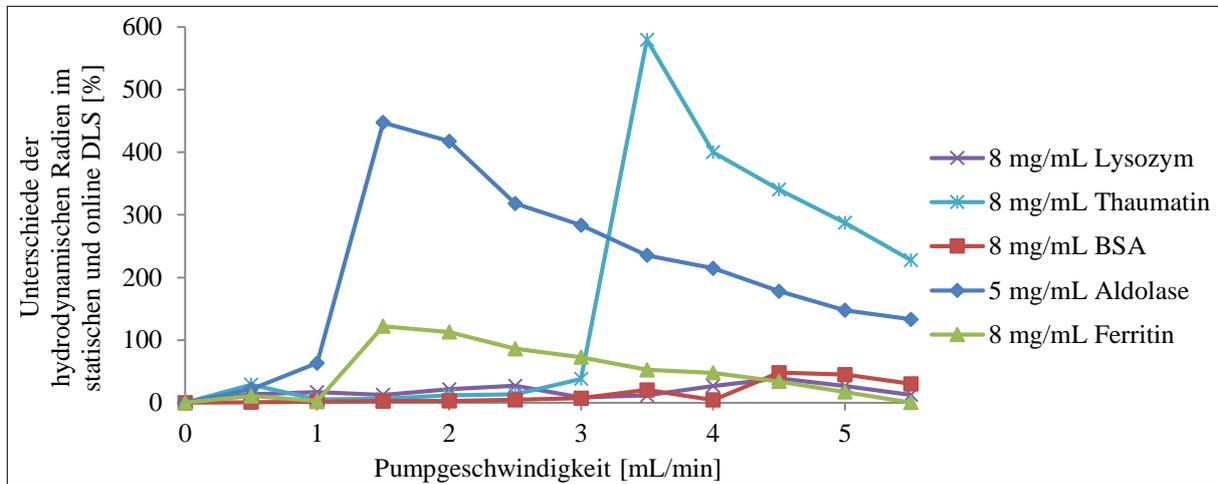


Abbildung 15: Graphische Darstellung der prozentualen Abweichung der R_H -Werte der statischen und online DLS-Messung im Fluss voneinander. Diese wurden bei einer konstanten Akkumulationszeit von 20 Sekunden mit 10 Wiederholungen und Fließgeschwindigkeiten im Bereich von 0,5 bis 5,5 mL/min bestimmt. Die online Messungen wurden mit der entsprechenden statischen Messung derselben Proteinlösung verglichen und die daraus resultierende Differenz in Prozent angegeben. Dabei wurde deutlich, dass der Einfluss der Fließgeschwindigkeit auf die berechneten R_H -Werte von Lysozym und BSA vernachlässigbar ist, während für Thaumatin und Aldolase signifikante Abweichungen ermittelt wurden.

Bezüglich der Abhängigkeit der gemessenen R_H -Werte von der jeweiligen Akkumulationszeit der DLS-Messung im Fluss kann keine generelle Aussage getroffen werden (Abbildung 16a-e). Während für BSA, Ferritin und Lysozym (mit Ausnahme der Akkumulationszeit von 2 s) keine signifikanten Auswirkungen detektiert werden konnten, wurde bei Aldolase die Abweichung zur statischen Messung bei einer Pumpgeschwindigkeit von 3,0 mL/min stetig größer (Abbildung 16f). Bei Akkumulationszeiten von 20 und 30 Sekunden schienen die Unterschiede zwischen den R_H -Werten der statischen und der online DLS-Messung generell kleiner zu werden, mit Ausnahme von Aldolase und Ferritin. Beim Thaumatin waren die Unterschiede der R_H -Werte bei den Akkumulationszeiten von 10, 20 und 30 Sekunden kleiner als bei einer Akkumulationszeit von 2 und 5 Sekunden. Das deutlich abweichende Verhalten von Thaumatin im Fluss kann durch das Vorliegen einer Mischung von Thaumatin I und Thaumatin II begründet sein, so dass es möglicherweise nicht aus der Variation der Akkumulationszeit selbst resultiert. Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen wurde für alle weiteren DLS-Messungen im Fluss eine Akkumulationszeit von 20 Sekunden verwendet.

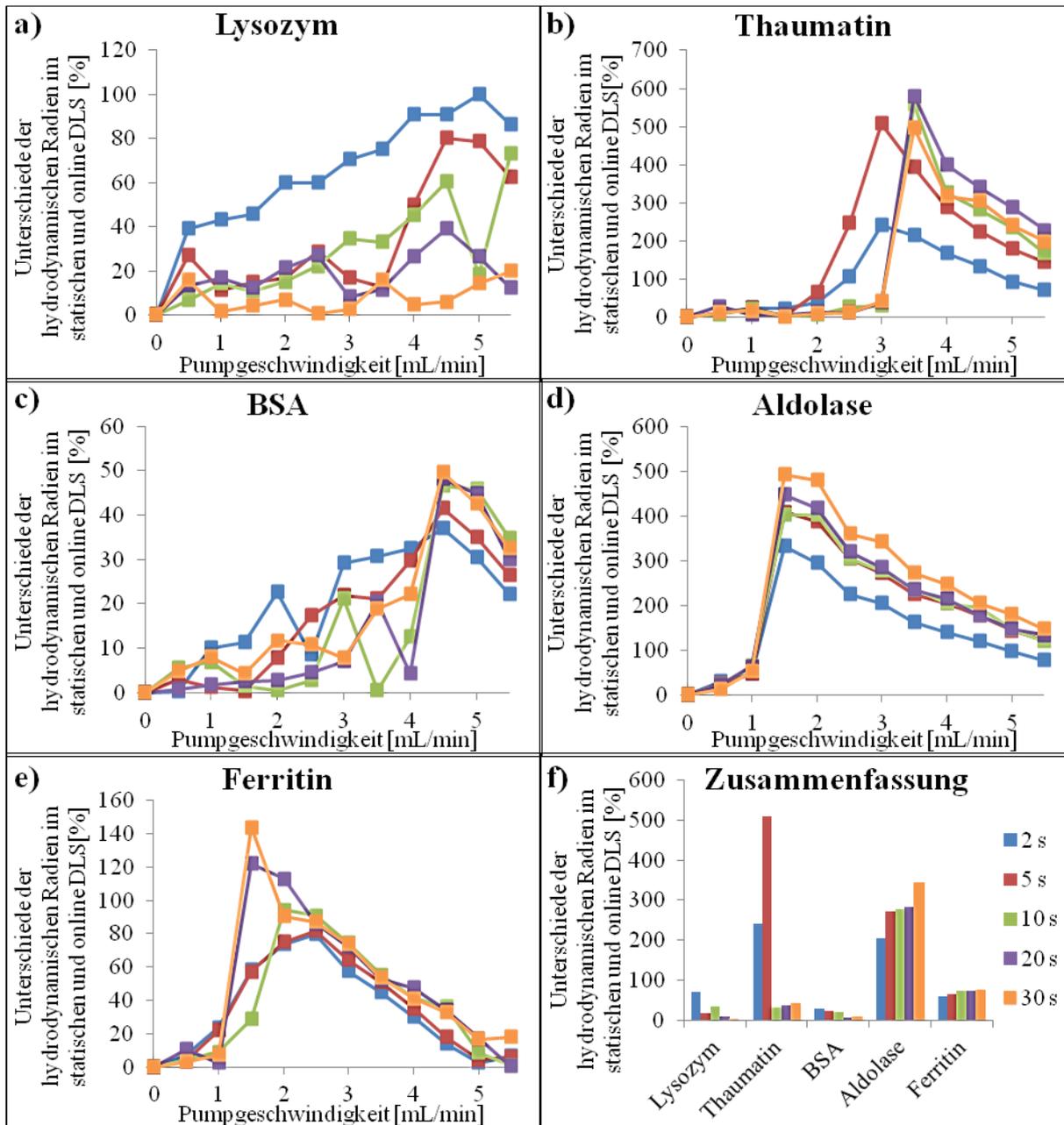


Abbildung 16: Einfluss der Akkumulationszeit der DLS-Messung auf den ermittelten hydrodynamischen Radius der Standardproteine bei verschiedenen Flussraten. Die Abweichungen der statischen und der online DLS-Messung bei Akkumulationszeiten zwischen 2 und 30 Sekunden sowie bei unterschiedlichen Fließgeschwindigkeiten wurden bestimmt und in Prozent für das jeweilige Standardprotein a) Lysozym, b) Thaumatin, c) BSA, d) Aldolase, e) Ferritin angegeben. f) Zusammenfassung des Effekts der Akkumulationszeit auf den berechneten R_H -Wert der verschiedenen Proteine bei einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 3,0 mL/min.

Die Auswirkung der Proteinkonzentration auf die DLS-Messung im Fluss wurde ebenfalls untersucht. Hierzu wurden die Standardproteine BSA und Ferritin mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (5 und 8 mg/mL) bei Pumpgeschwindigkeiten im Bereich von 0,5 bis 5,5 mL/min vermessen (Abbildung 17). Beim BSA waren die Abweichung der R_H -Werte bei Fließgeschwindigkeiten von 0,5 bis 3,0 mL/min bei beiden Proteinkonzentrationen deutlich

geringer als bei den höheren Fließgeschwindigkeiten. Beim Ferritin waren bei Fließgeschwindigkeiten von 0,5 und 1,0 mL/min die Unterschiede zwischen den statischen und online R_H -Werten im Fluss ebenfalls sehr gering, dann stieg die Differenz bei einer Fließgeschwindigkeit von 1,5 mL/min und einer Proteinkonzentration von 8 mg/mL stark an und nahm bis zu einer Fließgeschwindigkeit von 5,5 mL/min langsam wieder ab. Für 5 mg/mL Ferritin wurden die Unterschiede der R_H -Werte bei einer Fließgeschwindigkeit von 2,5 bis 3,0 mL/min größer und nahmen bis zur Fließgeschwindigkeit von 5,5 mL/min nur geringfügig wieder ab.

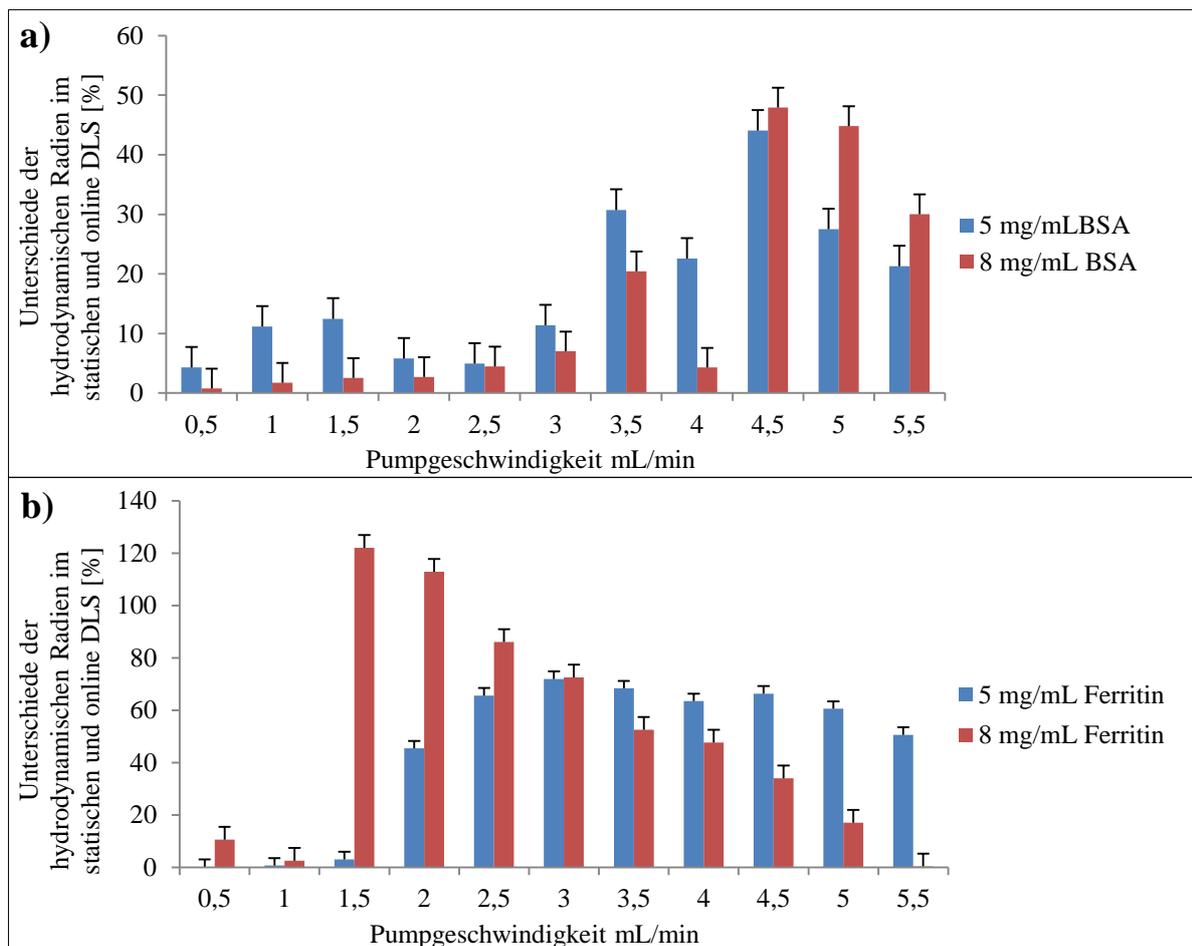


Abbildung 17: Prozentuale Differenz zwischen den R_H -Werten der Standardproteine bei statischer und online DLS-Messung mit einer konstanten Akkumulationszeit von 20 Sekunden und bei unterschiedlichen Flussraten im Bereich von 0,5 bis 5,5 mL/min. Die jeweiligen R_H -Werte für a) BSA und b) Ferritin wurden bei Proteinkonzentrationen von 5 und 8 mg/mL bestimmt.

Die Untersuchungen des Einflusses der beschriebenen Parameter auf den R_H -Wert der verschiedenen Standardproteine bestätigten eine signifikante Auswirkung der Fließgeschwindigkeit auf die ermittelten R_H -Werte. Außerdem sind die R_H -Werte abhängig von

dem Molekulargewicht sowie der Konzentration des untersuchten Proteins, aber weniger von der Akkumulationszeit der einzelnen DLS-Messung.

Aus den resultierenden Erkenntnissen der DLS-Messungen mit den Standardproteinen wurde eine konstante Fließgeschwindigkeit von 3,0 mL/min für die kontinuierliche Zirkulation der Proteinlösung als optimal angesehen. Außerdem wurden alle weiteren DLS-Messungen mit 10 Wiederholungen bei einer Akkumulationszeit von jeweils 20 Sekunden durchgeführt.

3.4.1.2. Anpassung der UV-Bestrahlungsparameter

Die UV-Bestrahlung wurde auch in dieser Studie mit dem etablierten Versuchsaufbau durchgeführt, der bereits in vorherigen Arbeiten erfolgreich zur spezifischen Umwandlung von PrP verwendet wurde und in Abschnitt 3.4.1. beschrieben ist (Redecke *et al.*, 2009). Aufgrund technischer Änderungen in dem verfügbaren Tsunami-Lasersystem war jedoch eine Anpassung der Wellenlänge des Laserlichts von 302 nm auf 284 nm erforderlich. Allerdings liegt auch die neue Wellenlänge im Bereich der UVB-Strahlung, so dass grundlegend vergleichbare Effekte erwartet wurden. Die verwendeten Konstrukte mPrP89-231, hPrP90-230, hPrP90-230+EFEA sowie die entsprechenden Konstrukte mit Hexahistidinsequenz, zur Aufklärung des Einflusses dieses Überhangs auf die Umwandlung und Oligomerbildung, umfassen neben dem strukturierten C-terminalen Bereich, auch einen Teil des nicht-strukturierten N-Terminus. Insbesondere der strukturierte C-Terminus, der die Aminosäurereste 125-230 einschließt, ist bei der UVB-induzierten Konformationsänderung ausschlaggebend, da sich die im zellulären PrP-Monomer dominierenden α -helikalen Sekundärstrukturen durch den oxidativen Stress in β -Faltblatt-dominierte Strukturen umwandeln, welche daraufhin die Aggregation zu spezifischen Oligomeren auslösen (Redecke *et al.*, 2009).

Die Proteine wurden mit einer Konzentration von 0,7 mg/mL (44 μ M) verwendet. Der pH-Wert des Proteinpuffers (10 mM Natriumacetat; pH 5,0), welcher ebenfalls zur Spülung des Systems verwendet wurde, wurde so gewählt, da das angesäuerte Milieu der endozytotischen Vesikel und Lysosomen nachempfunden wird, in welchen der pathogene Umwandlungsprozess stattfinden soll (Rezaei *et al.*, 2005). Die Proteinlösung passierte in der Bestrahlungsküvette den Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 284 nm. Dabei wurde kontinuierlich die Transmission mit einem Messkopf hinter der Küvette gemessen. Eine beobachtete exponentielle Abnahme der Transmission hinter der Küvette diente als ein erstes Indiz für die stattfindende Umwandlung und Aggregation des PrP, da die gebildeten Proteinaggregate die einfallende Strahlung sowohl stärker streuen als auch absorbieren, im Gegensatz zu der monomeren Ausgangslösung. In der folgenden DLS-Küvette wurde die bestrahlte Probe im

Fluss gemessen und zurück in das Reservoir geleitet. Eine effektive Pumpgeschwindigkeit von 3,0 mL/min wurde für die Proteinlösung mit einem Volumen von 3,5 mL eingestellt, so dass die PrP-Moleküle nach einer Minute im Fluss etwa einmal das gesamte System durchlaufen haben. Die parallel ablaufende online DLS-Messung wurde bei einer Wellenlänge von 690 nm mittels eines He-Ne Lasers durchgeführt.

mPrP89-231 ohne Hexahistidinsequenz wurde bei einer Laserleistung von 15 mW vor der Bestrahlungsküvette für insgesamt 240 Minuten mit UVB-Licht bestrahlt. Nach 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 und 240 Minuten Bestrahlungsdauer wurden nach Beruhigung der Lösung bei blockiertem Laser und gestopptem Fluss Proben für eine nachfolgende Charakterisierung der PrP-Moleküle mittels SDS-PAGE-Analyse, CD-Spektroskopie und Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford entnommen. Außerdem wurde jeweils eine statische DLS-Messung für 30 Sekunden zusätzlich zur DLS-Messung im Fluss durchgeführt. Die online DLS-Messung zeigte bereits nach 5 Minuten die Entstehung von höheren Aggregaten, welche bis zu einer Bestrahlungszeit von 60 Minuten zunächst sehr diffus und groß erschienen (Abbildung 18). Bei der weiteren Bestrahlung nahm der hydrodynamische Radius der Moleküle augenscheinlich etwas ab, was für die Ausbildung einer geordneten, kompakteren Struktur spricht. Außerdem konnte der hydrodynamische Radius des monomeren PrP bis zu einer Bestrahlungszeit von etwa 90 Minuten detektiert werden (Abbildung 18). Die ermittelten hydrodynamischen Radien der statischen und der online DLS-Messungen variieren zwischen 5 und 15 Minuten sowie 90 und 240 Minuten stark. Zwischen 15 und 90-minütiger Bestrahlung bilden sich aus den PrP-Monomeren oligomere Strukturen, deren ermittelte R_H -Werte im Fluss nur geringfügig von denen der statischen Messung abwichen. Die großen Unterschiede zwischen den statischen und online DLS-Messungen nach 5 und 15-minütiger Bestrahlung könnten darauf beruhen, dass sich zunächst diffuse Vorstufen der oligomeren Strukturen bilden, die vermutlich zunächst vereinzelt auftreten. Die DLS-Messung im Fluss ist die Gesamtheit aller Messungen der gesamten Proteinlösung im Gegensatz zur statischen DLS-Messung, die nur einen geringen Teil des Gesamtvolumens und somit auch nicht alle bis dahin gebildeten Vorstufen der oligomeren Strukturen enthält. Von 120 bis 240-minütiger Bestrahlung nehmen die ermittelten Radien im Fluss stark ab, was wahrscheinlich auf die kompaktere Form der Oligomere zurückzuführen ist. Die größeren R_H -Werte der statischen DLS-Messungen hingegen könnten durch höhere Aggregate, die möglicherweise durch die Bestrahlung der Oligomere entstehen, in dem analysierten Lösungsvolumen zustandekommen. Nach vier Tagen wurden die bestrahlten Proben für eine erneute statische DLS-Messung (je 10 Messungen für 30 Sekunden) zentrifugiert, um die Stabilität der spezifischen, löslichen Oligomere nachzuweisen.

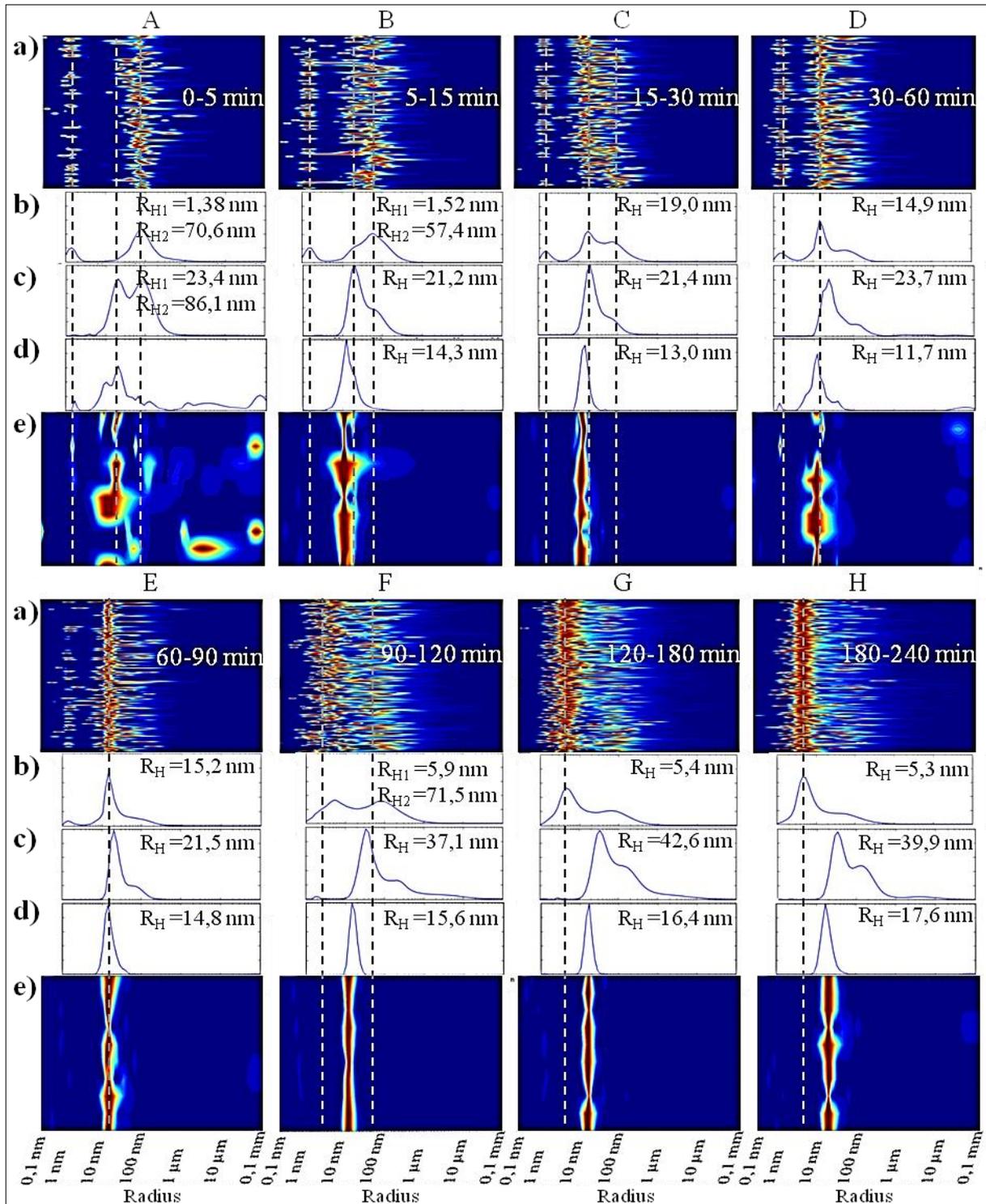


Abbildung 18: Mittels online und statischer DLS-Messung bestimmte Radienverteilung der mPrP89-231-Moleküle in Lösung während der Bestrahlung mit UVB-Licht nach 5 (A), 15 (B), 30 (C), 60 (D), 90 (E), 120 (F), 180 (G) und 240 Minuten (H). a) Zeitaufgelöste Radienverteilung im Fluss während der Bestrahlung im jeweiligen Zeitraum sowie b) das dazugehörige DLS-Signal im Fluss der letzten online DLS-Messung c) statische DLS-Messung unmittelbar nach gestopptem Fluss und d), e) nach vier Tagen.

Die anschließende SDS-PAGE-Analyse bestätigte, dass nach 120 Minuten Bestrahlungsdauer die gesamten PrP-Monomere in oligomere Strukturen und höhere Aggregate überführt wurden (Abbildung 19a).

3.4.1.3. Charakterisierung der entstandenen oligomeren Spezies

Die UV-bestrahlten Proben des mPrP89-231 wurden zentrifugiert und aus dem oberen Meniskus des Überstandes wurde die Proteinlösung für eine denaturierende SDS-PAGE-Analyse abgenommen (Abbildung 19a). Außerdem wurde die Proteinkonzentration im Überstand der UV-bestrahlten Probe mittels Bradford-Test bestimmt (Abbildung 19b) und die Sekundärstruktur mittels CD-Spektroskopie (Abbildung 20) untersucht. Dabei wird deutlich, dass die Konzentration des löslichen PrP im Überstand während der UV-Bestrahlung signifikant abnimmt. Gleichzeitig erscheinen neue Proteinbanden im denaturierenden SDS-Gel, die aufgrund der zugeordneten Molekulargewichte die Bildung von intermediären „dimeren“, „trimeren“ bzw. „tetrameren“ Zwischenzuständen implizieren, welche allerdings weiter in spezifische Oligomere und höhere Aggregate umgewandelt werden. Nach 120-minütiger Bestrahlung ist der Umwandlungsprozess nahezu vollständig abgeschlossen (Abbildung 19a). Dies korrelierte mit den Ergebnissen des Bradford-Test (Abbildung 19b). Auch hier ist eine Abnahme der Konzentration des löslichen Proteins im gleichen Maße, wie durch SDS-PAGE-Analyse ermittelt, erkennbar. Nach 90-minütiger Bestrahlung befinden sich im zentrifugierten Überstand nur noch etwa 40 % des löslichen Proteins. Da sich zu diesem Zeitpunkt schon überwiegend Oligomere in der Lösung gebildet hatten, lagerten sich diese durch die weitere Bestrahlung wahrscheinlich zu höhere Aggregate zusammen. Diese höheren Aggregate wurden durch die anschließende Zentrifugation vom löslichen Protein in der Lösung getrennt, dadurch ist auch die Abnahme der Proteinkonzentration im Bradford-Test auf unter 10 % zu erklären.

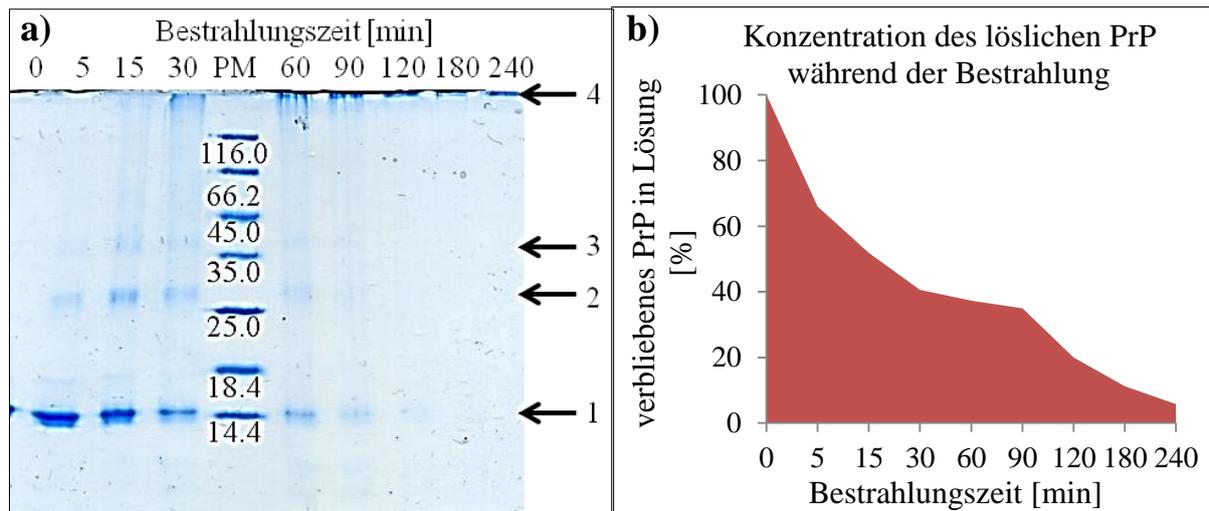


Abbildung 19: a) SDS-PAGE-Analyse (15 %, Coomassie-Färbung) und b) Proteinkonzentrationsbestimmung der UV-bestrahlten Proben des mPrP89-231. Oberhalb des Gels ist die jeweilige Bestrahlungsdauer in Minuten angegeben. Zu Beginn der Bestrahlung ist noch deutlich die Bande des monomeren mPrP89-231 (1) erkennbar. Mit zunehmender Dauer erscheinen die dem apparenten Molekulargewicht nach „dimeren“ (2) und „trimeren“ (3) intermediären Zwischenstufen, die schließlich in die oligomeren Proteinaggregate (4) umgewandelt werden. Das Molekulargewicht des Proteinmarkers (PM) ist in kDa angegeben. Gleichzeitig nimmt die Konzentration des löslichen PrP im zentrifugierten Überstand der Proben mit zunehmender Bestrahlungszeit annähernd exponentiell ab, wie mittels Bradford-Test bestimmt wurde.

Um die erfolgte Konformationsänderung des Proteins nachzuweisen, wurden CD-Spektren von mPrP89-231 vor und nach der UV-Bestrahlung aufgenommen, welche die Änderung der Sekundärstruktur von vorwiegend α -helikal in β -Faltblatt-reich deutlich sichtbar bestätigen (Abbildung 20).

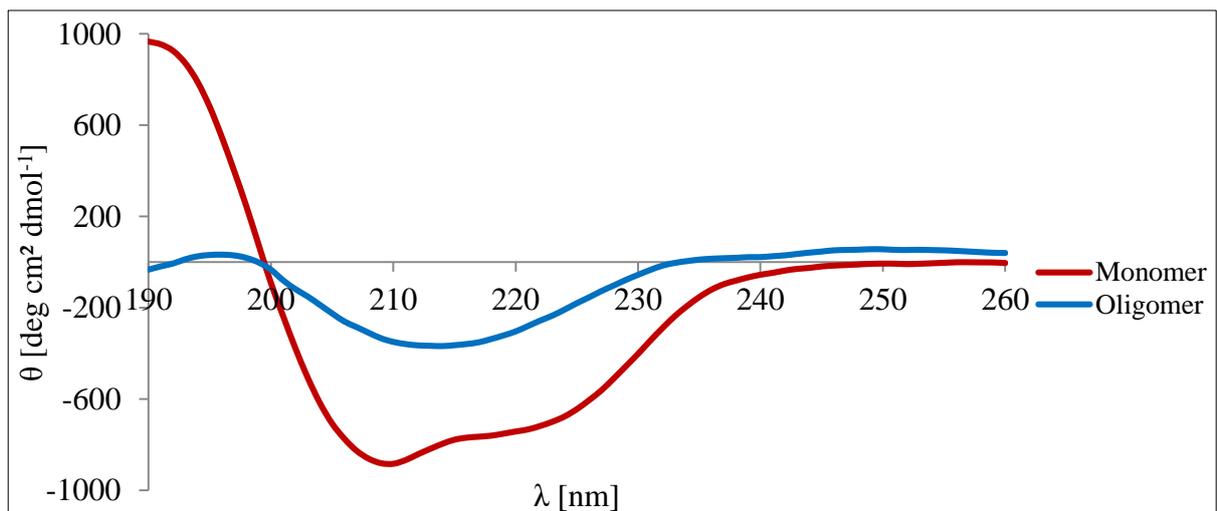


Abbildung 20: CD-Spektren des mPrP89-231 vor (rot) und nach 240 Minuten Bestrahlung mit UVB-Licht (blau). Das für das vorwiegend α -helikale monomere PrP charakteristische CD-Signal (rot) verändert sich signifikant. Nach Bestrahlung wird ein CD-Signal erhalten, welches charakteristisch für dominierende β -Faltblatt-Strukturen (blau) ist und dem oligomeren PrP zugeordnet wurde.

Bei den vergleichbaren Bestrahlungsversuchen mit hPrP90-230+EFEA sowie hPrP90-230 mit und ohne His-Tag wurde festgestellt, dass das monomere hPrP je nach Konstrukt schon nach 45 bis 90 Minuten mittels Coomassie gefärbter SDS-PAGE (nicht abgebildet) kaum noch visualisierbar ist. Des Weiteren wurden die zu bestimmten Zeitpunkten abgenommenen Proben eines Bestrahlungsversuches mit hPrP90-230+EFEA mittels CD-Spektroskopie untersucht. Dabei wird mit steigender Bestrahlungszeit und zunehmendem Anteil an PrP-Oligomer (ab etwa 30 Minuten) eine Verschiebung des CD-Signals der dominierenden α -helikalen zur β -Faltblatt-reichen Struktur erkennbar (Abbildung 21).

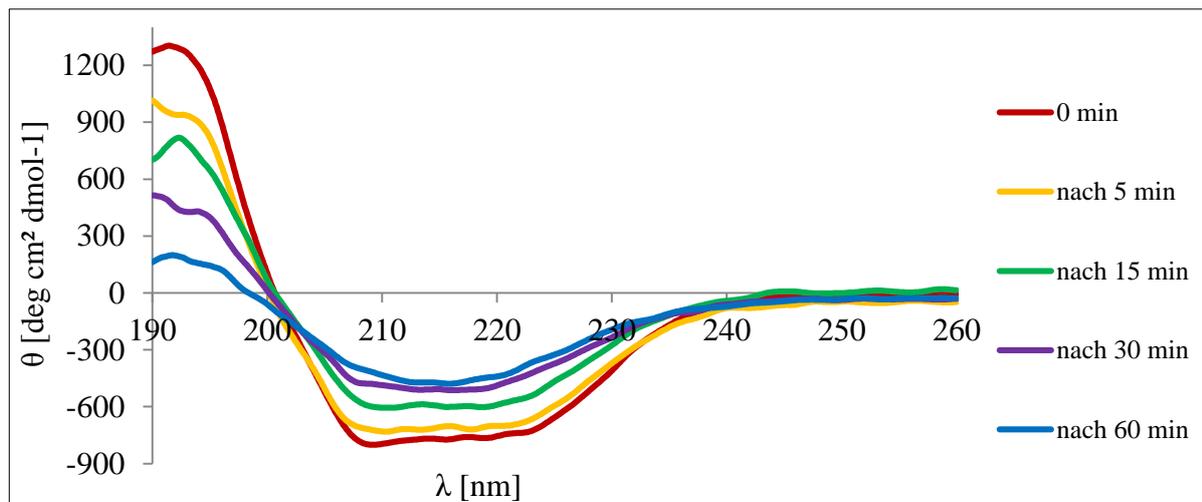


Abbildung 21: CD-Spektren des hPrP90-230 vor (rot) sowie nach 5 (gelb), 15 (grün), 30 (lila) und 60 Minuten (blau) Bestrahlung mit UVB-Licht. Das für das vorwiegend α -helikale monomere PrP charakteristische CD-Signal (rot) verändert sich signifikant. Nach 60-minütiger Bestrahlung wird ein CD-Signal erhalten, welches charakteristisch für die dominierenden β -Faltblatt-Strukturen (blau) des oligomeren PrP ist.

Zur grundlegenden strukturellen Charakterisierung der nach UVB-Bestrahlung erhaltenen Oligomere von mPrP89-231 sowie hPrP90-230+EFEA mit und ohne Hexahistidinsequenz wurden die Proteine zunächst konzentriert, die Monodispersität der Lösungen mittels DLS-Messung überprüft und anschließend wurden SAXS-Messungen durchgeführt. Aus den erhaltenen Daten wurde mit Hilfe des Programmes GNOM der Trägheitsradius (R_g) und die maximale Größe der Partikel (D_{max}) bestimmt. Mit dem Programm PyMOL (2006, v0.99) wurden Modelle der verschiedenen Oligomere dargestellt.

Für die Oligomere aus mPrP89-231 wurde ein Trägheitsradius (R_g) von $6,2 \pm 0,6$ nm ($R_H = 8,0$ nm) und eine maximale Molekülgröße (D_{max}) von $23,3 \pm 4$ nm bestimmt. Das aus den SAXS-Daten ermittelte Molekulargewicht lag bei 248 kDa. Außerdem wurde mittels DLS-Messung ein hydrodynamischer Radius der Oligomere von $8,7 \pm 0,5$ nm ermittelt, dieser kann mit dem Trägheitsradius in Beziehung gesetzt werden (Formel 2).

$$R_g = R_H / \sqrt{5/3}$$

Formel 2: Abschätzung des Trägheitsradius (R_g) eines Proteinmoleküls aus dem ermittelten hydrodynamischen Radius (R_H).

Dadurch ergibt sich ein ungefährer theoretischen Trägheitsradius von 6,7 nm, welcher gut mit dem durch SAXS-Messung ermittelten R_g -Wert übereinstimmt (Abbildung 22).

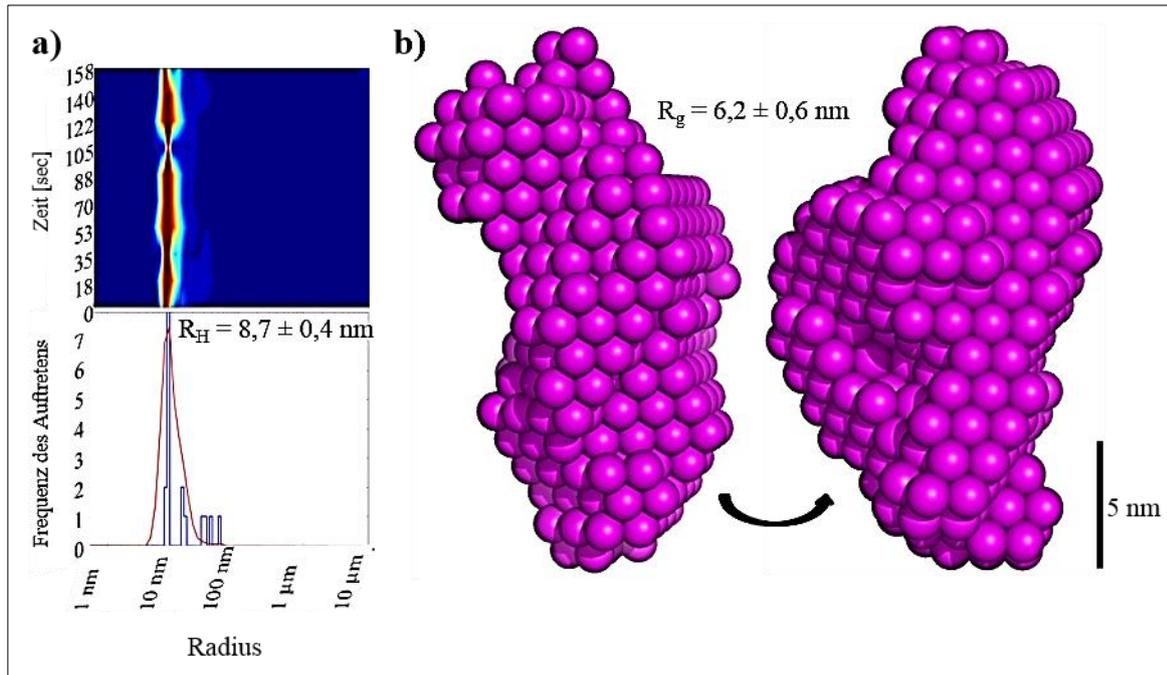


Abbildung 22: a) Durch statische DLS-Messung bestimmte Radienverteilung und Histogramm der für 240 Minuten mit UVB-Licht bestrahlten mPrP89-231-Lösung nach Konzentration. b) Aus den aufgenommenen SAXS-Daten wurde ein grundlegendes, raumerfüllendes Strukturmodell des mPrP89-231 Oligomers bei niedriger Auflösung berechnet, welches mittels PyMOL (2006, v0.99) dargestellt wurde.

Für das hPrP90-230+EFEA-Oligomer wurde aus den SAXS-Daten ein Trägheitsradius (R_g) von $10,8 \pm 0,4$ nm ($R_H = 13,9$ nm), eine maximale Molekülgröße (D_{max}) von $37,3 \pm 5,3$ nm und ein Molekulargewicht von etwa 1 525 kDa bestimmt. Der durch statische DLS-Messung ermittelte hydrodynamische Radius lag bei $17 \pm 2,8$ nm, daraus ergibt sich ein abgeschätzter theoretischer Trägheitsradius von 13,2 nm (Abbildung 23).

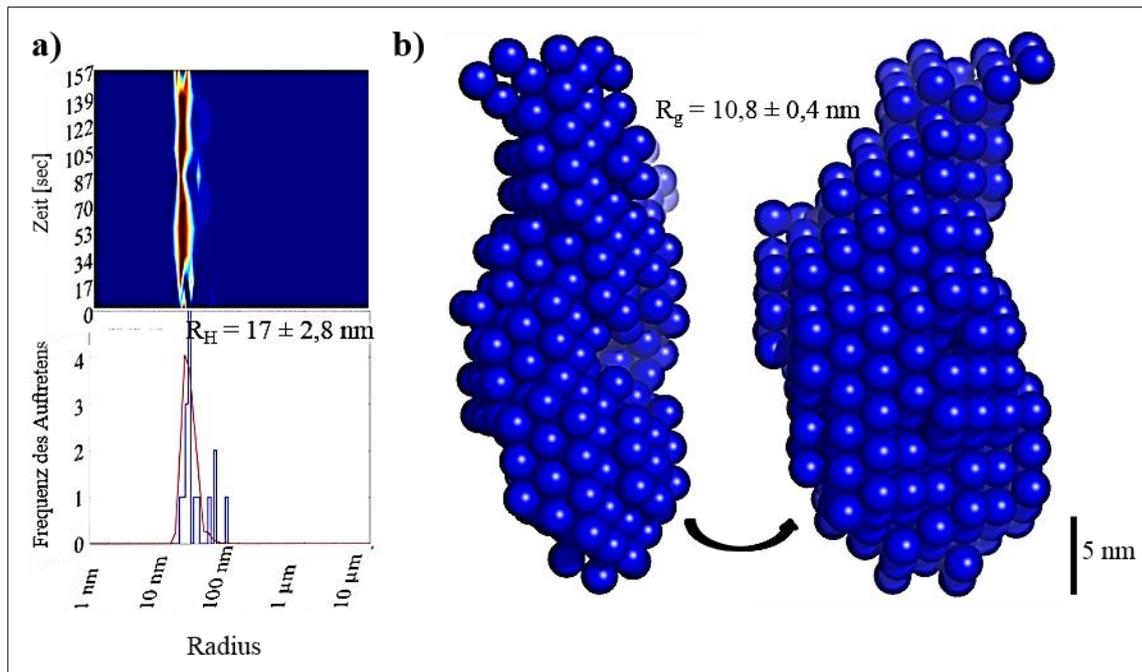


Abbildung 23: a) Durch statische DLS-Messung bestimmte Radienverteilung und Histogramm der für 45 Minuten mit UVB-Licht bestrahlten hPrP90-230+EFEA-Lösung nach Konzentration. b) Aus den aufgenommenen SAXS-Daten wurde ein grundlegendes, raumerfüllendes Strukturmodell des hPrP90-230+EFEA-Oligomers bei niedriger Auflösung berechnet, welches mittels PyMOL (2006, v0.99) dargestellt wurde.

Das Oligomer des hPrP90-230+EFEA mit Hexahistidinsequenz wies einen Trägheitsradius (R_g) von $12,5 \pm 0,2 \text{ nm}$ ($R_H = 16,1 \text{ nm}$), eine maximale Größe des Proteins (D_{\max}) von $42,4 \pm 6,6 \text{ nm}$ und ein Molekulargewicht von etwa 2 906 kDa auf. Der zugehörige hydrodynamische Radius war mit $18 \pm 0,3 \text{ nm}$ nicht viel größer als bei dem hPrP90-230+EFEA ohne His-Tag und es ergibt sich daraus ein abgeschätzter theoretischer Trägheitsradius von 13,9 nm (Abbildung 24).

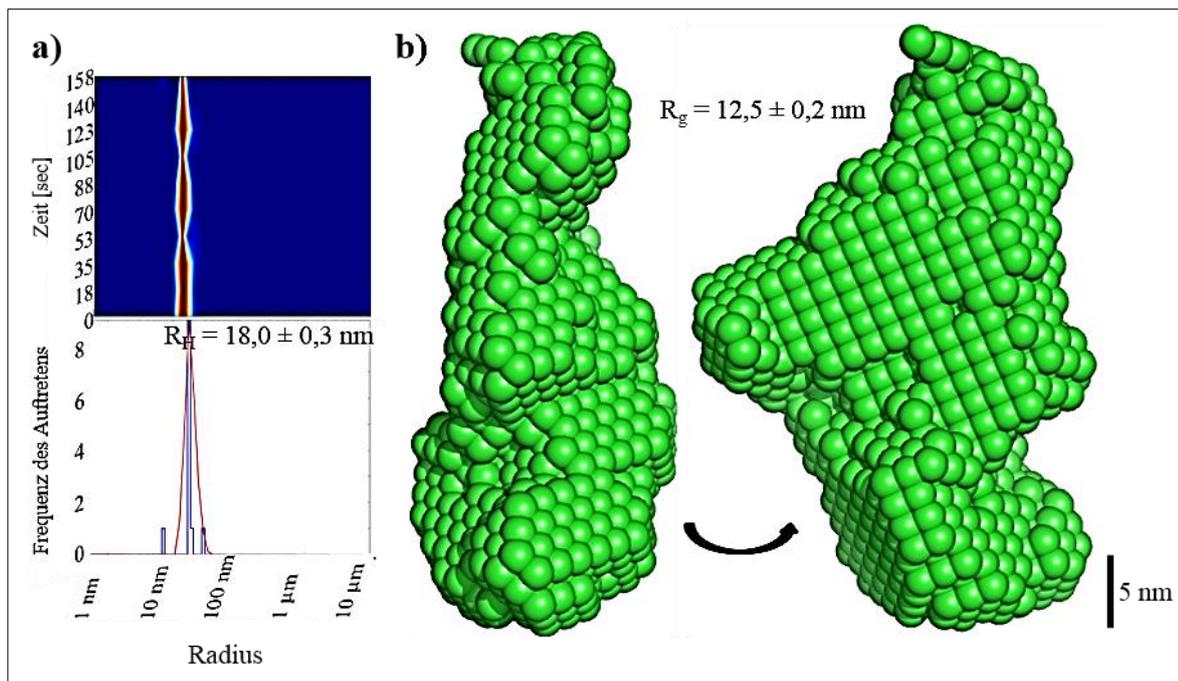


Abbildung 24: a) Durch statische DLS-Messung bestimmte Radienverteilung und Histogramm der für 90 Minuten mit UVB-Licht bestrahlten hPrP90-230+EFEA+His-Lösung nach Konzentration. b) Aus den aufgenommenen SAXS-Daten wurde ein grundlegendes, raumerfüllendes Strukturmodell des hPrP90-230+EFEA+His-Oligomers bei niedriger Auflösung berechnet, welches mittels PyMOL (2006, v0.99) dargestellt wurde.

Bei den drei Oligomer-Lösungen handelte es sich nicht um heterogene Mischungen verschiedener Oligomere, denn die Lösungen waren sehr monodispers und besaßen eine geringe Peak-Breite im DLS, was in allen Fällen für eine sehr homogene Lösung spricht.

Das oligomere mPrP war sowohl nach den Ergebnissen der DLS-Messungen als auch nach denen der SAXS-Auswertung das kleinste Molekül, welches, basierend auf dem aus den SAXS-Daten berechneten Molekulargewicht, aus etwa 15 PrP-Monomeren aufgebaut sein könnte. Die Ergebnisse der DLS- und SAXS-Messungen des oligomeren humanen PrP mit und ohne Hexahistidinsequenz unterschieden sich nur leicht. Da das Protein mit Hexahistidinsequenz durch die zusätzlichen aber vermutlich flexibleren Aminosäurereste etwas größer ist, waren sowohl das Molekulargewicht als auch die maximale Partikelgröße leicht erhöht. Für diese Oligomere wurde ein Aufbau aus etwa 95 (ohne His-Tag) bzw. 138 (mit His-Tag) humanen PrP-Monomeren abgeschätzt. Der geringere Radius des mPrP-Oligomers kann folglich aus der geringeren Anzahl an Monomeren resultieren, die das Molekül aufbauen, allerdings ist auch eine generell kompaktere Struktur des oligomeren mPrP denkbar.

Damit wurde bewiesen, dass das Setup zur UV-induzierten Umwandlung reproduzierbare PrP-Oligomere mit einer β -Faltblatt-reichen Struktur liefert, bei stetiger Abnahme der monomeren Proteine in Lösung. In Abhängigkeit von der PrP-Spezies unterscheiden sich die PrP-

Oligomere. Um weitere Erkenntnisse über den UV-induzierten Umwandlungsprozess des PrP zu erlangen, wurden anschließend bestimmte Parameter der Bestrahlung variiert und die Auswirkung auf die Umwandlung des PrP untersucht.

3.4.1.4. Einfluss der Laserleistung auf die UV-induzierte Prion-Protein-Umwandlung

Die Bestrahlung des hPrP90-230+EFEA+His wurde außerdem mit den Laserleistungen 9 und 18 mW bei einer Wellenlänge von 284 nm durchgeführt, um die direkten Auswirkungen der Laserleistung auf die Umwandlung bzw. Aggregation dieses PrP-Konstruktes zu analysieren. Bei einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 5,0 mL/min nahm die gemessene Transmission hinter der Küvette bei beiden angelegten Laserleistungen exponentiell mit der Bestrahlungszeit ab (Abbildung 25). Zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test wurden Proben nach 0, 5, 15, 30, 60 und 90 Minuten entnommen. Die an den Messköpfen gemessene Abnahme der Transmission korrelierte direkt mit der Abnahme der Prion-Proteinkonzentration in der Lösung, was folglich auf eine UVB-induzierte Aggregation der Proteine hindeutete. Bei einer Laserleistung von 18 mW war die Transmission nach 30 Minuten kaum noch messbar. Nach 5-minütiger UVB-Bestrahlung waren noch 87 % des Ausgangsproteins in Lösung, während sich nach 30 Minuten ein in etwa konstanter Wert um 60 % einstellte. Somit erfolgte die strukturelle Umwandlung des PrP unter diesen Bedingungen innerhalb der ersten 30 Minuten und das verbliebene Protein in Lösung war im Anschluss nahezu stabil. Aus der Abnahme der Laserleistung und der Proteinkonzentration wurde die entsprechende Halbwertszeit für die Energieübertragung bei 18 mW mit $T_{1/2}=12$ min bestimmt. Bei einer Laserleistung von 9 mW erfolgte die Abnahme der Leistung- und Proteinkonzentration langsamer. Die entsprechende Halbwertszeit der Energieübertragung bei 9 mW lag bei 25 Minuten, was in etwa einer Verdopplung der Halbwertszeit entspricht. Die Proteinkonzentrationsabnahme im Bradford-Test zeigte bei der Bestrahlung mit einer Leistung von 9 mW, dass nach 15 Minuten noch 94 % des PrP in Lösung waren, während sich erst nach 90 Minuten eine konstante Proteinkonzentration von etwa 60 % in Lösung einstellte.

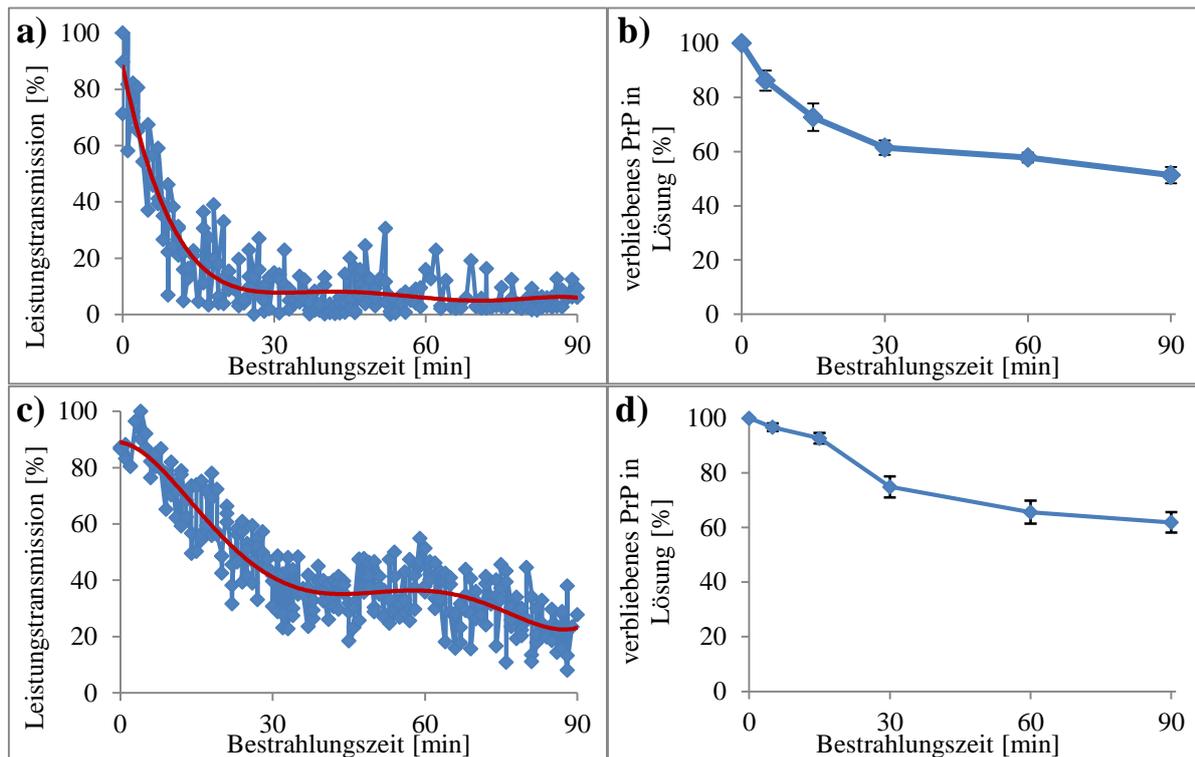


Abbildung 25: Zeitaufgelöste Untersuchung der UVB-induzierten Aggregation von hPrP90-230+EFEA mit His-Tag bei einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 5,0 mL/min. Die Proben wurden mit UVB-Licht der Wellenlänge 284 nm bei Raumtemperatur bestrahlt. Die prozentuale Abnahme der am Messkopf aufgezeichneten Transmission hinter der Küvette (blau) wurde bei einer Laserleistung von a) 18 mW und c) 9 mW bestimmt. Die rote Kurve ist interpoliert. Zusätzlich wurde die prozentuale Menge an löslichem Protein im zentrifugierten Überstand der Proben mittels Bradford-Test (N=3) ermittelt, die nach 0, 5, 15, 30, 60 und 90 Minuten Bestrahlung bei einer Laserleistung von b) 18 mW und d) 9 mW entnommen wurden.

Aufgrund der direkten Korrelation der Konzentrationsabnahme des PrP in Lösung und der Abnahme der gemessenen Transmission hinter der Küvette kann diese folglich als ein direktes Maß für die UV-induzierte Umwandlung bzw. Aggregation des PrP in Lösung angesehen werden. Durch die Verdoppelung der Laserleistung wird die Halbwertszeit der Umwandlung des PrP in Lösung nahezu halbiert, folglich kann bei höheren Laserleistungen die Konformationsänderung effektiver induziert und der Zeitaufwand verringert werden.

Während der Bestrahlungsexperimente mit den Laserleistungen 9 und 18 mW wurden online DLS-Messungen durchgeführt, um Veränderungen der hydrodynamischen Radien des PrP in der zirkulierenden Lösung (5,0 mL/min) direkt zu beobachten und somit die Grundlage der exponentiellen Abnahme der Proteinkonzentration in Lösung zu ermitteln. Da sich das Auftreten größerer Aggregate auch durch eine starke Erhöhung der Streuintensitäten bzw. der als Zählrate beschriebenen Signalstärke der DLS-Messung bemerkbar macht, sollte insbesondere diese verglichen werden. Dieser Parameter ist direkt von der Partikelgröße in Lösung abhängig. Je größer die Moleküle, umso intensiver das zugehörige Streusignal. Folglich

kann die zeitliche Analyse der Zählrate Einblicke in den Aggregationsverlauf des PrP geben. Bei einer monomeren PrP-Konzentration von $44 \mu\text{M}$ wurde vor der Bestrahlung im statischen Zustand bei einer Zählrate von $5,0 \pm 0,8 \text{ kHz}$ ein hydrodynamischer Radius von $2,3 \pm 0,3 \text{ nm}$ bestimmt, welcher mit dem entsprechenden publizierten Wert übereinstimmt (Redecke *et al.*, 2006).

Bei einer Laserleistung von 18 mW nahm die DLS-Zählrate innerhalb von 5 Minuten um den Faktor acht zu, anschließend erfolgte ein weiterer exponentieller Anstieg um den Faktor 15 (Abbildung 26a). Nach 30-minütiger Bestrahlung wurde dann ein stationärer Zustand erreicht, der bis zum Ende der Bestrahlung nach 90 Minuten stabil war. Erwartungsgemäß korrelierte der Anstieg der Zählrate direkt mit der Aggregation des PrP. Während die Radienverteilung in der Lösung nach 5 Minuten heterogen war und ein hydrodynamischer Radius von $20,7 \pm 2,6 \text{ nm}$ dominierte (Abbildung 27), wurde die Teilchengröße nach 30-minütiger Bestrahlung homogener und die SDS-PAGE-Analyse (Abbildung 26c) zeigte nach 60 Minuten nur noch eine hochmolekulare Proteinbande, die den oligomeren Strukturen in der Lösung zugeordnet wurde. Nach 90 Minuten lag eine stabile monodisperse Lösung von hPrP90-230+EFEA+His-Aggregaten mit einem spezifischen hydrodynamischen Radius von $17,0 \pm 0,6 \text{ nm}$ vor (Abbildung 27). Der zeitliche Verlauf der Zunahme der Zählrate und des hydrodynamischen Radius des PrP in Lösung konnte direkt mit der gemessenen Transmission (Abbildung 25a) sowie der mittels SDS-PAGE analysierten Aggregation des PrP in Beziehung gesetzt werden. Um das Signal-Rausch-Verhältnis für die gesammelten DLS-Daten zu optimieren, musste für nachfolgende Experimente die Laserleistung des integrierten DLS-Gerätes von 30 mW auf 65 mW erhöht werden. Dies führte generell zu erhöhten Zählraten im Vergleich zu denen des zuvor beschriebenen Bestrahlungsexperiments. Dennoch konnte auch bei Bestrahlung mit einer UVB-Laserleistung von 9 mW ein exponentieller Anstieg der Ausgangszählrate erkannt werden (Abbildung 26b). Übereinstimmend mit dem Abfall der Transmission (Abbildung 25c) erfolgte der Anstieg der Zählrate bei der niedrigeren Laserleistung langsamer. Die Zählrate stieg innerhalb von 5 Minuten um den Faktor fünf an, nach 30 Minuten UV-Bestrahlung war die Zählrate jedoch nur um den Faktor sechs erhöht. Während die Radienverteilung in der Lösung bei 18 mW Bestrahlungsleistung nach 5 Minuten heterogen war und ab 30 Minuten homogen wurde, ist die Radienverteilung bei 9 mW Bestrahlungsleistung bis einschließlich 90 Minuten heterogen. Es dominiert jedoch ein hydrodynamischer Radius von $23,4 \pm 1,4 \text{ nm}$ (Abbildung 28), welcher etwas größer ist als der ermittelte hydrodynamische Radius der online DLS-Messung bei 18 mW Bestrahlungsleistung. Im Gegensatz dazu sind die hydrodynamischen Radien der statischen DLS-Messungen beider Bestrahlungsleistungen

miteinander vergleichbar. Die SDS-PAGE-Analyse zeigte, dass nach 90 Minuten Bestrahlungszeit bei 9 mW Leistung neben der dominierenden Oligomer-Bande noch geringe Anteile an PrP-Monomer in Lösung vorhanden waren (Abbildung 26c). Auch in diesem Fall kann der zeitliche Verlauf der Zunahme der Zählrate und des hydrodynamischen Radius des PrP in Lösung direkt mit der gemessenen Transmission (Abbildung 25c) sowie der mittels SDS-PAGE analysierten Aggregation des PrP in Beziehung gesetzt werden.

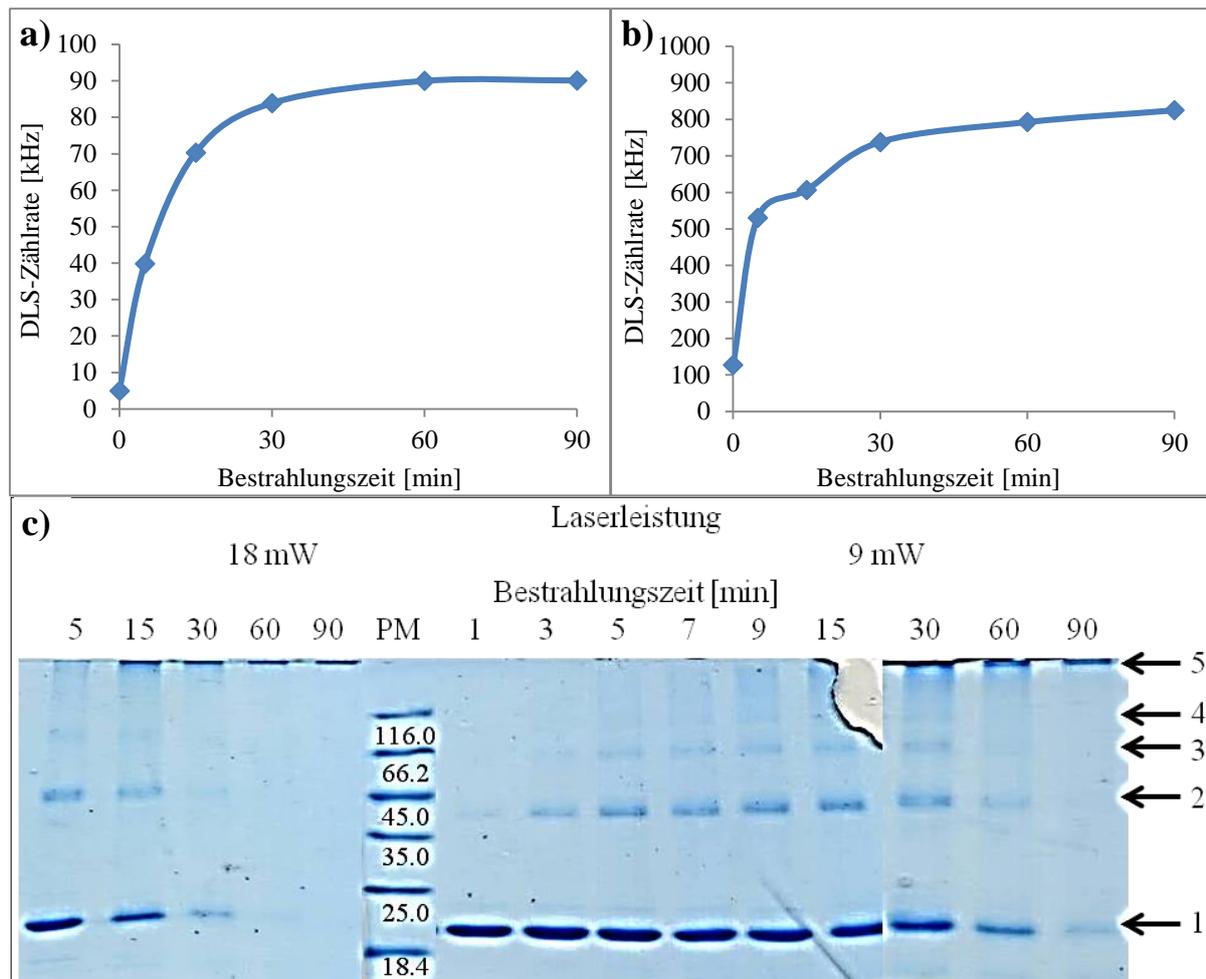


Abbildung 26: Zeitaufgelöste Untersuchung der DLS-Zählraten im Fluss (5,0 mL/min) während der UVB-Bestrahlung von 44 µM hPrP (90-230+EFEA+His) mit einer Laserleistung von a) 18 mW sowie b) 9 mW. c) Die SDS-PAGE-Analyse (15 %, Coomassie-Färbung) der während der Bestrahlungen entnommenen Proben zeigt die zeitliche Umwandlung der dem apparenten Molekulargewicht nach monomeren (1), „dimeren“ (2), „trimeren“ (3) und „tetrameren“ (4) Form des PrP in die spezifischen Oligomere (5). Oberhalb des Gels sind die zugehörige Laserleistung sowie die jeweilige Bestrahlungszeit angegeben. Das Molekulargewicht des Proteinmarkers (PM) ist in kDa angegeben.

Bei beiden Bestrahlungsexperimenten (9 mW und 18 mW) konnten übereinstimmend mittels DLS-Messung und SDS-PAGE-Analyse PrP-Oligomere als finale Aggregationsprodukte nachgewiesen werden. Dabei entstanden im Verlauf der Bestrahlung auch intermediäre Zwischenprodukte, die nach längerer Bestrahlungsdauer nicht mehr nachweisbar waren. Bei

einer Laserleistung von 18 mW sind bereits ab einer 5-minütigen Bestrahlungszeit, was etwa acht Umläufen im Flusssystem entspricht, Proteinbanden auf dem SDS-Gel zu erkennen, deren zugeordnetes Molekulargewicht auf „dimere“ und „trimere“ Intermediate hindeutet. Diese Banden sind bis zu einer Bestrahlungszeit von 30 Minuten detektierbar.

Bei der geringeren Laserleistung von 9 mW konnten trotz einer verringerten Umwandlungsrate ebenfalls nur die oligomeren PrP-Strukturen mittels DLS nachgewiesen werden. Intermediate mit hydrodynamischen Radien zwischen denen des monomeren und oligomeren PrP waren nicht erkennbar. Selbst bei einem Bestrahlungsversuch mit einer Laserleistung von 4 mW, bei der sich das „Dimer“ schon ab einer 3-minütigen Bestrahlungszeit bildete, was fünf Umläufen im Flusssystem entsprach, und das „Trimer“ nach 9-minütiger Bestrahlung entstand, was etwa 15 Umläufen entsprach, konnte kein anderes Ergebnis erzielt werden. Als Grund dafür wurde zunächst angenommen, dass die großen Oligomere das Licht des Lasers viel effizienter streuen als die kleineren Zwischenprodukte und dadurch die DLS-Signale der kleineren Moleküle überlagern.

Es wurden bei beiden Laserleistungen statische DLS-Messungen nach dem Stoppen des Flusses nach 0, 5, 15, 30, 60 sowie 90 Minuten durchgeführt und Proben abgenommen. Die Proben wurden zentrifugiert, um unlösliche Aggregate vom löslichen PrP zu trennen, bevor eine erneute statische DLS-Messung erfolgte. Zu allen Zeitpunkten war eine sehr geringe Differenz zwischen den mittels DLS im Fluss und im statischen Zustand gemessenen hydrodynamischen Radien zu verzeichnen, wobei die im statischen DLS gemessenen Radien generell etwas kleiner waren. Die Probe nach 5-minütiger Bestrahlung (18 mW) wich im online DLS aufgrund der sehr heterogenen Zusammensetzung deutlich ab (Abbildung 27).

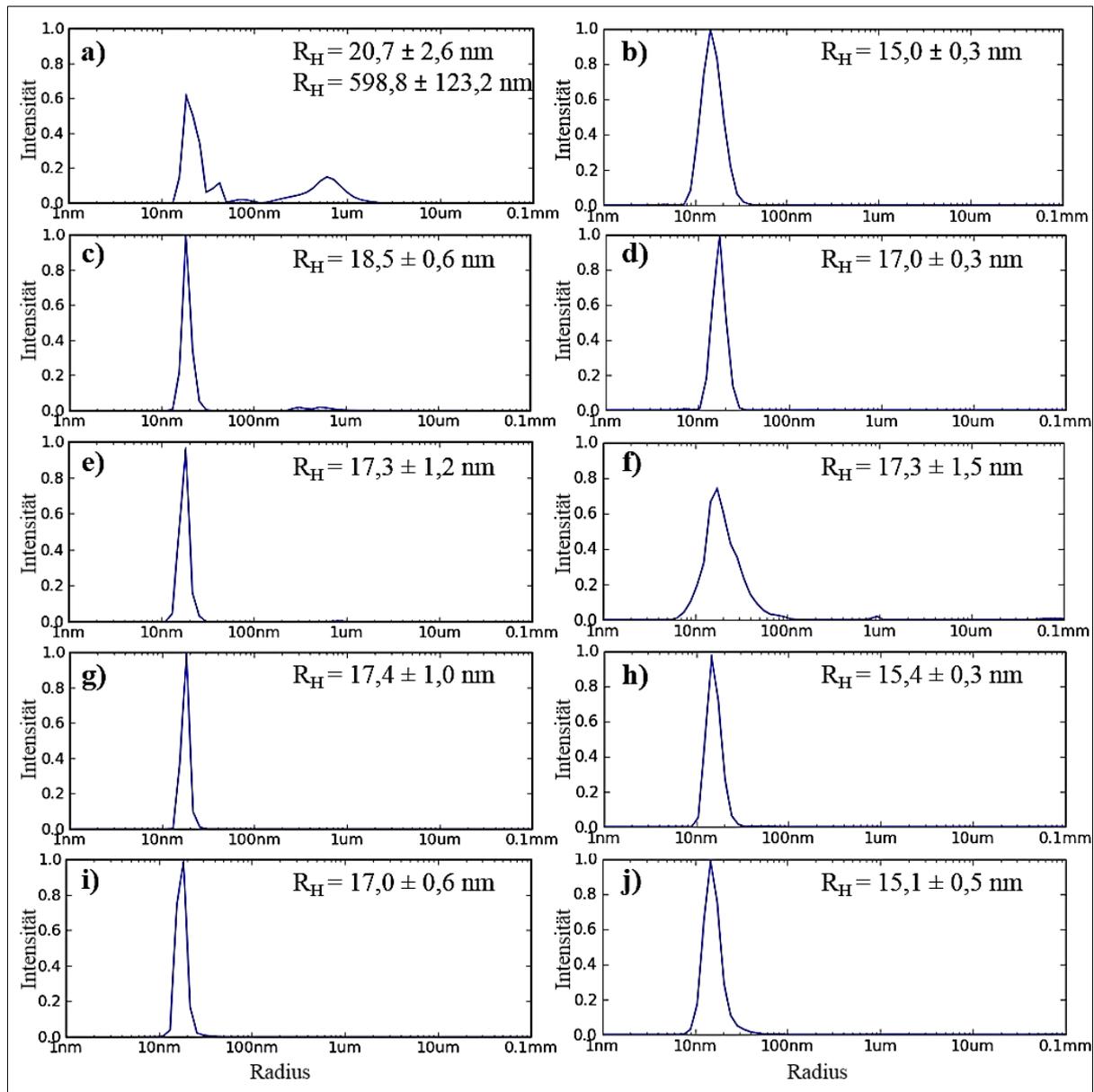


Abbildung 27: Vergleich der Radienverteilung des humanen PrP 90-230+EFEA+His in Lösung während der UVB-Bestrahlung mit einer Laserleistung von 18 mW, ermittelt mittels statischer (rechts) und online DLS-Messung (links). Bei der online DLS-Messung wurden die Radien während der Bestrahlung nach a) 5, c) 15, e) 30, g) 60 und i) 90 Minuten im konstanten Fluss gemessen, während für die statischen DLS-Messungen Proben nach b) 5, d) 15, f) 30, h) 60 und j) 90 Minuten Bestrahlung entnommen und zentrifugiert wurden (20 000 x g, 4 °C, 45 Minuten). Anschließend erfolgten die DLS-Messungen des Überstands.

Zusätzlich wurden mittels online DLS-Messung weitere hydrodynamische Radien in der Lösung identifiziert, die über 240 nm lagen.

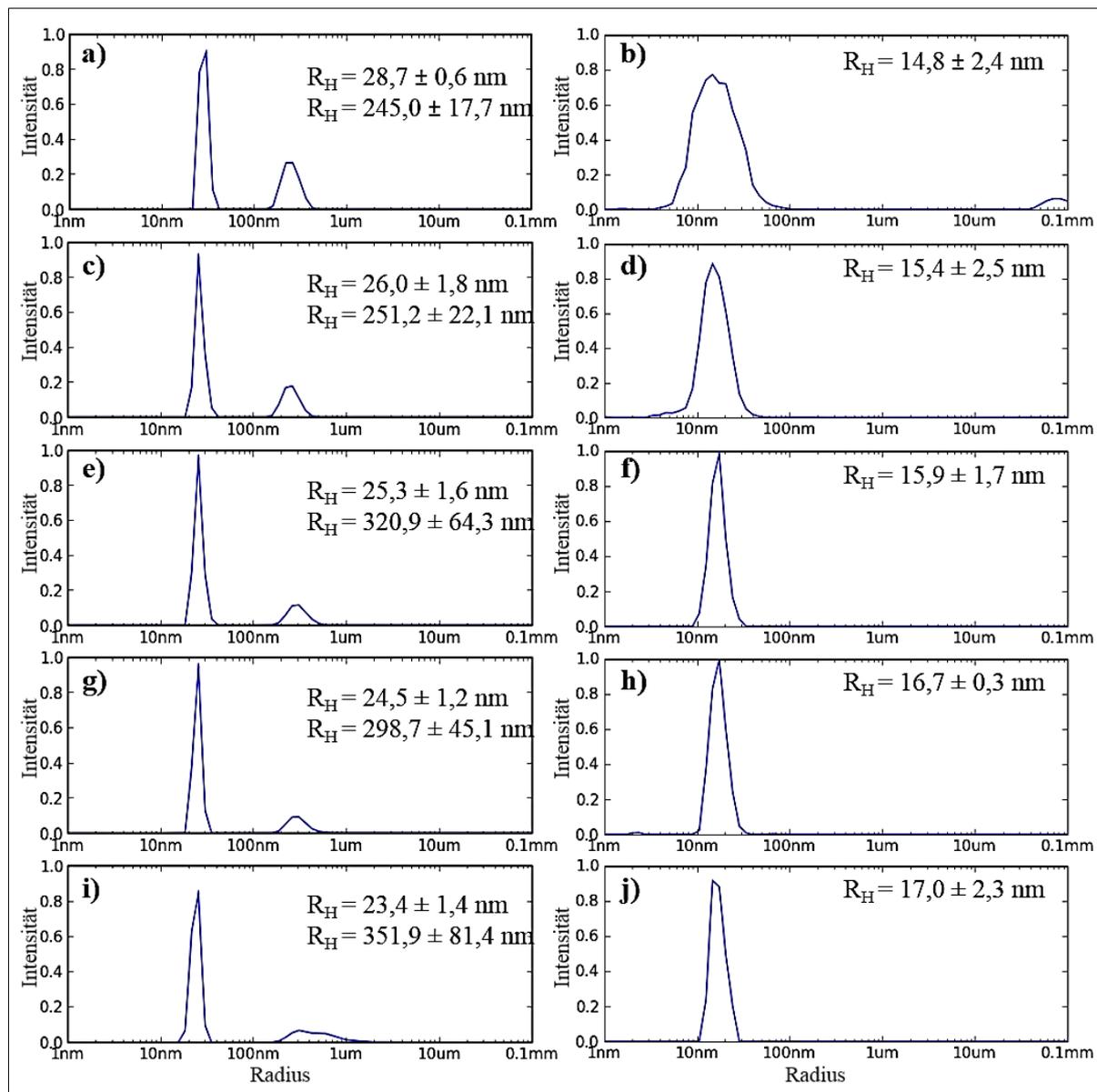


Abbildung 28: Vergleich der Radienverteilung des humanen PrP 90-230+EFEA in Lösung während der UVB-Bestrahlung mit einer Laserleistung von 9 mW, ermittelt mittels statischer (rechts) und online DLS-Messung (links). Bei der online DLS-Messung wurden die Radien während der Bestrahlung nach a) 5, c) 15, e) 30, g) 60 und i) 90 Minuten im konstanten Fluss gemessen, während für die statischen DLS-Messungen Proben nach b) 5, d) 15, f) 30, h) 60 und j) 90 Minuten Bestrahlung entnommen und zentrifugiert wurden (20 000 x g, 4 °C, 45 Minuten). Anschließend erfolgten die DLS-Messungen im Überstand.

Die Heterogenität der hydrodynamischen Radien während der online DLS-Messungen wurde zunächst auf die Auswirkungen des laminaren Flusses und möglicher Proteinpräzipitate zurückgeführt, wie sich jedoch im weiteren Verlauf der Arbeit herausstellte, könnte auch eine andere Ursache dafür verantwortlich sein (siehe Abschnitt 3.4.2. Herstellung der intermediären Zwischenzustände).

Die online DLS-Messungen waren hilfreich, um den Verlauf der Umwandlung des monomeren PrP in das spezifische Oligomer zu beobachten. Allerdings zeigte sich, dass die

hydrodynamischen Radien mittels statischer DLS-Messung genauer bestimmt werden konnten. Wenn zukünftig eine entsprechende Software für die Auswertung der online DLS-Messungen zur Verfügung steht, welche den laminaren Fluss als weiteren Parameter in die Berechnung der hydrodynamischen Radien einbezieht, ist allerdings eine grundlegende Übereinstimmung der mittels online und statischer DLS-Messungen bestimmten Radien zu erwarten.

3.4.2. Herstellung der intermediären Zwischenzustände

Bei allen bisherigen Bestrahlungsversuchen wurde durch die SDS-PAGE-Analyse deutlich, dass das PrP im Verlauf der UV-Bestrahlung anscheinend intermediäre Zwischenzustände ausbildet, die aufgrund des apparenten Molekulargewichts als „Dimere“, „Trimere“ und „Tetramere“ des PrP eingestuft wurden. Um insbesondere die intermediären Zwischenzustände zu analysieren und somit den Prozess der Umwandlung besser verstehen zu können, wurden die Bestrahlungsexperimente mit einem modifizierten Setup durchgeführt (Abbildung 29).

Für die Produktion des Intermediates, welches durch eine Bande zwischen 35-40 kDa auf dem SDS-Gel identifiziert wurde und daher nachfolgend als „PrP-Dimer“ bezeichnet wird, wurde auf das DLS-Gerät im Versuchsaufbau verzichtet, ebenso wurde anstelle der Bestrahlungsküvette eine Durchflusskapillare mit einem Durchmesser von 1 mm verwendet. Beide Modifikationen sollten die Verwirbelung und die Ablagerung von Aggregaten, die in der Küvette nicht auszuschließen waren, maximal reduzieren. Da das Totvolumen des Systems reduziert wurde, konnte das verwendete Probenvolumen auf 3,0 mL herabgesetzt werden. Die Laserleistung vor und die Transmission hinter der Kapillare wurden auch bei diesem Versuchsaufbau aufgezeichnet. Die Bestrahlung erfolgte im UVB-Bereich bei einer konstanten Wellenlänge von 284 nm und mit einer Proteinkonzentration des hPrP90-230 mit Hexahistidinsequenz von 1,06 mg/mL (50 µM) in 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,0).

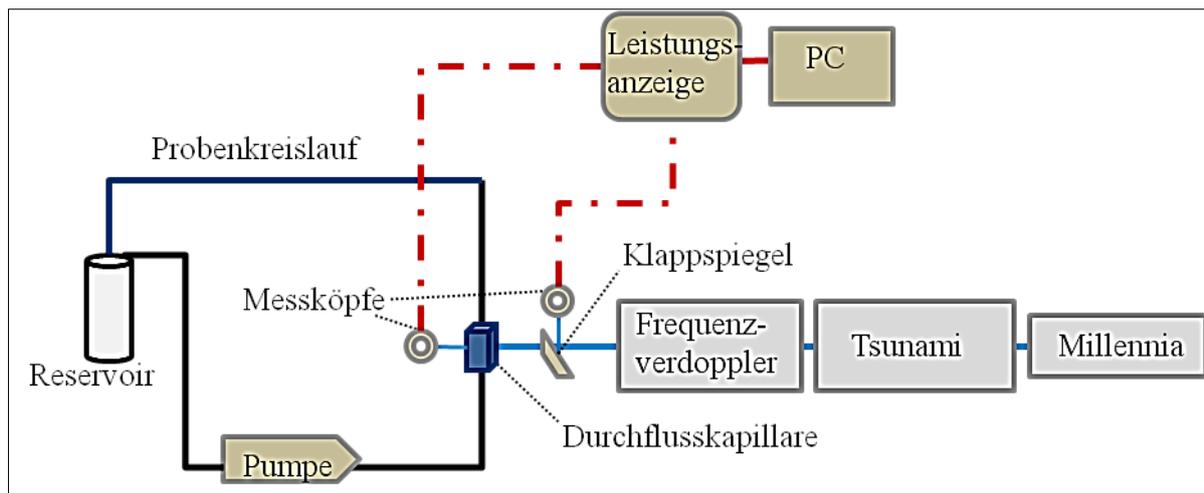


Abbildung 29: Optimierter Versuchsaufbau zur UV-induzierten Umwandlung des PrP. Die Proteine wurden von einem Tsunami-Laser, welcher ein gepulster Titan:Saphir-Laser ist, mit Frequenzverdoppler bzw. -verdreifacher bestrahlt. Aus dem Reservoir gelangte die Proteinlösung durch die peristaltische Pumpe über die Durchflusskapillare zurück ins Reservoir. Mit den Messköpfen vor und hinter der Bestrahlungsküvette wurde die Leistung des Lasers kontinuierlich aufgezeichnet.

Es wurden zunächst drei Testläufe mit dem optimierten Versuchsaufbau durchgeführt, um die Ergebnisse des vorherigen Setups mit integriertem DLS-Gerät zu reproduzieren. Anschließend sollten die Bestrahlungsparameter bezüglich einer maximalen Ausbeute an „PrP-Dimer“ optimiert werden. Um die Umwandlung der „PrP-Dimere“ in höhere Zwischenzustände bzw. in die spezifischen Oligomere zu minimieren, musste die Bestrahlungszeit kurz und die Laserleistung gering gewählt werden. Dementsprechend wurden die Parameter Pumpgeschwindigkeit, Laserleistung sowie Bestrahlungszeit variiert (Tabelle 5). Zu definierten Zeitpunkten wurden Proben entnommen und diese mittels SDS-PAGE analysiert (Abbildung 30). Auf allen Gelen sind Proteinbanden erkennbar, die dem Molekulargewicht nach dem monomeren PrP sowie den „dimeren“, „trimeren“ und „tetrameren“ Zwischenzuständen sowie den spezifischen Oligomeren entsprachen.

Bei einer Fließgeschwindigkeit von 5,0 mL/min, einer Laserleistung von etwa 10 mW und einer Bestrahlungszeit von 60 Minuten war die Ausbeute an „PrP-Dimer“ maximal. Bei höherer Laserleistung bzw. längerer Bestrahlungszeit nahm die Intensität der entsprechenden Bande im SDS-Gel ab, während Banden bei höheren Molekulargewichten zwischenzeitlich zunahm, bis auch diese wieder verschwanden und letztendlich nur noch die Bande des spezifischen Oligomers detektierbar war. Die Pumpgeschwindigkeit beeinflusste im Wesentlichen die Bildungsgeschwindigkeit der „dimeren“ Intermediate, weshalb eine möglichst hohe Fließgeschwindigkeit bevorzugt wurde.

Tabelle 5: Parameter der Testläufe des optimierten UV-Bestrahlungsaufbaus

Parameter	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3
Probenvolumen [mL]	3	3	3
Eingestellte Pumpgeschwindigkeit [mL/min]	5,60	2,80	5,60
Effektive Pumpgeschwindigkeit [mL/min]	5,06	2,56	5,06
Leistung vor der Kapillare mit Spiegel zu Beginn der Bestrahlung [mW]	10,1	10,6	20,0
Leistung direkt hinter der Kapillare zu Beginn der Bestrahlung [mW]	7,4	6,2	10,4
Leistung vor der Kapillare mit Spiegel nach der gesamten Bestrahlung [mW]	10,7	10,6	20,5
Leistung direkt hinter der Kapillare nach der gesamten Bestrahlung [mW]	6,4	4,8	9,3
Bestrahlungszeit gesamt [min]	120	240	120
Zeitpunkte der Probenentnahme nach erfolgter Bestrahlungszeit [min]	0, 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120	0, 2, 6, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240	0, 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120

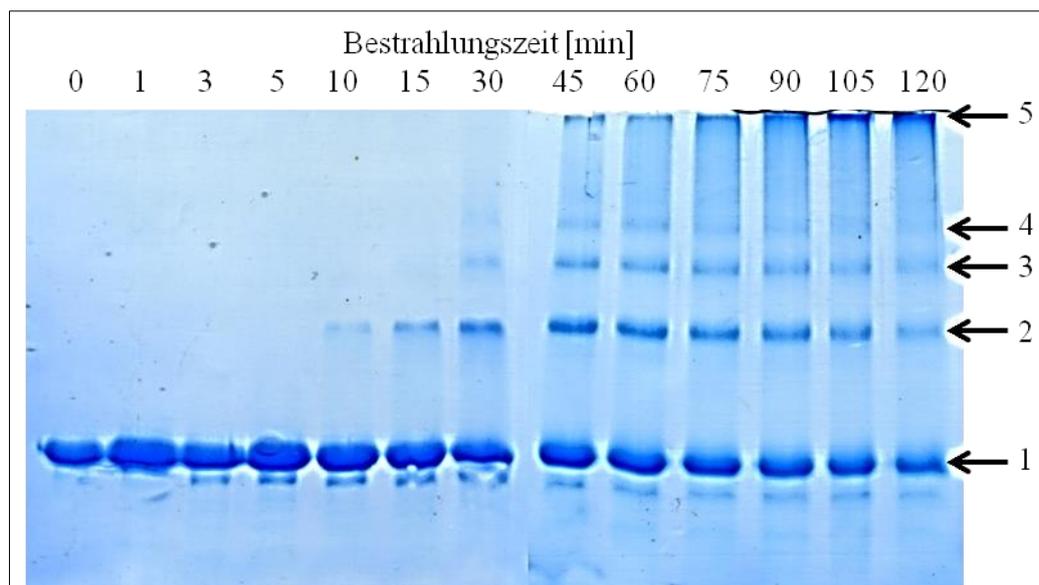


Abbildung 30: SDS-PAGE-Analyse (15 %, Coomassie-Färbung) der gebildeten PrP-Spezies während der UV-Bestrahlung unter denaturierenden Bedingungen. Das Gel des Testlaufes 3 ist als Beispiel abgebildet. Oberhalb des Gels sind die Bestrahlungszeiten in Minuten angegeben, zu denen die jeweiligen Proben entnommen wurden. Dabei konnte die Entstehung von Aggregations-Zwischenstufen des monomeren humanen PrP 90-230 (1) nachgewiesen werden, die bedingt durch das zugeordnete Molekulargewicht der Proteinbanden als „dimere“ (2), „trimere“ (3) und „tetramere“ Intermediate (4) sowie spezifische oligomere Zustände (5) klassifiziert wurden. Das Molekulargewicht des Proteinmarkers (PM) ist in kDa angegeben.

3.4.2.1. Produktionsläufe im Kreislaufsystem

Mit den ausgewählten optimalen Parametern (Tabelle 6) für die Herstellung von „PrP-Dimeren“ wurde achtmal hPrP90-230 mit Hexahistidinsequenz für 60 Minuten im zirkulierenden System bestrahlt, dabei wurde jeweils kontinuierlich die Transmission hinter der Kapillare aufgezeichnet. Der Erfolg der Bestrahlung konnte einerseits direkt durch die Abnahme der Transmission abgeschätzt werden, welche auf der Zunahme der Partikelgröße in Lösung basierte. Da es sich allerdings nur um ein kleines Aggregat mit geringem Molekulargewicht handelte, war auch nur eine geringe Abnahme der Transmission zu verzeichnen. Zur genauen Analyse wurden die zu definierten Zeitpunkten der Bestrahlung aus dem Reservoir entnommenen Proben mittels SDS-PAGE visualisiert (Abbildung 31). Für die Probenentnahme wurde der Laserstrahl durch den Klappspiegel blockiert und zeitgleich die Laserleistung vor der Kapillare gemessen.

Tabelle 6: Parameter der Produktionsläufe

Parameter	Produktionsläufe 1-8
Probenvolumen [mL]	3
Eingestellte Pumpgeschwindigkeit [mL/min]	5,60
Effektive Pumpgeschwindigkeit [mL/min]	5,06
Leistung vor der Kapillare mit Spiegel zu Beginn der Bestrahlung [mW]	9 – 11
Leistung direkt hinter der Kapillare zu Beginn der Bestrahlung [mW]	4 – 7
Leistung vor der Kapillare mit Spiegel nach der gesamten Bestrahlung [mW]	9 – 11
Leistung direkt hinter der Kapillare nach der gesamten Bestrahlung [mW]	4 – 6
Bestrahlungszeit gesamt [min]	60
Zeitpunkte der Probenentnahme nach erfolgter Bestrahlungszeit [min]	0, 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60

Durch den Vergleich der Bandenintensität mit entsprechenden Banden eines Konzentrations-eichgels konnte das „PrP-Dimer“ mit einer Konzentration von etwa 0,1 mg/mL in allen acht Läufen nachgewiesen werden (Abbildung 31). Die Proben enthielten jedoch neben dem stark dominierenden, nicht-umgewandelten monomeren PrP auch geringe Konzentrationen an „PrP-Trimeren“.

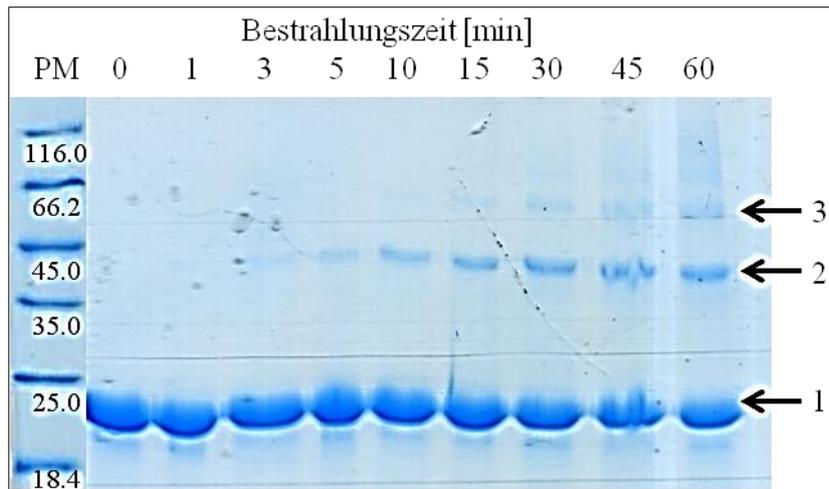


Abbildung 31: SDS-PAGE-Analyse (15 %, Coomassie-Färbung) der gebildeten PrP-Spezies des hPrP90-230+His während der UV-Bestrahlung unter denaturierenden Bedingungen. Das Gel des Produktionslaufes 1 ist als Beispiel abgebildet. Oberhalb des Gels sind die Bestrahlungszeiten in Minuten angegeben, zu denen die jeweiligen Proben entnommen wurden. Dabei konnten dem Molekulargewicht nach neben dem dominierenden hPrP90-230-Monomer (1), „dimere“ (2) und „trimere“ Intermediate (3) nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht des Proteinmarkers (PM) ist in kDa angegeben.

3.4.2.2. Produktionsläufe im Durchflusssystem

Zur Erzeugung des „PrP-Dimers“ wurde neben den Produktionsläufen im Kreislaufsystem die Herstellung in einem Durchflusssystem untersucht. Bei diesem Ansatz wurde die Proteinlösung nur einmal vom Reservoir aus durch die bestrahlte Kapillare geleitet. Die Erzeugung von höheren Intermediaten bei der Produktion im Kreislaufsystem sollte durch einmalige Bestrahlung im Durchfluss reduziert und die „PrP-Dimer“-Ausbeute maximiert werden. Neben einer deutlichen Zeitersparnis bei der Herstellung sollte so vor allem eine einfachere Reinigung des „dimeren“ Intermediates erreicht werden.

Dazu mussten erneut die optimalen Parameter für die gezielte Erzeugung des „PrP-Dimers“ bestimmt werden. Unter der Annahme, dass bei einmaliger Bestrahlung die Energie nur dann hoch genug zur Induktion der Umwandlung bei möglichst vielen PrP-Molekülen ist, wenn die Laserleistung erhöht und die Flussrate erniedrigt wird, wurden diese Parameter entsprechend variiert. Die verschiedenen Laserleistungen wurden durch Graufilter mit unterschiedlichen optischen Dichten von 0,1 bis 0,8 eingestellt. Dabei wurde die Laserleistung für die Bestrahlung mit steigender optischer Dichte des Filters herabgesetzt.

Des Weiteren wurde neben der bereits im Kreislaufsystem verwendeten Wellenlänge von 284 nm (UVB-Bereich) kurzwellige, energiereichere UVC-Strahlung mit einer Wellenlänge von 243 nm im Durchflusssystem getestet. Der Wechsel vom UVB- in den UVC-Bereich erfolgte unter der Annahme, dass die Ausbeute der „PrP-Dimere“ erhöht werden kann, indem den Molekülen zur Umwandlung höhere Photonenenergie zugeführt wird. Zusätzlich wurden

Fließgeschwindigkeiten von 0,5 bis 2,8 mL/min mit Laserleistungen zwischen 4,6 und 37 mW variiert und die gebildeten Zustände des PrP mittels SDS-PAGE analysiert.

In allen Proben war, basierend auf dem Molekulargewicht der zugeordneten Bande im SDS-Gel, sowohl das monomere PrP als auch der „dimere“ Zwischenzustand detektierbar, deren Bandenintensitäten jedoch unterschiedlich waren und bei einigen Proben war ebenso die Anwesenheit der Bande des „trimeren“ Intermediates erkennbar. Bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min waren die Banden der Intermediate insgesamt intensiver als bei höheren Fließgeschwindigkeiten ab 1,0 mL/min, wobei die Intermediat-Banden bei der jeweiligen Pumpgeschwindigkeit mit steigender Laserleistung ebenfalls intensiver wurden.

Bei hoher Laserleistung (20-37 mW) und einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min konnte durch Bestrahlung mit beiden Wellenlängen eine mit den Produktionsläufen im Kreislaufsystem vergleichbare Ausbeute des „dimeren“ Intermediates erzeugt werden. Somit war es möglich den Zeitaufwand bei der Herstellung des „dimeren“ Zwischenzustandes durch Bestrahlung im Durchflusssystem zu verringern. Bei einer hohen „PrP-Dimer“-Ausbeute wurde jedoch auch immer das „trimere“ Intermediat in der Probe detektiert. Durch Erniedrigung der Laserleistung auf Werte zwischen 10 und 20 mW bei einer Wellenlänge von 284 nm sowie durch Bestrahlung mit der kürzeren Wellenlänge (243 nm) konnten letztendlich Proteinfraktionen mit monomerem PrP und ausschließlich „dimeren“ Zwischenzuständen in ausreichender Menge erzeugt werden.

Die Optimierung der Parameter der UV-Bestrahlung für die Herstellung des „PrP-Dimers“ war sowohl im Kreislaufsystem als auch im Durchflusssystem erfolgreich. Als optimale Parameter zur Erzeugung „dimerer“ Zwischenzustände im Durchflusssystem wurde eine Wellenlänge von 243 nm, eine Pumpgeschwindigkeit von 1,5 mL/min und eine Laserleistung von 8-9 mW bestimmt (Abbildung 32).

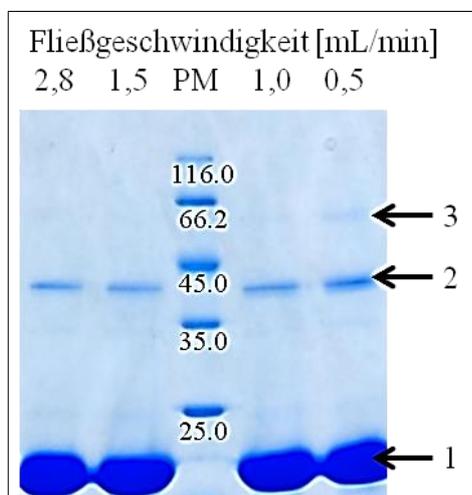


Abbildung 32: SDS-PAGE-Analyse (15 %, Coomassie-Färbung) der gebildeten PrP-Spezies während der UV-Bestrahlung im Durchflusssystem unter denaturierenden Bedingungen. Oberhalb des Gels sind die Fließgeschwindigkeiten in mL/min angegeben, bei einer Wellenlänge von 243 nm und einer Laserleistung von 8,6 mW. Basierend auf den apparenten Molekulargewichten konnte das monomere humane PrP 90-230 (1), das „PrP-Dimer“ (2) sowie bei einem Fluss von 0,5 mL/min auch das „trimere“ Intermediat (3) nachgewiesen werden. Das Molekulargewicht des Proteinmarkers (PM) ist in kDa angegeben.

3.4.2.3. Isolierung des „dimeren“ Zwischenzustandes

Um den Mechanismus der Umwandlung des PrP während der UV-Bestrahlung besser zu verstehen, sollten die erzeugten „PrP-Dimere“ isoliert und im Detail charakterisiert werden. Da die bestrahlten Proben noch einen hohen Anteil an PrP-Monomer enthielten (Abbildung 32), wurden drei verschiedene Trennverfahren getestet. Außerdem wurden mit der bestrahlten Proteinprobe Stabilitätstests in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen an Natriumchlorid und Natriumacetat durchgeführt, um geeignete Pufferbedingungen für die Trennverfahren zu überprüfen. Dazu wurde die bestrahlte Proteinprobe mit dem jeweiligen Puffer versetzt, inkubiert und zentrifugiert, um eventuelle Proteinpräzipitate als Indiz für die Instabilität des Proteins zu pelletieren. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Aufgrund der deutlich erkennbaren Pellets aus Proteinaggregaten und der SDS-PAGE-Analyse wurde festgestellt, dass die bestrahlte Proteinlösung in Natriumacetat nur bis zu einer Konzentration von 100 mM stabil ist und gegenüber Natriumchlorid keinerlei Stabilität zeigt.

Es wurde angenommen, dass das „dimere“ Intermediat wohlmöglich durch eine Strukturänderung und die damit verbundene mögliche Abschirmung von Histidin-Resten eine andere Affinität zur Ni-NTA-Agarose-Matrix aufweisen könnte als das monomere PrP. Daher wurde eine Affinitätschromatographie mit dieser Matrix über ein ÄKTA*purifier System* zur Abtrennung des PrP-Monomers durchgeführt. Zur Elution des Proteins von der Matrix wurde sowohl ein pH-Gradient als auch ein Konzentrationsgradient getestet.

Das Molekulargewicht des „PrP-Dimers“ sollte doppelt so groß wie das des monomeren PrP sein, daher wurde ebenfalls eine Trennung der beiden PrP-Spezies mittels Größenausschlusschromatographie versucht. Dazu wurden die Größenausschlusschromatographie-Säulen *HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade* und *Superose 12 10/300 GL* verwendet. Die bestrahlte Proteinprobe wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (1 mg/mL und 14,2 mg/mL).

Zusätzlich wurde die Trennung des „dimeren“ Intermediates vom monomeren PrP mittels Ionenaustauschchromatographie mit der Kationenaustauschsäule *Resource S* getestet. Durch potentielle Unterschiede in der Struktur der PrP-Spezies könnten die Oberflächen der Proteine unterschiedliche Nettoladungen aufweisen, was in diesem Fall zur Trennung ausgenutzt werden sollte.

Bei allen drei Verfahren konnte in den Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE-Analyse jedoch ausschließlich das monomere PrP detektiert werden. Sogar eine sensitivere Silberfärbung der Polyacrylamid-Gele konnte keine charakteristische Bande des „dimeren“ Zwischenzustandes

nachweisen. Folglich wurde das „PrP-Dimer“ entweder durch die chromatographischen Trennverfahren so stark verdünnt, dass es mittels SDS-PAGE nicht mehr detektierbar war, es interagierte zu stark mit dem jeweiligen Säulenmaterial oder es bildete unlösliche Aggregate. Aufgrund der erfolglosen chromatographischen Trennungsversuche wurde anschließend die Methode der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation zur Abtrennung der PrP-Monomere getestet. Die Trennung sollte hierbei durch die unterschiedliche Form und Größe des monomeren PrP und des „dimeren“ Intermediates sowie der Dichte des Lösungsmittels erfolgen. Die Ultrazentrifugation der UV-bestrahlten Probe erfolgte mit einem Konzentrationsgradienten des OptiPrep™ Dichtegradientenmediums von 5 bis 50 % und einer Geschwindigkeit von 200 000 x g bzw. 260 000 x g. Es wurden 0,5 bis 1,0 mL Fraktionen abgenommen, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und die Proteinbanden durch einen nachfolgenden, hochsensitiven Western Blot unter Verwendung eines anti-Tetra-His Antikörpers detektiert. Durch die Analyse mittels Western Blot konnte das PrP-Monomer in den ersten vier Fraktionen nachgewiesen werden, während das „dimere“ Intermediat nur in der ersten Fraktion auftrat. Eine komplette Trennung war jedoch auch mit dieser Methode nicht möglich.

Da alle Trennversuche erfolglos blieben, wurde angenommen, dass es sich bei dem unter denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE-Analyse „dimeren“ Intermediates im nativen Zustand möglicherweise doch nicht, um einen solchen handelt. Daher wurden die bestrahlten Proteinlösungen mittels einer nativen PAGE untersucht, welche die Proteine unter Bewahrung der nativen Proteinfaltung in einem Gel elektrophoretisch trennt. Dadurch sollten erste Hinweise auf die grundlegende Zusammensetzung unter nativen Bedingungen erhalten werden. Zur Größenbestimmung wurde auf den nativen Gelen das unbestrahlte monomere PrP als Vergleichsstandard aufgetragen, welches jeweils nur eine Bande aufwies und daher auch in allen anderen Gelspuren die Detektion der monomeren PrP-Bande ermöglichte. Zunächst wurde eine *blue native* PAGE mit verschiedenen Konzentrationen der UV-bestrahlten Proben durchgeführt. Die hochkonzentrierte Probe (12 mg/mL) aus dem Produktionslauf im Durchfluss (1,5 mL/min, 8-9 mW bei 243 nm) wanderte jedoch nicht ausreichend weit im elektrischen Feld, um eine Analyse zu ermöglichen. Außerdem verursacht der negativ geladene Protein-gebundene Coomassie-Farbstoff der *blue native* PAGE eine Ladungsverschiebung in den Proteinen, wodurch die Wanderung der Proteine im Gel und möglicherweise auch die nativen Strukturen beeinflusst werden. Die *clear native* PAGE ist dagegen milder, dadurch bleiben labile supramolekulare Strukturen, die unter den Bedingungen der *blue native* PAGE gelöst

werden, bestehen. Daher wurde eine *clear native* PAGE mit der UV-bestrahlten Proteinlösung (6 mg/mL) aus dem Produktionslauf im Durchfluss (1,5 mL/min, 8-9 mW bei 243 nm) durchgeführt. Im zugehörigen Gel konnten drei Proteinbanden zusätzlich zur monomeren PrP-Bande detektiert werden, während die gleiche Probe bei denaturierender SDS-PAGE-Analyse nur eine zusätzliche Bande zur monomeren PrP-Bande zeigte (Abbildung 33). Folglich beinhaltet die untersuchte Probe neben dem PrP-Monomer drei weitere, durch UV-Bestrahlung generierte Spezies, die sich zumindest geringfügig in Ladung und Größe unterscheiden, so dass eine Trennung unter *clear native* PAGE-Bedingungen möglich wird. Unter denaturierenden Bedingungen zerfallen diese PrP-Spezies durch Aufhebung der nicht-kovalenten Wechselwirkungen dann in ihre Grundbausteine, die in der SDS-PAGE-Analyse als eine definierte Proteinbande sichtbar werden, deren zugeordnetes Molekulargewicht dem eines „PrP-Dimers“ entspricht. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Analyse der Probe aus dem Produktionslauf im Kreislauf nach 60-minütiger Bestrahlung (5,0 mL/min, 9,5 mW bei 285 nm) sowie einer Probe aus dem Produktionslauf im Durchfluss (0,5 mL/min, 21,5 mW bei 285 nm) erhalten. Allerdings waren in diesen Proben nur zwei weitere Banden neben der monomeren PrP-Bande auf dem *clear native* Gel nachweisbar (Abbildung 33). Daher erscheint es wahrscheinlich, dass es sich bei dem bisher als „PrP-Dimer“ bezeichnetem Molekül um einen sehr stabilen Bestandteil größerer Aggregate handelt.

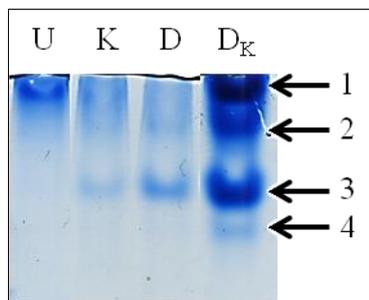


Abbildung 33: *Clear native* PAGE des unbestrahlten hPrP90-230+His (U) und der UV-bestrahlten Proben: (K) Probe nach 60-minütiger UV-Bestrahlung im Kreislauf (5,0 mL/min, 9,5 mW bei 285 nm), (D) im Durchflusssystem bestrahlte Probe (0,5 mL/min, 21,5 mW bei 285 nm) und (D_K) konzentrierte Probe der Bestrahlung im Durchflusssystem (1,5 mL/min, 8,5 mW bei 243 nm). Die Bande 1 ist das monomere PrP und die Banden 2 bis 4 stellen höhere Aggregate während der UV-induzierten Umwandlung dar, die unter denaturierenden Bedingungen eine dem Molekulargewicht nach „dimer“ Proteinbande auf dem SDS-Gel erzeugen.

Da es trotz zahlreicher Versuche nicht möglich war, die gebildeten Intermediate zu isolieren und separat zu charakterisieren, wurden die UV-bestrahlten Proben ohne vorherige Trennung nachfolgend mittels DLS-Messung und CD-Spektroskopie untersucht, um zumindest erste Einblicke zu erhalten.

3.4.2.4. Charakterisierung des Prion-Spezies-Gemisches

Es wurde eine hPrP90-230+His-Probe aus dem Produktionslauf im Kreislauf bei einer Fließgeschwindigkeit von 5,0 mL/min (11,1 mW bei 285 nm) und drei verschiedene Proben aus

den Produktionsläufen im Durchfluss bei einer Flussrate von 0,5 mL/min (21,5 mW bei 285 nm sowie 20,0 mW und 4,6 mW bei 243 nm) mittels DLS-Messung untersucht. Die Probe des Produktionslaufes im Kreislauf sowie die Probe im Durchfluss, die bei einer Wellenlänge von 243 nm mit einer Laserleistung von 4,6 mW bestrahlt wurde, enthielt nur das „dimere“ Intermediat neben dem monomeren PrP, wohingegen die bei einer Wellenlänge von 285 nm mit 21,5 mW bestrahlte Probe zusätzlich den „trimeren“ Zwischenzustand und die bei einer Wellenlänge von 243 nm mit 20 mW bestrahlte Probe sogar auch noch spezifische oligomere Spezies beinhaltete (Abbildung 34).

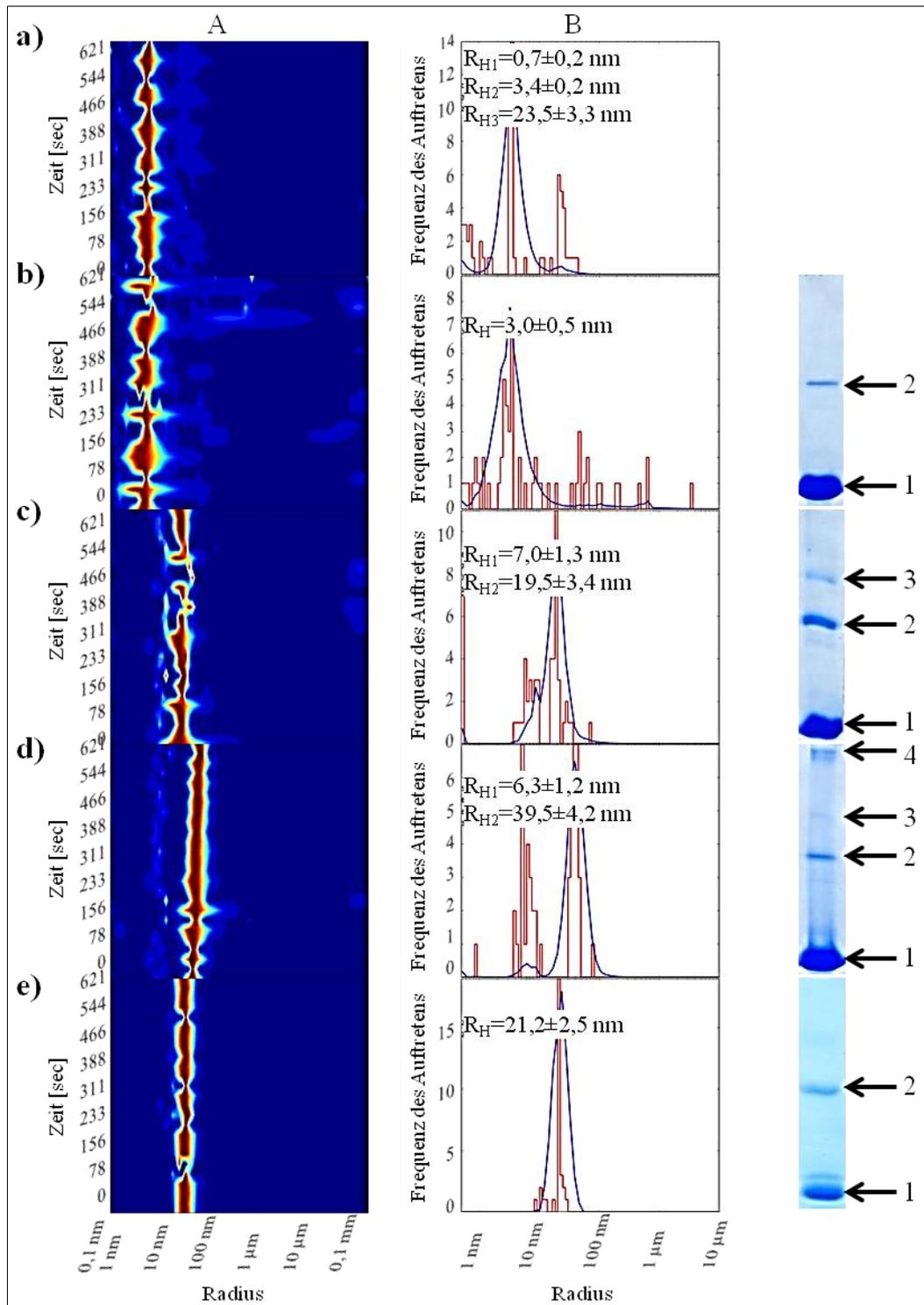


Abbildung 34: DLS-Charakterisierung von UV-bestrahltem hPrP90-230+His im Vergleich zum monomeren hPrP90-230+His mit der jeweiligen Radienverteilung (A), dem dazugehörigen Histogramm (B) und der jeweiligen SDS-PAGE-Analyse der entsprechenden Probe. Vom a) monomeren PrP (1) über b) dem Gemisch (Durchflusssystem 4,6 mW bei 243 nm) aus monomeren PrP und „dimeren“ Intermediat (2), c) der Probe (Durchflusssystem 21,5 mW bei 285 nm) mit zusätzlichem „trimeren“ Zwischenzustand (3) bis hin zur d) Probe (Durchflusssystem 20 mW bei 243 nm) mit der spezifischen oligomeren Spezies (4) wurden heterogener, dadurch war eine kontinuierliche Zunahme des dominierenden Radius erkennbar. Das Gemisch e) aus monomerem PrP und „dimerem“ Intermediat des Produktionslaufes im Kreislauf (11,1 mW bei 285 nm) war jedoch monodispers im Gegensatz zu den anderen vier Proteinproben.

Sowohl die unbestrahlte Probe mit dem monomeren hPrP90-230+His als auch das Gemisch aus PrP-Monomer und „dimerem“ Intermediat (Durchflusssystem 4,6 mW bei 243 nm) weisen einen dominierenden Radius bei 3,4 und 3,0 nm auf, was in etwa dem hydrodynamischen Radius eines Tetramers (3,3 nm) und Trimers (3,0 nm) entsprechen würde. Eigentlich wäre bei dem PrP-Monomer ein hydrodynamischer Radius von 2,1 nm und bei dem „PrP-Dimer“ von 2,6 nm zu erwarten, zumindest beim „PrP-Dimer“ liegt der erwartete R_H -Wert im Bereich des relativen Fehlers des gemessenen hydrodynamischen Radius. Bei der Probe mit dem zusätzlichem „trimeren“ Zwischenzustand (Durchflusssystem 21,5 mW bei 285 nm) und dem Gemisch aus monomeren PrP und „dimerem“ Intermediat des Produktionslaufes im Kreislauf (11,1 mW bei 285 nm) wären R_H -Werte von 3,0 nm (Trimer) und 2,6 nm (Dimer) zu erwarten gewesen. Der dominierende hydrodynamische Radius lag jedoch im Bereich 19,5 bzw. 21,2 nm. Diese Radien liegen etwas über dem des spezifischen Oligomers (17 ± 2 nm). Die SDS-PAGE-Analyse zeigt jedoch, dass die Anwesenheit des spezifischen Oligomers ausgeschlossen werden kann. Diese Ergebnisse lassen ebenfalls das Postulat zu, dass es sich bei den unter denaturierenden Bedingungen dem apparenten Molekulargewicht nach „dimeren“ bzw. „trimeren“ Intermediaten im nativen Zustand um eine diffuse Vorstufe der spezifischen Oligomere handeln könnte. In dem Gemisch mit der spezifischen oligomeren Spezies neben dem PrP-Monomer sowie den „dimeren“ und „trimeren“ Zwischenzuständen (Durchflusssystem 20 mW bei 243 nm) war der dominierende hydrodynamische Radius mit 39,5 nm sehr viel größer als der des spezifischen Oligomers (17 ± 2 nm), was ebenfalls für die postulierte diffuse oligomere Vorstufe spricht.

Aufgrund der Ergebnisse der DLS-Messungen und der nativen PAGE in Kombination mit der SDS-PAGE-Analyse scheint es, dass in den Proben unterschiedliche Vorstufen des stabilen, spezifischen Oligomers vorhanden sind. Diese sind jedoch noch sehr diffus und instabil, wodurch zum einen die höheren hydrodynamischen Radien, zum anderen aber auch die Anzahl der Banden im nativen Gel und die unterschiedlichen Banden unter denaturierenden SDS-PAGE-Bedingungen, die dem apparenten Molekulargewicht eines „dimeren“, „trimeren“ und „tetrameren“ Intermediates entsprechen, erklärt werden können.

Da sich das CD-Signal additiv aus allen Anteilen der Einzelproben zusammensetzt, können geringe Konzentrationen an β -Faltblatt-Strukturen in Abweichungen resultieren, wenn die Konzentration ausreichend hoch ist. Daher wurde die Sekundärstruktur der Intermediat-Mischungen mittels CD-Spektroskopie untersucht (Abbildung 35).

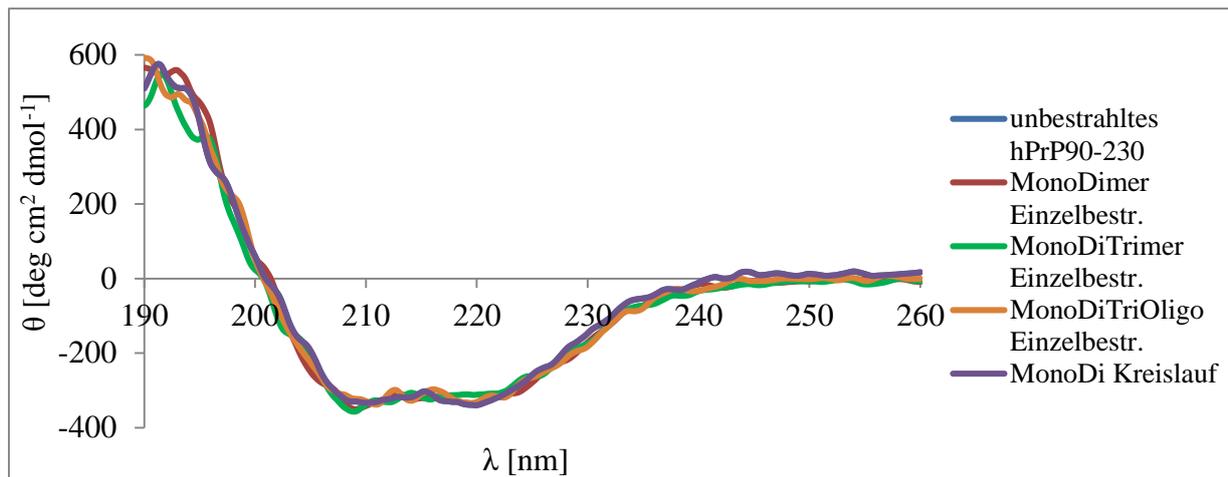


Abbildung 35: CD-Spektren des monomeren unbestrahlten hPrP90-230+His sowie der UV-bestrahlten PrP-Proben mit unterschiedlichem Anteil an Intermediaten. Der Nulldurchgang sowie die Minima und Maxima der Kurven sind annähernd gleich und weisen den charakteristischen α -helikalen Verlauf auf.

Die CD-Spektren aller Proben wiesen den gleichen Nulldurchgang sowie identische Minima und das Maxima auf, welche charakteristisch für eine dominierende α -helikale Faltung sind. Entweder war die Konzentration der Intermediate im Verhältnis zum monomeren PrP für die CD-Messungen zu gering oder aber die Intermediate weisen noch keine β -Faltblatt-reiche Struktur auf.

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die Vorstufen der Oligomere in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer unter denaturierenden Bedingungen in dimere, trimere und tetramere Bausteine zerfallen. Das impliziert entweder sehr starke nicht-kovalente Wechselwirkungen innerhalb dieser Bausteine, die durch denaturierende SDS-PAGE-Bedingungen nicht aufgehoben werden können, oder sogar kovalente Modifikationen. Um das zu untersuchen, wurden die bestrahlten Proben massenspektrometrisch untersucht. Bei der UV-Bestrahlung werden in erster Linie die Aminosäuren Methionin und Histidin oxidiert, wodurch Methioninsulfoxid und 2-Oxo-Histidin entsteht. Diese oxidative Modifikation kann zur Umwandlung und Aggregation des PrP durch Störung der strukturellen Integrität führen (Redecke *et al.*, 2009). Da die Oxidation der Methionin-Reste auch während der proteolytischen Spaltung mit Trypsin durch die Anwesenheit von Sauerstoff erfolgen konnte, wurde monomeres, unbestrahltes PrP als Kontrolle ebenfalls für die massenspektrometrische Untersuchung präpariert.

Nach erfolgter SDS-PAGE des UV-bestrahlten hPrP90-230 wurden die Proteinbanden, die dem apparenten Molekulargewicht des monomeren bzw. „dimeren“ PrP entsprachen, aus dem Gel geschnitten und nach dem Protokoll für die proteolytische Spaltung im Gel mit Trypsin inkubiert. Die entstandenen Peptidfragmente wurden für die MS-Analyse aus dem Gel

extrahiert. Während dieses Verfahrens wurden die Disulfidbrücken der Cystein-Reste reduziert und, um eine Reoxidation zu verhindern, anschließend carbamidomethyliert. Diese Modifikation der Cystein-Reste sowie die mögliche Oxidation der Methionin- und Histidin-Reste haben eine Verschiebung der Massen zur Folge, welche bei der Massenkalkulation für die Peptidfragmente, die diese Aminosäurereste enthielten, berücksichtigt werden musste. Die Vorhersage der theoretisch möglichen Peptide erfolgte mit Hilfe des Programmes *PeptideMass* des *ExPASy Proteomics Servers* (ExPASy, 2013). Die MS-Analyse wurde im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. Schlüter mit einem ESI-Massenspektrometer (*LC/MSD Trap XCT Ultra* von Agilent) am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Dabei wurden die folgenden Peptide (Tabelle 7) detektiert.

Tabelle 7: Theoretisch berechnete sowie gemessene Masse der Peptidfragmente der durch Trypsin-Spaltung der SDS-PAGE-Banden erzeugten monomeren hPrP90-230+His sowie „dimeren“ Intermediate nach der MS-Analyse (Ox. = Oxidation, Ca. = Carbamidomethylierung)

Fragment	Sequenz	berechnete Masse	Gemessene Masse	
			monomeres hPrP90-230	„dimeres“ hPrP90-230
149-156	YYRENMHR	1 167,5 1 183,5 (Ox.)	1 167,5 1 184,6	-
152-156	ENMHR	685,3	685,5	685,4
186-194	QHTVTTTTK	1 015,5	1 015,3	1 015,4
195-204	GENFTETDVK	1 138,5	1 138,2	1 138,2
195-208	GENFTETDVKMMER	1 717,7 (Ox. 2x)	1 717,3	1 717,2
209-220	VVEQMCITQYER	1 497,7	1 496,5	1 496,6
		1 513,7 (Ox.)	1 513,3	-
		1 554,7 (Ca.)	1 554,3	1 554,2
		1 570,7 (Ox. + Ca.)	1 570,3	1 570,3
221-228	ESQAYYQR	1 043,5	1 043,2	1 043,2

Die ausgeschnittenen Proteinbanden konnten anhand der identifizierten Peptide und mit Hilfe der *MASCOT*-Datenbank (Matrix Science) erfolgreich als hPrP-Fragmente identifiziert werden. Allerdings wurden keine kovalenten Modifikationen detektiert, die spezifisch dem „dimeren“ Intermediat zuzuordnen sind. Währenddessen etwa 36 % der Sequenz des hPrP90-230-Monomers durch die identifizierten Fragmente abgedeckt werden konnte, waren es beim „PrP-Dimer“ etwa 30 %. Einige Peptidfragmente konnten nicht detektiert werden, darunter sowohl die sehr kleinen Fragmente AS 107-110 sowie AS 229-230 als auch die sehr großen Fragmente AS 90-106 und AS 111-148, welche wahrscheinlich nicht ausreichend aus dem Gel extrahiert wurden. Mit Ausnahme eines Peptids, das beim „dimeren“ Intermediat nicht identifiziert wurde (AS 149-156), konnten durch die MS-Messungen keine Unterschiede im Fragmentmuster

zwischen dem PrP-Monomer und dem „PrP-Dimer“ festgestellt werden. Die Oxidationen waren wahrscheinlich aufgrund der Anwesenheit von Sauerstoff während der proteolytischen Spaltung in beiden Proben identisch.

Mit dem monomeren mPrP und der oligomeren Spezies wurden ebenfalls entsprechende MS-Analysen mit vorangegangener Trypsin-Spaltung im SDS-Gel durchgeführt. Die Sequenzabdeckung des mPrP89-231-Monomers durch die identifizierten Fragmente lag bei nur etwa 25 % und beim PrP-Oligomer sogar nur bei etwa 19 %. Auch hier ließen die Resultate keine Rückschlüsse auf UV-induzierte kovalente Modifikationen der Aminosäuren in der oligomeren Spezies zu (Tabelle 8).

Tabelle 8: Theoretisch berechnete sowie gemessene Masse der Peptidfragmente der durch Trypsin-Spaltung der SDS-PAGE-Banden erzeugten monomeren mPrP89-230 sowie spezifischen Oligomere nach der MS-Analyse (Ox. = Oxidation, Ca. = Carbamidomethylierung)

Fragment	Sequenz	berechnete Masse	Gemessene Masse	
			monomeres mPrP89-231	oligomeres mPrP89-231
148-150	YYR	501,2	501,4	501,2
148-155	YYRENMYR	1 194,5	1 194,8	-
151-155	ENMYR	712,3	712,3	-
204-207	MMER	566,2	566,4	-
208-219	VVEQMCVTQYQK	1 455,7	1 455,7	1 456,2
		1 471,7 (Ox.)	1 471,8	1 472,2
		1 512,7 (Ca.)	-	1 512,3
220-231	ESQAYYDGRSS	1 418,6	1 418,7	1 418,1

3.4.3. Metallkatalysierte oxidative Umwandlung

Die Umwandlung des PrP in den β -Faltblatt-reichen pathogenen Zustand kann neben der UV-induzierten Methode auch durch metallkatalysierte Oxidation ausgelöst werden. Der publizierte metallkatalysierte oxidative Aggregationstest wurde verwendet, um die Zeit zu ermitteln nach der nur noch etwa die Hälfte des PrP in Lösung vorliegt (Redecke *et al.*, 2006). Durch die Bestimmung der Halbwertszeit können besser Änderungen im Aggregationsverhalten sowohl im positiven als auch im negativen Sinne erfasst werden. Die Zeit variierte je nach PrP-Konstrukt, durch die stabilisierenden bzw. destabilisierenden C- und/oder N-terminalen Anhänge (Tabelle 9). Daher wurde zunächst die Halbwertszeit für die verschiedenen PrP-Konstrukte mit Hilfe des Aggregationstest festgelegt, indem die Prion-Proteinkonzentration mit Natriumacetat-Puffer (10 mM, pH 5,0) auf 44 μ M in einem Volumen von 60 μ L eingestellt wurde. Zu den Proben wurde je ein Stück (15-20 mg) elementares Kupfer gegeben und für die jeweilige Zeit bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, während die Kontrollproben ohne Kupfer in

diesem Zeitraum bei 4 °C gelagert wurden. Die Proben wurden vom Kupfer getrennt und nach der Zentrifugation zur Abtrennung hochmolekularer Präzipitate 25 µL der Proteinlösung aus dem oberen Meniskus zur weiteren Analyse abgenommen. Mittels Bradford-Test wurde die verbliebene Proteinkonzentration in Lösung bestimmt. Durch die Konzentration an verbliebenem löslichem Protein ($R_H < 25$ nm) konnte eine Aussage über die Menge an aggregiertem PrP ($R_H > 25$ nm) getroffen werden.

Dabei stellte sich heraus, dass die vier Aminosäurereste, welche den GPI-Anker am C-Terminus des PrP simulieren, eine destabilisierende Wirkung haben, da die Halbwertzeiten der entsprechenden Wildtyp PrP-Konstrukte signifikant länger waren. Besonders deutlich wurde dies bei hPrP121-230 (Tabelle 9). Hier wurde die Stabilität durch Anfügung des EFEA-Anhangs um den Faktor 14 reduziert. Um mehr Erkenntnisse über die kupferkatalysierte oxidative Umwandlung des PrP zu erlangen, wurde nachfolgend untersucht, ob das PrP unter den Bedingungen des Aggregationstest mit zunehmender Inkubationszeit Kupferionen bindet.

Tabelle 9: Halbwertzeiten der verschiedenen PrP-Konstrukte unter oxidativen Bedingungen in Lösung

Prion-Konstrukt	Inkubationszeit bei der ~50 % Protein in Lösung
hPrP121-230	35 min
hPrP121-230+EFEA	2,5 min
hPrP 90-230	90 min
hPrP90-230+EFEA	80 min

3.4.3.1. Analyse der Kupferbindung nach metallkatalysierter Umwandlung

Die metallkatalysierte Oxidation soll in Verbindung mit der strukturellen Umwandlung des PrP stehen. Cu(II)-Ionen besitzen die Fähigkeit, *Redox-Cycling* zu initiieren, wodurch ROS entstehen, die wiederum das PrP oxidativ modifizieren, so dass es zur Induktion der Umwandlung kommt (Halliwell und Gutteridge, 1990; Koppenol, 2001; Baruch-Suchodolsky und Fischer, 2009). Dabei binden möglicherweise Cu(II)-Ionen an das PrP, daher wurde der Kupfergehalt in Prion-Proteinproben vor und nach der metallkatalysierten Umwandlung mit Hilfe der Totalreflektions-Röntgenfluoreszenz (TXRF)-Analyse untersucht (Wobruschek, 1994). Das hPrP90-230 ohne Hexahistidinsequenz wurde jeweils 8 sowie 16 Stunden bei 37 °C mit elementarem Kupfer und elementarem Zink inkubiert. Das unbehandelte PrP-Monomer sowie die nach metallkatalysierter Umwandlung gebildeten PrP-Aggregate wurden in Natriumacetat-Puffer aufgenommen und mit der Standardlösung für eine Dreifachbestimmung der Proben sowie des Puffers versetzt. Die Proben wurden auf einem Probenträger getrocknet und nacheinander im Spektrometer analysiert. Die Datenerfassung erfolgte mit einem S2

Picofox Spektrometer (Bruker) für 1 000 Sekunden/Probe. Zur Kalibrierung wurde vor der Datenerhebung ein Standard verwendet. Röntgenfluoreszenz-Analysen haften schwere Matrixeffekte an, diese bezeichnen das Zustandekommen von Sekundäranregung und Absorption von Strahlung in der Probe selbst. Dieser Effekt resultiert in einer Anhebung oder Senkung der Signale und eines nicht linearen Verhältnisses zwischen der Intensität der Strahlung und der Konzentration der Analyten. Zur Abschätzung der Matrixeffekte diente als Vergleich zum internen Standard Gallium Scandium. Die jeweiligen Elementkonzentrationen in den verschiedenen Proben wurden mit dem Programm *Spectra* (Bruker) ermittelt (Abbildung 36).

Die Konzentration an enthaltenem aggregiertem PrP in den durch TXRF-Messung untersuchten Proben wurde mittels Bradford-Test bestimmt, um einen Zusammenhang zwischen dem nachgewiesenen Kupfer (Cu)-/Zink (Zn)-Gehalt und der Proteinkonzentration herzustellen (Tabelle 10).

Tabelle 10: Mittels TXRF bestimmter Kupfer- und Zinkgehalt sowie mittels Bradford-Test ermittelte Proteinkonzentration in monomeren und aggregierten PrP-Proben

Probe	Element	Mittelwert [mg/L]	Standard- abweichung	Konzentration PrP [mg/L]
Puffer	Cu	0,010	0,009	-
	Zn	0,034	0,017	
Monomer	Cu	0,000	0,000	0,0040
	Zn	0,090	0,034	
Cu 8 h	Cu	0,722	0,020	0,0018
	Zn	0,010	0,018	
Cu 16 h	Cu	1,773	0,041	0,0033
	Zn	0,000	0,000	
Zn 8 h	Cu	0,002	0,003	0,0003
	Zn	0,045	0,005	
Zn 16 h	Cu	0,027	0,003	0,0010
	Zn	0,174	0,019	

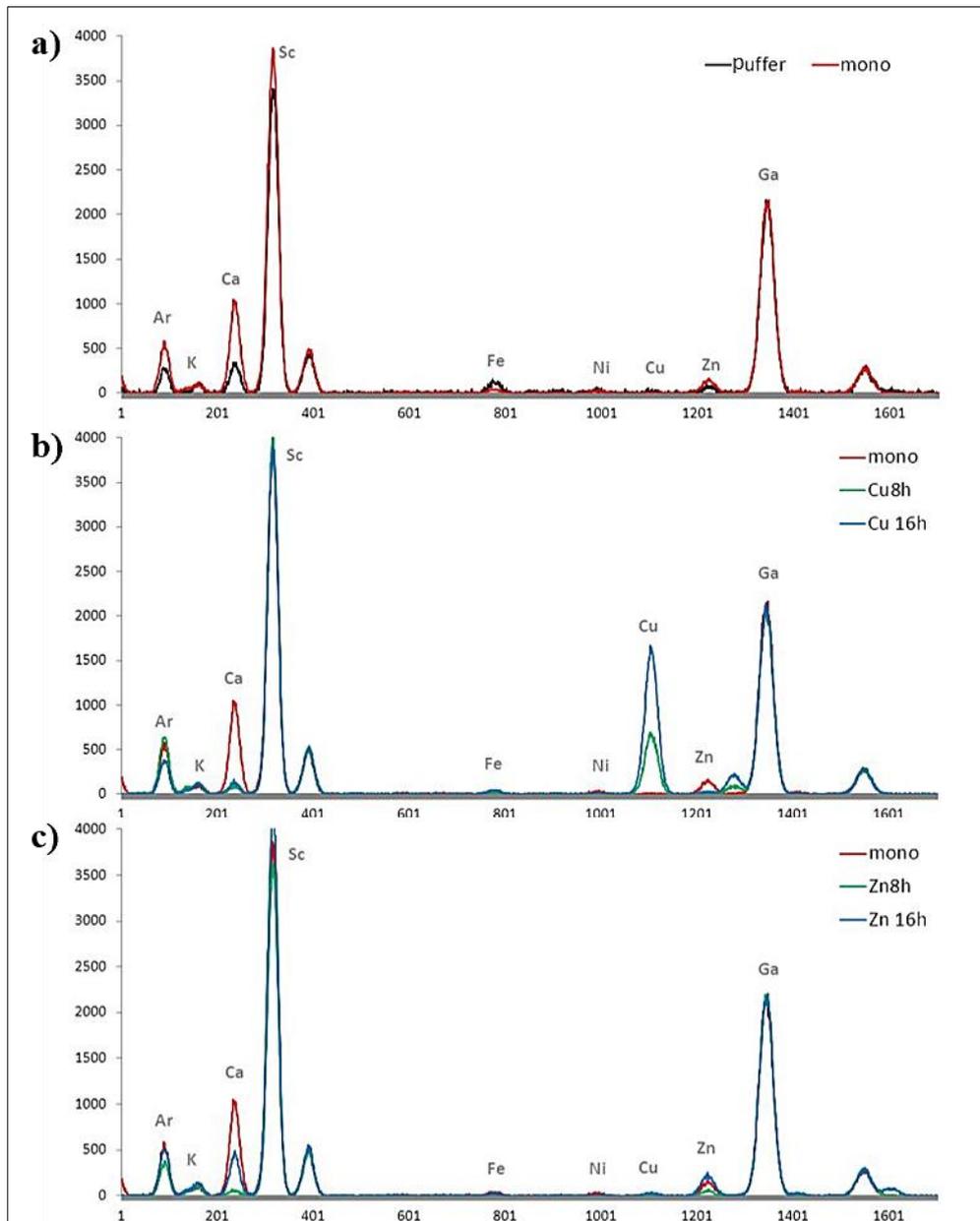


Abbildung 36: Ergebnisse der TXRF-Analyse des hPrP90-230 ohne His-Tag. a) Puffer und PrP-Monomer waren praktisch frei von Kupfer (Cu) und enthielten nur geringe Mengen an Zink (Zn). Der Cu-/Zn-Gehalt im monomeren PrP war ähnlich dem des Puffers. b) Bei den mit Cu inkubierten Proteinproben wurde eine ausgeprägte Zunahme der Cu-Menge mit zunehmender Inkubationszeit erkennbar. c) Die mit Zn inkubierten Proteinproben zeigten erst nach 16-stündiger Inkubation eine leichte Erhöhung der Zn-Menge.

Im Puffer und der monomeren Proteinprobe waren die Werte für Kupfer und Zink ähnlich (innerhalb der Genauigkeit). Kupfer war praktisch nicht vorhanden und Zink konnte nur in äußerst geringen Mengen ($< 0,1$ mg/L) nachgewiesen werden (Abbildung 36). Da die mit Kupfer und Zink inkubierten Proben mit einem 19-fachen Überschuss an Puffer verdünnt wurden, wurden die Kupfer- und Zinkgehalte $< 0,1$ mg/L als identisch mit dem Puffergehalt angesehen. Die für 8 Stunden mit Kupfer inkubierte Probe enthielt $0,7$ mg/L Kupfer, nach

16 Stunden waren es 1,8 mg/L Kupfer. Die beiden Proben waren jedoch im Wesentlichen frei von Zink. Mit Zink inkubierte Proteinproben zeigten von 8 auf 16 Stunden eine Erhöhung von 0,04 mg/L auf 0,17 mg/L. Dies ist jedoch nicht als signifikant anzusehen, da bereits ein Zinkgehalt von 0,09 mg/L in der monomeren Proteinprobe und im Puffer vorhanden war.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Affinität von Kupfer zum PrP sehr viel höher ist als die des Zinks und dass das β -Faltblatt-reiche Aggregat Kupferionen bindet oder zumindest stark mit ihnen wechselwirkt.

3.5. Inhibition der oxidativen Umwandlung von Prion-Proteinen

3.5.1. Inhibition der metallkatalysierten oxidativen Umwandlung

Die Methode der metallkatalysierten oxidativen Umwandlung und Aggregation wurde verwendet, um potentielle Inhibitoren für die oxidativ-induzierte Umwandlung von PrP zu testen. Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Schachner Camartin am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) stellte verschiedene Peptide zur Verfügung, die als potentielle Umwandlungs- bzw. Aggregationsinhibitoren eingestuft wurden. Der vorwiegende Teil der Peptidsequenzen wurde gemäß der Bindungsdomänen PrP-bindender Proteine entworfen. Durch die Bindung der Peptide an die PrP-Oberfläche soll die Gesamtstruktur stabilisiert und die Umwandlung des PrP bei oxidativer Schädigung gehemmt werden. Aus ursprünglich 45 Peptiden wurden 14 ausgewählt (Tabelle 11), die sowohl einen inhibitorischen als auch einen gegenteiligen Effekt auf die PrP-Aggregation zeigten. Der Einfluss der Peptide auf die Umwandlung von PrP wurde mit Hilfe des metallkatalysierten Aggregationstests untersucht (Abbildung 37).

Der Aggregationstest wurde mit Peptid sowie PrP in einem Volumen von 60 μ L Natriumacetat-Puffer (10 mM, pH 5,0) durchgeführt. Die Kontrollen mit Protein in Puffer sowie mit Protein und Peptid in Puffer wurden ohne Kupfer bei 4 °C für die proteinspezifische Zeit gelagert. Um die Aggregation des PrP ohne Peptid beurteilen zu können, wurden Proben mit PrP und Kupfer ebenso lange bei 37 °C wie diejenigen mit Peptid inkubiert. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde die Proteinlösung vom Kupfer getrennt und zentrifugiert, um die entstandenen unlöslichen Aggregate zu entfernen. Die verbliebene Proteinkonzentration im Überstand wurde mittels Bradford-Test bestimmt.

Dabei stellte sich heraus, dass neben Peptiden, die scheinbar keinen Einfluss auf die Aggregation haben, auch Peptide identifiziert wurden, die die Umwandlung oder die Aggregation signifikant inhibierten. Ein Peptid (12) beschleunigte den Vorgang zunächst sogar extrem.

Tabelle 11: Auflistung der 14 ursprünglich verwendeten Peptide, deren Sequenzen und Molekulargewichte

Peptid	Sequenz	Molekulargewicht [g/mol]
1	GSCLFERQPSLAPMSSLCGC	2 086,4
2	LHADTTHHRPWTC	1 574,7
3	WHTPThLRDHTAC	1 574,7
4	MWPPTTHSSPYHC	1 543,7
5	ATWSHHLSSAGLC	1 369,5
6	EHMALTYPFRPHC	1 601,8
7	LLADTTHHRPWTC	1 550,7
8	NFMESLPRLGMH	1 431,7
9	TMGFTAPRFPHY	1 424,6
10	PFPTHAMTRGYC	1 380,6
11	ISLNFPPHGSQPC	1 396,5
12	PAPGPRDQNLQILEESRSEC	2 336,5
13	GIHHHQHHLHSATTHRRRC	2 458,7
14	GGLYTDITSHPWQAAIFVKNKRSPC	2 790,1

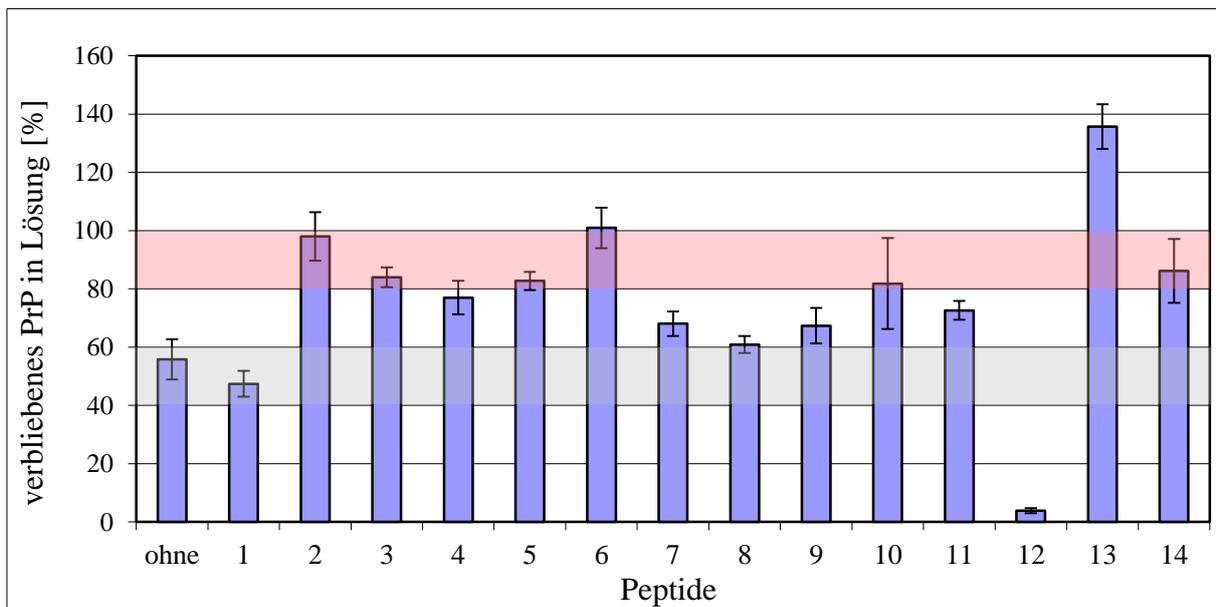


Abbildung 37: Peptid-Aggregationstest mit hPrP90-230+EFEA. 44 μ M PrP wurden unter den Bedingungen der metallkatalysierten Oxidation für 80 Minuten bei 37 °C in Gegenwart eines 7-fachen molaren Überschusses der jeweiligen Peptide sowie in Abwesenheit (Kontrolle) inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die verbliebene PrP-Konzentration im Überstand mittels Bradford-Test bestimmt. Proteinkonzentrationen zwischen 80 und 100 % (rot) nach Inkubation deuten auf eine signifikante Inhibition hin (Peptide 2, 3, 5, 6, 13, 14), während PrP-Konzentrationen zwischen 40 und 60 % (grau) keinen Einfluss des entsprechenden Peptids auf die PrP-Umwandlung und Aggregation verdeutlichen (Peptid 1).

Aus den zunächst getesteten 14 Peptiden wurden vier Peptide mit unterschiedlichen inhibitorischen Eigenschaften anhand der Ergebnisse des Peptid-Aggregationstest für weitere

Analysen ausgewählt. Dazu gehörten die Peptide 8, 12, 13 und 14, deren Einfluss auf die oxidativ-induzierte Aggregation von hPrP90-230 und 121-230 im Vergleich zu den Varianten hPrP90-230+EFEA sowie 121-230+EFEA nachfolgend im Detail untersucht wurde.

Das Peptid 8 hat nur eine geringe inhibitorischen Wirkung auf die PrP-Aggregation, deren Peptidsequenz hat bereits erfolgreich bei der Detektion von Colon Krebs-Vorstufen Anwendung gefunden. Die Sequenz des beschleunigenden Peptids 12 entspricht einem Teil der intrazellulären Domäne des Caspr-Proteins, welches ein Bindungspartner des PrP darstellt. Das Peptid 13, welches eine Proteinkonzentration über 100 % aufwies, enthält einen Sequenzbereich des Dally-Proteins aus *Drosophila* und ist nicht in Säugetierproteinen zu finden. Die erhöhte Gesamte Proteinkonzentration beim Peptid 13 hängt damit zusammen, dass das Peptid durch den C-terminalen Cystein-Rest während der oxidativen Inkubation dimerisieren kann. Diese entstandenen Peptid-Dimere mit einem Molekulargewicht von etwa 5 kDa sind im Bradford-Test im Gegensatz zu Peptiden mit einer Größe von weniger als 3 kDa detektierbar (Grossberg 1977). Die Sequenz des inhibierenden Peptids 14 stammt aus dem tPA (*tissue plasminogen activator*, Aminosäurereste 311-334) der Maus und ist dem humanen tPA sehr ähnlich (GGLFADIASHPWQA AIFAKHRRSP).

Die ausgewählten Peptide 12, 13 und 14 enthielten einen Cystein-Rest am C-Terminus. Da dieses Cystein während der Inkubation unter oxidativen Bedingungen mit einem weiteren Peptid über eine Disulfidbrücke verknüpft werden kann, wurden alle Peptide sowohl mit als auch ohne C-terminalem Cystein-Rest verwendet. Dadurch sollte geklärt werden, ob die beobachtete Inhibition auf die Wechselwirkung des PrP mit dimerisiertem oder monomerem Peptid zurückzuführen ist (Abbildung 38). Außerdem wurden zwei Kontrollpeptide (Anne179, PrPtest) mit einem C-terminalen Cystein-Rest verwendet, deren weitere Sequenzzusammensetzung zufällig gewählt wurde. Des Weiteren wurde das Peptid von Dr. Dirk Rehders (DR) verwendet, welches dieser im Rahmen seiner Dissertation (Hamburg, 2009) als möglichen Aggregationsinhibitor identifiziert und in diesem Zusammenhang die Bindungsaffinität, Bindungsregion und das Bindungsepitop des Peptids erfolgreich bestimmt hat. Die Peptide und deren Sequenzen sowie das dazugehörige Molekulargewicht sind in der folgenden Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Auflistung der für weitere Analysen verwendeten Peptide, deren Sequenzen und Molekulargewichte

Peptide	Sequenz	Molekulargewicht [g/mol]
8	NFMESLPRLGMH	1 431,69
8 + C	NFMESLPRLGMHC	1 534,83
12	PAPGPRDQNLQPQILEESRSE	2 233,40
12 + C	PAPGPRDQNLQPQILEESRSEC	2 336,55
13	GIHHHQHHLHSATTHHRRR	2 355,56
13 + C	GIHHHQHHLHSATTHHRRRC	2 458,70
14	GGLYTDITSHPWQAAIFVKNKRSP	2 687,03
14 + C	GGLYTDITSHPWQAAIFVKNKRSPC	2 790,17
DR	NMHRYPNQ	1 058,18
Anne179	TMGFTHHRLSGC	1 346,54
PrPtest	DASSGSSDC	868,83

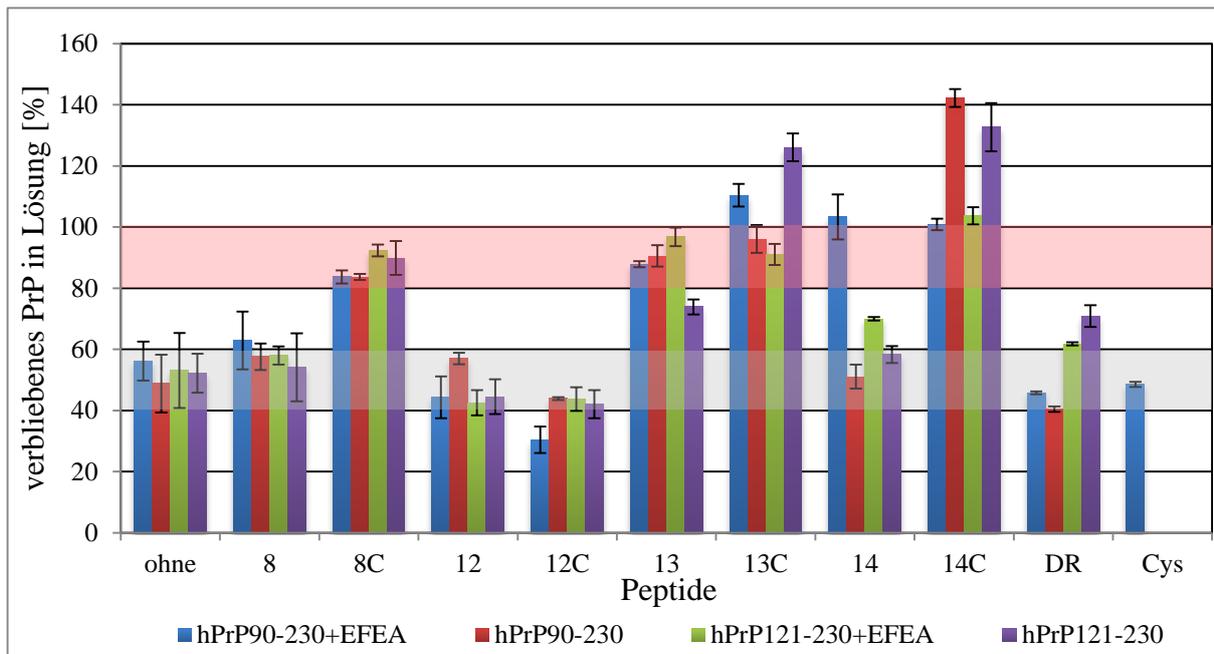


Abbildung 38: Peptid-Aggregationstest mit hPrP90-230 und 121-230 sowie deren Konstrukte mit C-terminalem EFEA-Anhang. 44 μ M PrP wurden unter den Bedingungen der metallkatalysierten Oxidation für 90 (hPrP90-230), 80 (hPrP90-230+EFEA), 35 (hPrP121-230) bzw. 2,5 Minuten (hPrP121-230+EFEA) bei 37 °C in Gegenwart eines 7-fachen molaren Überschusses der jeweiligen Peptide sowie in Abwesenheit (Kontrolle) mit Kupfer (15-20 mg) inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die verbliebene PrP-Konzentration im Überstand mittels Bradford-Test bestimmt. Proteinkonzentrationen zwischen 80 und 100 % (rot) nach Inkubation deuten auf eine signifikante Inhibition hin, während PrP-Konzentrationen zwischen 40 und 60 % (grau) keinen Einfluss des entsprechenden Peptids auf die PrP-Umwandlung und Aggregation verdeutlichen. Dabei variierten die Ergebnisse mehr oder weniger stark in Abhängigkeit vom PrP-Konstrukt.

Der zunächst offensichtliche Umwandlungsaktivierende-Effekt vom Peptid 12 war in den folgenden Aggregationstests nicht in dem Maße erkennbar. Sowohl bei dem Peptid 12 als auch

bei den inhibierenden Peptiden wurde der jeweilige Effekt durch den C-terminalen Cystein-Rest verstärkt (Abbildung 38). Daher wurde auch freies Cystein im 7-fachen molaren Überschuss im oxidativen Aggregationstest eingesetzt. Dieses hatte jedoch keinerlei Einfluss auf die Proteinaggregation.

Die Peptide 8, 8C, 12, 12C, 13, und 13C haben auf die untersuchten PrP-Konstrukte eine vergleichbare Wirkung, unabhängig von der Länge des ungefalteten N-terminalen Bereiches bzw. der Anwesenheit des C-terminalen EFEA-Anhangs. Somit hat sowohl die Länge des ungefalteten N-Terminus als auch der C-terminale Anhang keinen Einfluss auf die Wechselwirkung des PrP mit dem Peptid. Mit den Peptiden 14 und 14C verhielt es sich jedoch anders. Während die Aggregation des hPrP90-230+EFEA in Anwesenheit von Peptid 14 komplett inhibiert wurde, zeigte dieses bei den Wildtyp PrP sowie bei hPrP121-230+EFEA keinen Effekt. Das Peptid 14C hatte einen inhibierenden Einfluss auf die Proteinaggregation aller PrP-Konstrukte. Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Peptide mit C-terminalem Cystein-Rest einen stärkeren inhibierenden Einfluss auf die PrP-Aggregation haben.

Durch die Dimerisierung der Peptide mit C-terminalem Cystein-Rest während der oxidativen Inkubation lag die Gesamtproteinkonzentrationen bei den Peptiden 13C und 14C über 100 %, wodurch die Peptid-Dimere im Gegensatz zu den monomeren Peptiden im Bradford-Test detektiert werden konnten. Für das Peptid 14C konnte das dimerisierte Peptid auch durch die MS-Analyse belegt werden, welche nach erfolgtem Aggregationstest durchgeführt wurde. Dabei konnte ein fünfzehnmals stärkeres Signal für das dimerisierte Peptid im Vergleich zum monomeren Peptid nachgewiesen werden. Das Peptid 12C zeigt diesen Effekt der erhöhten Proteinkonzentration nicht, da es höchstwahrscheinlich zusammen mit dem PrP aggregiert und somit durch Zentrifugation abgetrennt wird. Das dimerisierte Peptid 8C würde eine Größe von etwa 3 kDa aufweisen, welche die Nachweisgrenze des Bradford-Tests nicht überschreitet, so dass ein entsprechendes Phänomen wie beim Peptid 13C und 14C nicht auftritt.

Um den Einfluss von vollständig dimerisierten Peptiden im Vergleich zum monomeren Peptid mit und ohne Cystein-Rest am C-Terminus auf die Aggregation des PrP zu untersuchen, wurden die Peptide mit einer verdünnten Wasserstoffperoxid-Lösung oxidiert und anschließend wieder gefriergetrocknet. Für den Aggregationstest wurden die Peptide in der entsprechenden Menge Natriumacetat-Puffer gelöst. Nach metallkatalysierter Oxidation entsprach die verbliebene Konzentration an PrP in Lösung bei den dimerisierten Peptiden 8D, 13D und 14D etwa derjenigen in den Proben mit dem jeweiligen Peptid ohne C-terminalem Cystein-Rest im Gegensatz zu den Proben mit den Peptiden mit C-terminalem Cystein-Rest ohne vorherige Dimerisierung. Bei den dimerisierten Peptiden 13D und 14D könnte dieser Effekt jedoch auf

die Detektierbarkeit der Peptid-Dimere im Bradford-Test im Gegensatz zu der Kontrollprobe, welche zur Berechnung der verbliebenen PrP-Menge verwendet wird, zurückzuführen sein und nicht auf eine Änderung des inhibitorischen Effekts (Abbildung 39). Die dimerisierten Peptide 12D und PrPtest D verhalten sich im metallkatalysierten Aggregationstest nicht signifikant anders als die entsprechenden monomeren Peptide. Das dimerisierte Kontrollpeptid Anne D zeigt hingegen eine deutlich verringerte inhibitorische Wirkung auf die PrP-Umwandlung im Gegensatz zum Peptid-Monomer.

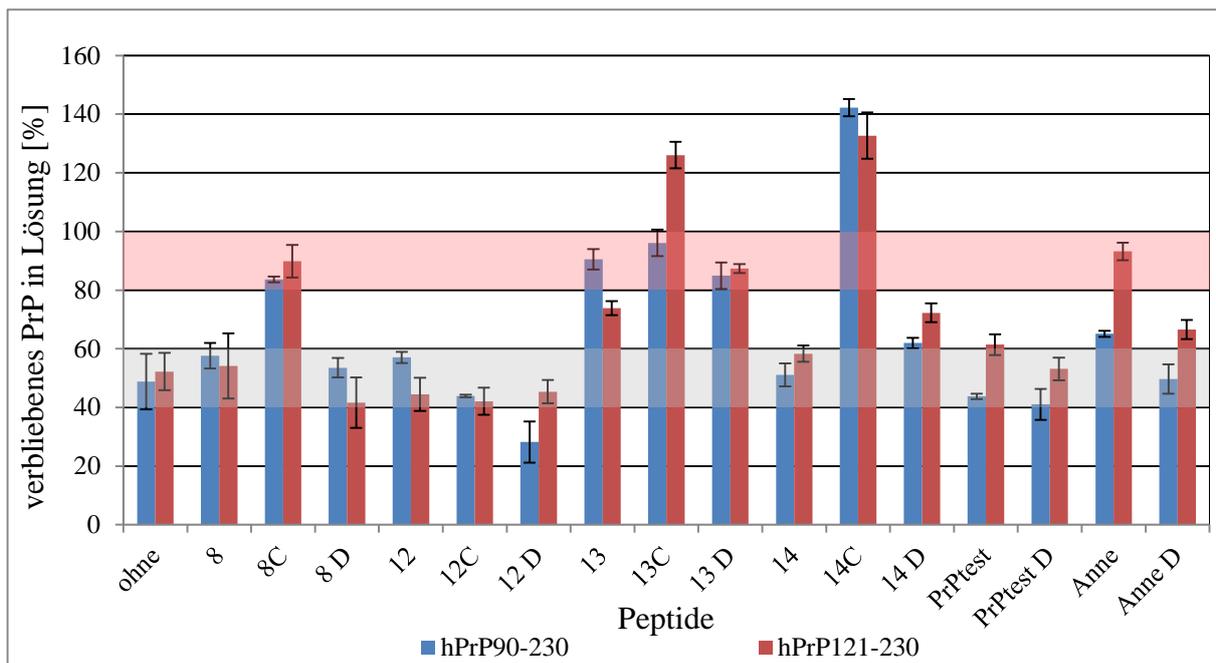


Abbildung 39: Peptid-Aggregationstest mit hPrP90-230 und 121-230. 44 μ M PrP wurden unter den Bedingungen der metallkatalysierten Oxidation für 90 (hPrP90-230) und 35 Minuten (hPrP121-230) bei 37 °C in Gegenwart eines 7-fachen molaren Überschusses der jeweiligen Peptide sowie in Abwesenheit (Kontrolle) mit Kupfer (15-20 mg) inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die verbliebene PrP-Konzentration im Überstand mittels Bradford-Test bestimmt. Proteinkonzentrationen zwischen 80 und 100 % (rot) nach Inkubation deuten auf eine signifikante Inhibition hin, während PrP-Konzentrationen zwischen 40 und 60 % (grau) keinen Einfluss des entsprechenden Peptids auf die PrP-Umwandlung und Aggregation verdeutlichen. Die zuvor dimerisierten Peptide (D) hatten im Falle der Peptide 8, 13, 14 und Anne einen deutlich verringerten inhibitorischen Effekt auf die PrP-Aggregation im Gegensatz zu den Peptiden mit C-terminalem Cystein-Rest ohne vorheriger Dimerisierung. Bei den Peptiden 12 und PrPtest war keine signifikante Änderung erkennbar.

Die MS-Analyse zeigte, dass die mittels Wasserstoffperoxid dimerisierten Peptide zusätzliche Oxidationen zumeist an den Aminosäuren Histidin und Methionin aufwiesen. Für alle Peptide mit Ausnahme vom Peptid 12C konnte ein dimeres Peptid mittels MS-Analyse nachgewiesen werden. Durch die metallkatalysierte Oxidation der Peptide mit C-terminalem Cystein-Rest konnte (außer bei den Peptiden Anne und 13C) sowohl das monomere als auch das dimere Peptid nachgewiesen werden. Allerdings wiesen die durch Metallkatalyse entstandenen dimeren Peptide im Gegensatz zu den Peptiden, die mit Wasserstoffperoxid dimerisiert wurden,

keine oxidierten Methionin- oder Histidin-Reste auf. Das zeigt, dass die während des Aggregationstests entstehenden ROS entweder schwächere Oxidantien als Wasserstoffperoxid sind oder die ROS vorwiegend vom an PrP gebundenen Kupfer durch *Redox-Cycling* abgefangen werden. Bei dem Peptid 12C konnte auch unter diesen Bedingungen nur das monomere Peptid detektiert werden. Der verringerte inhibierende Effekt der vollständig mit Wasserstoffperoxid dimerisierten Peptide könnte sowohl damit zusammenhängen, dass durch die oxidierten Methionin- und Histidin-Reste nur noch eine stark abgeschwächte bzw. keine Bindung an das PrP mehr möglich war oder das Peptid im dimerisierten Zustand nicht an das PrP binden kann. Möglicherweise verbinden sich die einzelnen Peptide mit C-terminalem Cystein-Rest aber auch erst nach der Anlagerung an das PrP und inhibieren somit die Aggregation und stabilisieren den jeweiligen Zustand des Proteins.

Die Bindungsaffinität der Peptide wurde mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie zum Nachweis einer möglichen Bindung vom Peptid an das PrP und des durch die Bindung stabilisierten strukturellen Zustands des PrP mittels CD-Spektroskopie untersucht.

3.5.1.1. Bestimmung der Peptid-Bindungsaffinitäten mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie

Durch SPR-Spektroskopie konnten die Bindungsaffinitäten der Peptide zu den jeweiligen PrP-Konstrukten ermittelt werden. Dazu wurden die Peptide in unterschiedlichen Konzentrationen beginnend mit der geringsten über das auf der Dextranoberfläche des CM5-Sensorchips immobilisierte PrP mit einer Flussrate von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ geleitet. Anschließend wurde die Resonanz gegen die Peptidkonzentration aufgetragen und die Bindungsaffinität nach dem *one-site binding* Model mit Hilfe des Programms OriginLab 9.1 bestimmt. Die Kurven zur Ermittlung der Bindungsaffinitäten sind für das hPrP121-230 mit den Peptiden 13 und 13C sowie für das hPrP90-230 mit den Peptiden 8C, 13, 13C und 14C beispielhaft in Abbildung 40 dargestellt.

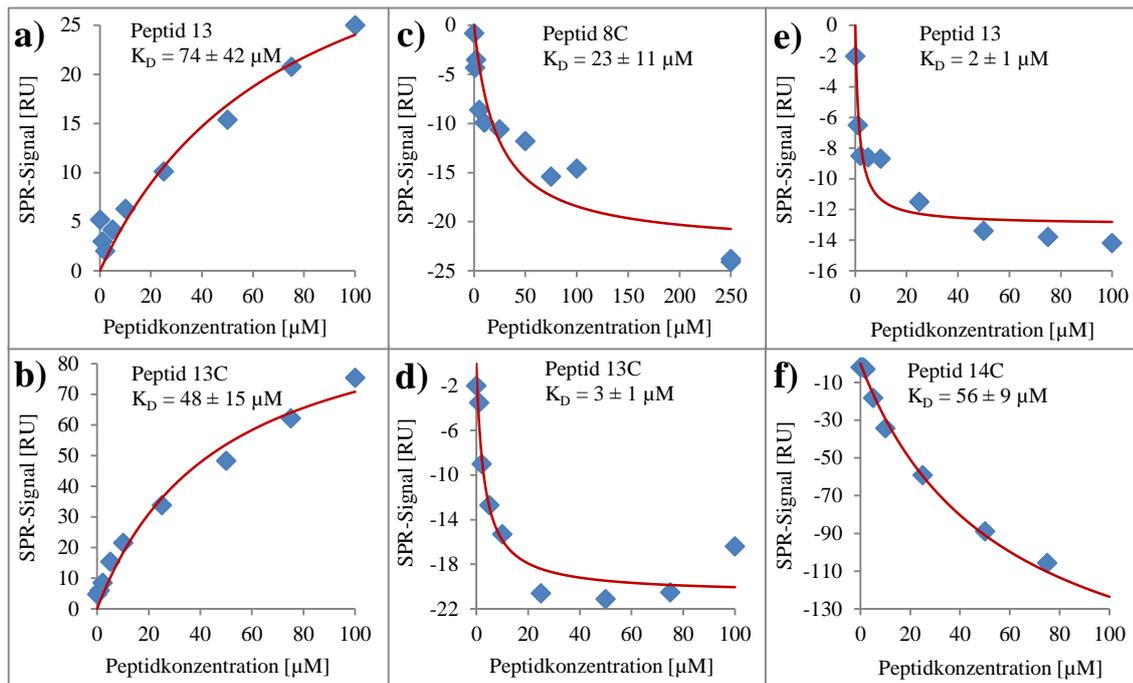


Abbildung 40: Bindungsaffinitäten der Peptide zum hPrP121-230 (a) Peptid 13, b) Peptid 13C) und hPrP90-230 (c) Peptid 8C, d) Peptid 13C, e) Peptid 13 und f) Peptid 14C) ermittelt mit dem *one-site binding* Model.

Für das hPrP121-230 konnten nur für die Peptide 8, 13 und 13C die Bindungsaffinitäten ermittelt werden, bei allen anderen Peptiden waren die Daten nicht auswertbar aufgrund der schlechten Datenlage, die sich auch durch mehrfaches messen nicht besserte. Beim hPrP90-230 konnten hingegen für nahezu alle gemessenen Peptide die Bindungsaffinitäten ermittelt werden. Das SPR-Signal war bei dem hPrP90-230 ohne EFEA jedoch negativ. Für die Bestimmung des K_D -Wertes ist nur die Konzentrationsabhängigkeit wichtig, daher ist die Berechnung der Bindungsaffinitäten mit negativen SPR-Signalen zulässig. Die Bindungsaffinitäten lagen zwischen 2 und 250 μM , was für eine hohe Bindungsaffinität der jeweiligen Peptide zum entsprechenden PrP-Konstrukt spricht (Tabelle 13).

Tabelle 13: Durch SPR-Messung ermittelte K_D -Werte der Peptide zu den humanen PrP-Konstrukten

Peptid	Bindungsaffinität (K_D) [μM]			
	hPrP90-230	+EFEA	hPrP121-230	+EFEA
8	-	10 ± 8	250 ± 135	143 ± 45
8C	23 ± 11	-	-	-
12C	-	81 ± 28	-	-
13	2 ± 1	-	74 ± 42	-
13C	3 ± 1	60 ± 26	48 ± 15	45 ± 33
14C	56 ± 9	38 ± 10	-	-

3.5.1.2. Untersuchung des Faltungszustandes der PrP-Peptid-Komplexe nach metallkatalysierter Oxidation

Mit Hilfe der SPR-Spektroskopie konnte die Existenz von Protein-Peptid-Komplexen bewiesen werden. Zur Untersuchung des inhibitorischen Effekts der ausgewählten Peptide durch die Inhibition der PrP-Umwandlung oder der PrP-Aggregation nach der Umwandlung wurde der Faltungszustand der Proben nach metallkatalysierter Oxidation mittels CD-Spektroskopie analysiert. Dazu wurde sowohl nur das PrP, das PrP mit jeweiligem Peptid, als auch nur das Peptid jeweils in Anwesenheit und Abwesenheit von Kupfer inkubiert. Nach Abtrennung wurden die CD-Spektren der PrP-Moleküle aus dem Überstand aufgenommen. Von dem CD-Spektrum des Proteins mit Peptid wurden sowohl das Puffer- als auch das Peptid-Signal subtrahiert, um das reine Protein-Signal zu erhalten. Bei allen hPrP-Konstrukten, die in Gegenwart der Peptide 13, 13C, 14 oder 14C mit Kupfer oxidiert wurden, konnte keine Änderung des CD-Signals im Vergleich zu den jeweiligen Proteinen, die ohne Kupfer inkubiert wurden, erkannt werden. Das PrP besitzt also auch nach dem Aggregationstest die vorwiegend α -helikale Konformation, was auf eine Inhibition der Umwandlung durch die Peptide hindeutet. Alle Ansätze, die im oxidativen Aggregationstest neben dem entsprechenden PrP auch das Peptid 12 oder 12C in Gegenwart von Kupfer enthielten, zeigten hingegen eine signifikante Verschiebung des CD-Signals in einen *Random coil*-typischen Kurvenverlauf mit nur noch einem Minimum (Abbildung 41).

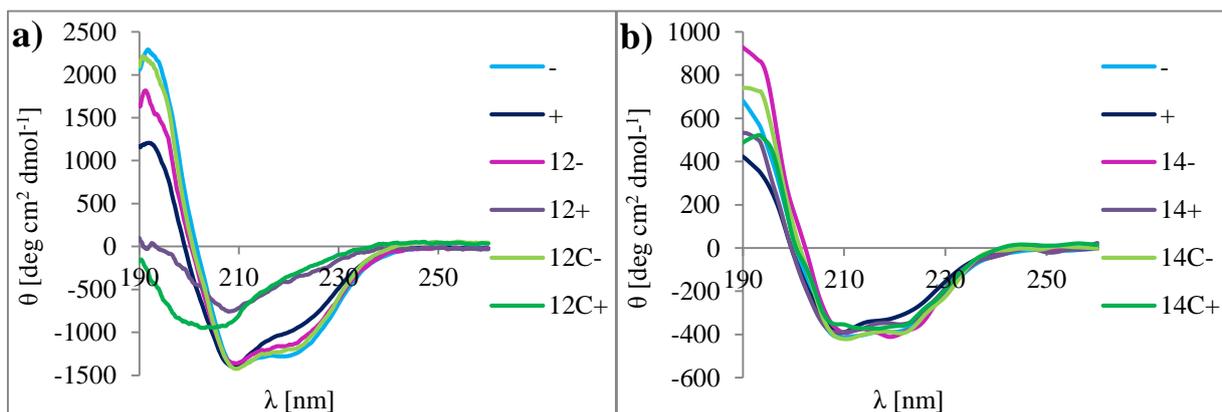


Abbildung 41: Beispielhafte Darstellung der aufgenommenen CD-Spektren der PrP- und PrP-Peptid-Proben nach metallkatalysierter Oxidation. a) hPrP121-230+EFEA ohne sowie in Anwesenheit der Peptide 12 und 12C mit (+) sowie ohne (-) Kupfer. Während der Kurvenverlauf (Nulldurchgang, Minima und Maximum) bei den Kontrollproben ohne Kupfer-Zugabe ähnlich war, konnte bei der PrP-Probe ohne Peptid aber mit Kupfer eine Abschwächung des Maximums und des Minimums bei 222 nm verzeichnet werden, was auf einen geringeren Anteil α -Helix hindeutet. Die PrP-Proben mit Peptid und Kupfer wiesen dabei eine sehr starke Verschiebung der Kurven in Richtung *Random coil*-Struktur (12+, 12C+) auf. b) hPrP90-230 ohne und mit Peptid 14 sowie 14C in Anwesenheit (+) und Abwesenheit von Kupfer (-). Abgesehen von der Kurve des PrP mit Kupfer aber ohne Peptid, die eine leichte Abschwächung des Maximums und des 222 nm Minimums zeigte, war der Kurvenverlauf aller anderen Proben mit und ohne Kupfer bzw. Peptid vergleichbar.

Während die Peptide 13, 13C, 14 und 14C aufgrund der Ergebnisse der CD-Spektroskopie den vorwiegend α -helikalen Zustand des PrP stabilisieren und somit als Umwandlungsinhibitoren fungieren, haben die Peptide 12 und 12C einen destabilisierenden Einfluss auf die PrP-Struktur und initiieren sogar offenbar die Entfaltung des PrP.

3.5.2. Untersuchungen zur Inhibition der UV-induzierten Umwandlung

Die mittels metallkatalysierter Oxidation induzierte Umwandlung der untersuchten PrP-Konstrukte wurde durch das Peptids 14C nahezu komplett inhibiert. Um zu prüfen, ob die UV-induzierte Umwandlung ebenfalls durch dieses Peptid inhibiert werden kann, wurden hPrP90-230 und hPrP121-230 zunächst mit einem 7-fachen Überschuss des Peptids 14C für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um den Protein-Peptid-Komplex auszubilden. Anschließend wurde sowohl das jeweilige PrP-Konstrukt als auch der entsprechende Protein-Peptid-Komplex mit einer Laserleistung von 15 mW bei einer Wellenlänge von 275 nm und einer Fließgeschwindigkeit von 3,0 mL/min für 60 Minuten im Kreislaufsystem bestrahlt. Durch die Messung der Transmission hinter der Bestrahlungskapillare konnte der Verlauf der UV-induzierten Umwandlung im Vergleich beurteilt werden (Abbildung 42). Während die Transmission bei der Bestrahlung des hPrP90-230 linear abnahm, blieben die entsprechenden Transmissionswerte bei dem dazugehörigen Protein-Peptid-Komplex konstant. Beim hPrP121-230 nahm die Transmission sowohl bei Bestrahlung des Proteins als auch des Protein-Peptid-Komplexes exponentiell ab, wobei die Transmissionsabnahme beim Komplex jedoch langsamer erfolgte. Diese Ergebnisse verdeutlichen auch bei der durch UV-Strahlung induzierten Umwandlung der PrP-Konstrukte eine inhibierende Wirkung des Peptids 14C bezüglich der Aggregation des PrP.

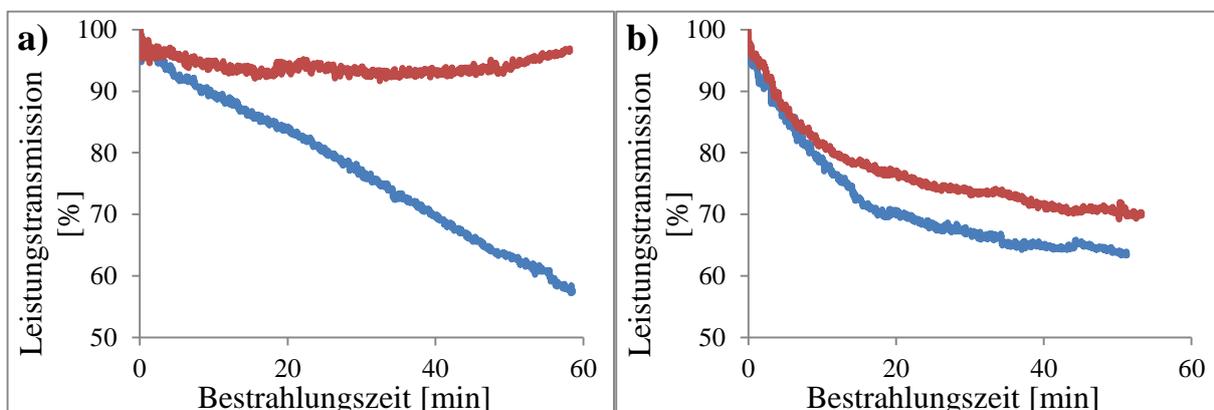


Abbildung 42: Prozentuale Abnahme der Transmission hinter der Küvette während der UV-Bestrahlung. Durch die UV-induzierte Aggregation von a) hPrP90-230 und b) hPrP121-230 (blau) ist eine signifikante Abnahme der Transmission hinter der Küvette zu verzeichnen. Bei Bestrahlung der entsprechenden Protein-Peptid-Komplexe mit Peptid 14C (rot) erfolgt diese Abnahme verzögert (hPrP121-230) bzw. kaum nachweisbar (hPrP90-230).

3.6. Kristallisation

Die Erkenntnisse über die Bindungsaffinitäten der Peptide zum PrP sowie die Identifikation der Umwandlungsinhibitoren sollten durch die Bildung des Protein-Peptid-Komplexes die Kristallisation des PrP ermöglichen. Die Struktur des PrP sollte durch die inhibitorischen Peptide stabilisiert und somit die Kristallbildung begünstigt werden. Es wurde das hPrP121-230 ohne Hexahistidinsequenz verwendet, da dieses nicht den flexiblen N-Terminus aufweist, welcher die Kristallisation negativ beeinflussen würde. Zur Bestimmung der idealen Ausgangskonzentration wurde ein Präkristallisationstest (PCT) mit dem hPrP121-230 durchgeführt. Da eine Konzentration von 2,1 mg/mL laut PCT zu gering und eine Konzentration von 16,4 mg/mL zu hoch war, wurde zunächst eine mittlere Proteinkonzentration von 10 mg/mL verwendet. DLS-Messungen ließen darauf schließen, dass das verwendete PrP-Konstrukt in hohen Konzentrationen (> 3 mg/mL) zu schnell aggregiert. Auch nach mehrfacher Zentrifugation, unter anderem auch nach Verwendung einer Ultrazentrifuge, konnte kein homogenes DLS-Signal erhalten werden (Abbildung 43). Basierend auf der zuvor mit Hilfe der SPR-Spektroskopie-Daten ermittelten Rezeptorbelegung wurde nun das Peptid 8 im 7-fachen molaren Konzentrationsüberschuss zum PrP gegeben und das Gemisch 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Protein-Peptid-Gemisch zeigte bei einer Konzentration von 3,7 mg/mL und 5 mg/mL ein homogenes DLS-Signal (Abbildung 43), so dass beide Konzentrationen für Kristallisationsscreens mit den Kits Cryos Suite, ComPAS Suite, Classics Suite sowie JCSG+ Suite verwendet wurden.

Des Weiteren wurden Kristallisationsscreens mit hPrP121-230 und den Peptiden 13C sowie 14C im 4-fachen molaren Konzentrationsüberschuss angesetzt. Die verwendeten Proteinkonzentrationen mit dem Peptid 13C betragen 2,7 mg/mL und 4,8 mg/mL sowie 3,2 mg/mL und 4,8 mg/mL mit dem Peptid 14C (Abbildung 43). Dazu wurden die Kristallisationskits AmSO₄ Suite, Morpheus, PACT premier sowie JCSG+ Suite benutzt. Die erhofften Proteinkristalle blieben jedoch aus.

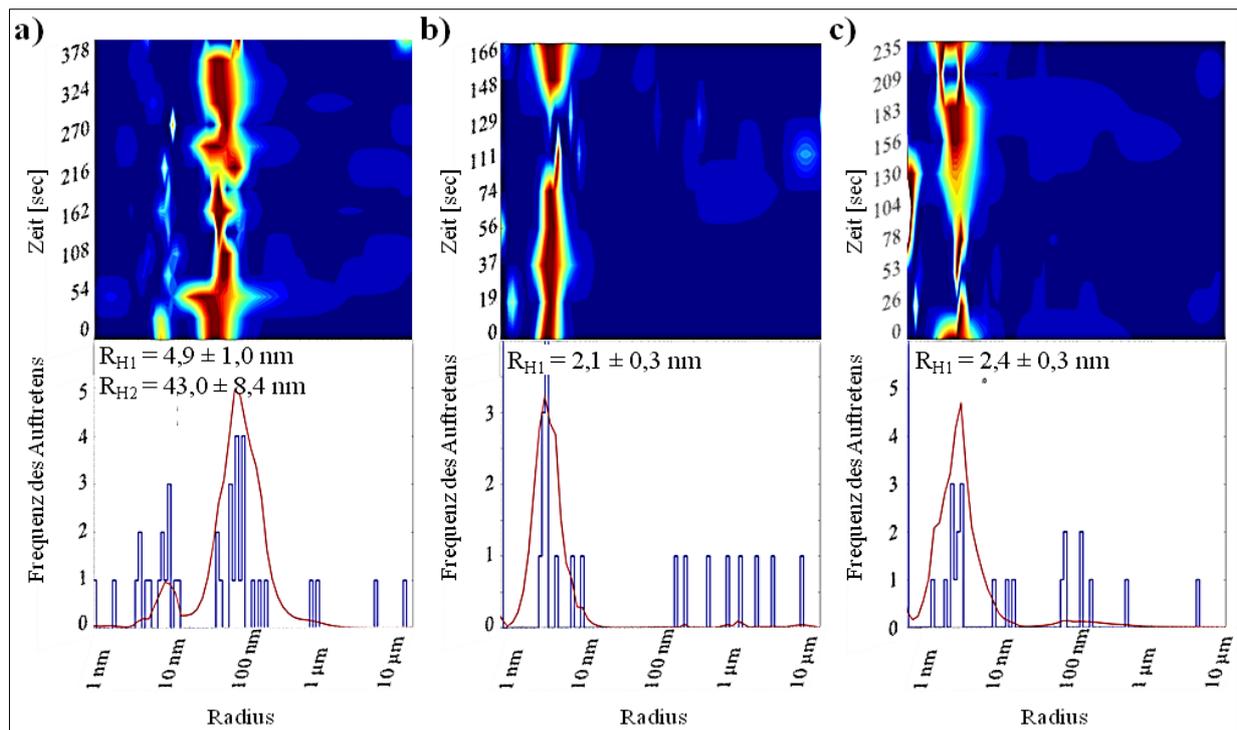


Abbildung 43: DLS-Messungen der Proteinproben für die Kristallisationsansätze mit der jeweiligen Radienverteilung (oben) und dem dazugehörigen Histogramm (unten). Die ermittelten hydrodynamischen Radien (R_H) der in Lösung befindlichen Moleküle sind angegeben. a) hPrP121-230 bildete bei einer Konzentration von 10 mg/mL hochmolekulare Aggregate. b) Die Mischung aus Peptid 8 und hPrP121-230 wies neben dem erwarteten R_H von etwa 2 nm für monomeres PrP keine Aggregate auf, ebenso c) in der Mischung aus hPrP121-230 und Peptid 13C wurden nur wenige Anzeichen für Aggregation erhalten.

Parallel wurde auch noch das Kristallisationsverhalten von hPrP121-230 nach partieller Proteolyse mit der Protease Proteinase K untersucht. Das humane PrP hat in seiner vollen Länge einen sehr flexiblen, ungefalteten N-Terminus, weshalb für die Kristallisationsversuche ausschließlich das hPrP121-230-Konstrukt eingesetzt wurde. Jedoch weist auch dieses verkürzte Protein noch einige flexible, teilweise ungefaltete Bereiche insbesondere am N-Terminus auf, wie beispielsweise den Sequenzbereich von AS 121-125. Diese flexiblen Proteinabschnitte wirken sich ebenfalls negativ auf die Kristallisation aus, daher sollten flexible, nicht gefaltete Bereiche sowie flexible Loops durch die PK abgespalten und dadurch die Kristallisation des PrP begünstigt werden. Dazu wurde das hPrP121-230 mit einer Konzentration von 4,8 mg/mL im molaren Verhältnis 1:10 000 sowie 1:100 000 mit PK versetzt und direkt nach Ansatz wurden Kristallisationsansätze mit den Kits AmSO₄ Suite, Morpheus, PACT premier sowie JCSG+ Suite angesetzt. Um die Auswirkungen der PK auf hPrP121-230 genauer zu analysieren, wurden Ansätze mit PK und PrP in den Konzentrationsverhältnissen 1:500, 1:1 000, 1:5 000 sowie 1:10 000 hergestellt und nach einer Inkubationszeit von 0, 10, 30, 60 und 180 Minuten sowie 24 Stunden bei Raumtemperatur Proben entnommen, die mittels

SDS-PAGE analysiert wurden (Abbildung 44). Dabei konnte jedoch keine Verschiebung der Proteinbande auf dem Gel visualisiert werden, welche durch das Abspalten ungefalteter Proteinbereiche zu erwarten war. Eine signifikante Abnahme der Bandenintensität des PrP mit fortschreitender Inkubationszeit bei den Konzentrationsverhältnissen 1:500 und 1:1 000 war aber zu beobachten. Auch bei den Verhältnissen der Konzentration von 1:5 000 und 1:10 000 war eine leichte Intensitätsabnahme der Proteinbanden zu verzeichnen, diese war jedoch sehr viel geringer. Damit das Protein während der Kristallisation nicht komplett von der PK abgebaut wird, wurde die Konzentration der PK im molaren Verhältnis zum hPrP121-231 folglich sehr niedrig gewählt (1:10 000, 1:100 000).

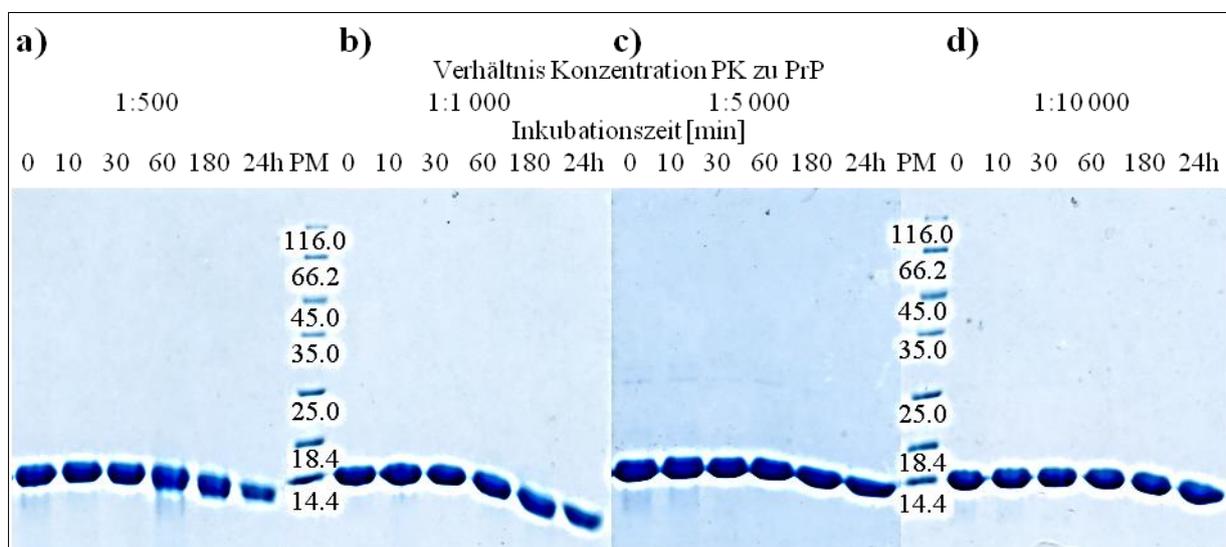


Abbildung 44: SDS-PAGE (15 %, Coomassie-Färbung) der Zeitreihe (0, 10, 30, 60, 180 Minuten und 24 Stunden) zur proteolytischen Spaltung des hPrP121-230 mit PK in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen (a) 1:500, b) 1:1 000, c) 1:5 000, d) 1:10 000). Dabei konnte keine Verschiebung der Proteinbande durch die Abspaltung von ungefalteten Protein-Abschnitten erkannt werden. Es wurde nur eine leichte Abnahme der Intensität der PrP-Bande mit steigender PK-Konzentration und längerer Inkubationszeit deutlich, die auf einen vollständigen Abbau des PrP unter diesen Bedingungen hindeutet.

In den D10-Ansätzen (Abbildung 45) der Platten aus dem Screen mit beiden PK-Konzentrationen und dem Kristallisationskit JCSG+ Suite wurden schon nach vier Tagen Inkubation bei 20 °C Kristalle sichtbar. Das Reservoir enthielt als Puffersubstanz 0,1 M MES (pH 6,5), das Salz Calciumacetat (0,2 M) sowie den Präzipitanten PEG 300 (40 %).

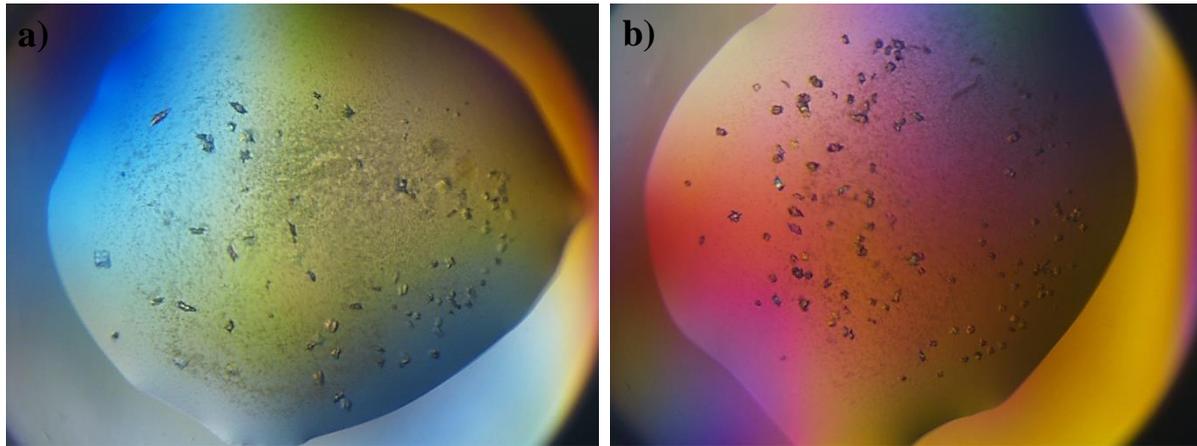


Abbildung 45: Kristalle des PrP-PK-Gemisches im Well D10 des Kristallisationskits JCSG+ mit 0,1 M MES als Puffersubstanz (pH 6,5), 0,2 M Calciumacetat sowie 40 % PEG 300 (v/v). Die PK-Konzentrationen zum PrP im molaren Verhältnis lagen bei a) 1:10 000 und b) 1:100 000. Die Platten wurden vier Tage bei RT inkubiert.

Die zuvor beschriebenen Kristalle sowie zwei weitere Kristalle aus anderen Bedingungen (D6: 0,2 M Magnesiumchlorid, 0,1 M Tris pH 8,5, 20 % PEG 8 000; D11: 0,14 M Calciumchlorid, 0,07 M Natriumacetat pH 4,6, 14 % Isopropanol, 30 % Glycerin) wurden mittels SONICC (*Second Order Nonlinear Imaging of Chiral Crystals*) untersucht. SONICC ist eine neue Methode zur Kristallerkennung und basiert auf Zwei-Photonen-Streuung, welche praktisch den gesamten Hintergrund von zufällig ausgerichteten Molekülen eliminiert, aber ein starkes Signal von chiralen Molekülen in einem Kristall erzeugt. Die Kristalle gaben im SONICC ein vielversprechendes Signal und zeigten auch im UV-Licht ein schwaches Leuchten (Abbildung 46). Allerdings bewiesen anschließend durchgeführte Beugungstests an einem Röntgengenerator, dass es sich bei den Kristallen um Salzkristalle handelte.

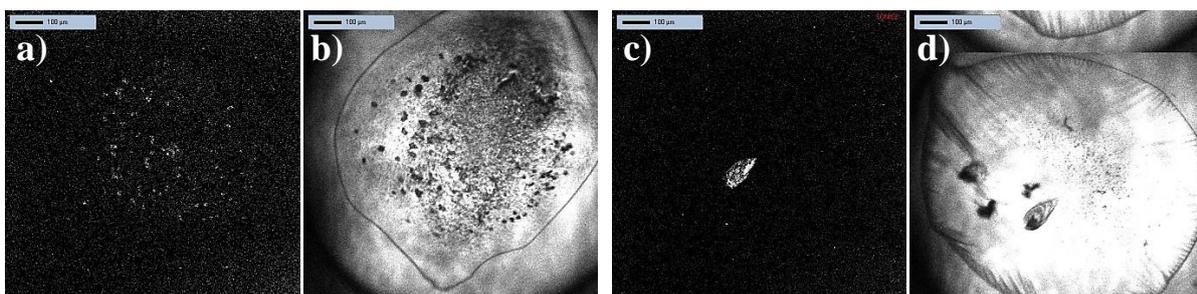


Abbildung 46: SONICC-Aufnahmen der Ansätze a) D10 und c) D11 mit einer PK-Konzentration im molaren Verhältnis zum PrP 1:100 000 sowie die dazugehörigen UV-Bilder b) und d). Ein positives SONICC- und UV-Signal deutet auf das Vorhandensein von Proteinkristallen hin, was jedoch mittels Beugungstest an einem Röntgengenerator nicht bestätigt werden konnte.

3.6.1. *In-vivo*-Kristallisation

Zur Untersuchung der rekombinanten Genexpression in Sf9-Zellen und einer möglichen *in-vivo*-Kristallisation wurde ein Expressionstest mit dem hergestellten P2-Stock sowie einer Kontrolle ohne Virus durchgeführt. Dazu wurde der P2-Stock in verschiedenen Verdünnungen (1:500, 1:100, 1:10) eingesetzt und mit $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/Well für 72 und 96 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Medium abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde in Probenpuffer gelöst, im Ultraschallbad behandelt und bei 96 °C gekocht. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE getrennt und durch einen anschließenden Western Blot analysiert (Abbildung 47).

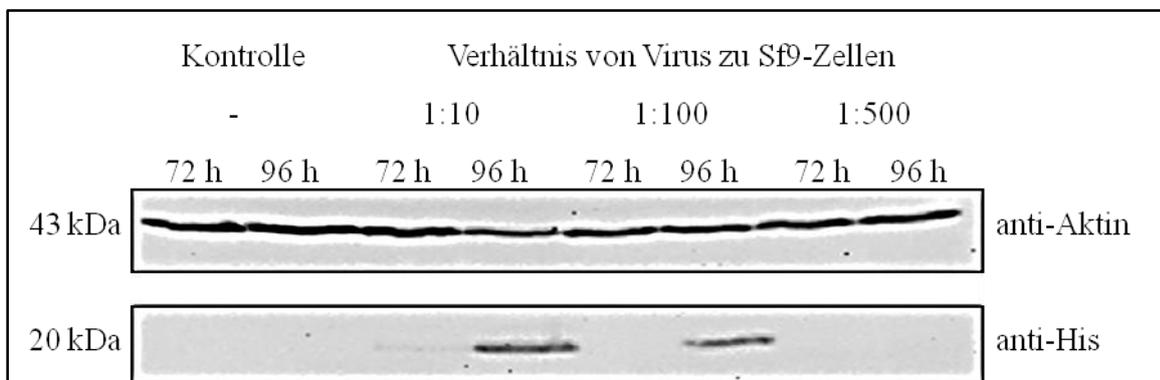


Abbildung 47: Western Blot des Expressionstests zur rekombinanten Genexpression in Sf9-Zellen mit dem mittels anti-Aktin-Antikörper detektiertem Aktin-Protein (43 kDa) als Auftragskontrolle sowie dem durch anti-His-Antikörper nachgewiesenem PrP (20 kDa).

Das Aktin-Protein, welches in Zelllysaten mittels eines monoklonalen β -Aktin-Antikörpers erkannt wurde, diente als Kontrolle der aufgetragenen Gesamtproteinmenge. In den Virusverdünnungen 1:10 und 1:100 war die rekombinante Genexpression des mPrP89-231 in Insektenzellen erfolgreich, aber es traten keine zytosolischen *in-vivo*-Kristalle auf.

4. Diskussion

Es sind bereits mehr als 90 Jahre vergangen, seit die ersten Prionen-Erkrankungen beim Menschen beschrieben und vor mehr als 30 Jahren der Begriff „Prion“ sowie die „Protein-only“-Theorie geprägt wurden (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921; Prusiner, 1982). Obwohl seither viele Wissenschaftler versucht haben, den Verlauf der Umwandlung des PrP sowie die damit verbundene Toxizität besser zu verstehen und dadurch therapeutische Ansätze zu entwickeln, erbrachte dies bis heute jedoch nur bedingt hinreichende Erkenntnisse. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass reaktive Sauerstoff- (ROS) bzw. Stickstoffspezies (RNS) und erhöhter oxidativer Stress zur Pathogenese der Prionen-Krankheit beitragen (Choi *et al.*, 1998; Ju *et al.*, 1998; Guentchev *et al.*, 2000; Androletti *et al.*, 2002; Guentchev *et al.*, 2002; Brazier *et al.*, 2006). Obwohl inzwischen oxidativer Stress und die damit verbundene Bildung der ROS und RNS sowie die Oxidation von Aminosäureresten als Induktor der PrP-Umwandlung angesehen wird, konnte der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus bisher nicht aufgeklärt werden (Stadtman, 1992; Berlett und Stadtman, 1997; Milhavet *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001; Requena *et al.*, 2001; Milhavet und Lehmann, 2002; Kirkwood, 2005; Redecke *et al.*, 2006; Yun *et al.*, 2006; Baskakov und Breydo, 2007; Butterfield *et al.*, 2007; Pamplona *et al.*, 2008; Colombo *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2014). Die Erzeugung der ROS und RNS kann einerseits durch Übergangsmetallionen erfolgen, die durch die Änderung ihrer Oxidationsstufe Sauerstoff- und Stickstoff-Radikale über die Fenton- und Haber-Weiss-Reaktion generieren können (Halliwell und Gutteridge, 1999). Andererseits können aber auch durch UV-Strahlung die radikalischen Oxidationsreaktionen direkt und indirekt induziert werden (Davies, 2003 und 2005; Pattison und Davies, 2006; Thakur und Rao, 2008; Redecke *et al.*, 2009). Es wurde bereits in vorherigen Arbeiten gezeigt, dass mittels UV-Bestrahlung die PrP-Umwandlung und Aggregation induziert und dabei spezifisches oligomeres PrP gebildet werden kann, jedoch konnte der detaillierte Verlauf der Umwandlung vom PrP-Monomer zum PrP-Oligomer bisher nicht aufgeklärt werden (Redecke *et al.*, 2009). Durch die Verwendung eines DLS-Systems im Fluss sollte nun der Ablauf des Prozesses der Oligomerbildung untersucht und die während der Aggregation gebildeten molekularen Zustände detektiert werden.

Diese Arbeit gliedert sich in einen technischen Teil, der sich mit der Etablierung und Optimierung eines UV-Bestrahlungssystems mit einem integrierten Online-DLS-System befasst, und einen zweiten Anwendungsteil, in dem die optimierte Methodik zusammen mit weiteren Untersuchungsmethoden zur Aufklärung der PrP-Umwandlung und Aggregation angewendet wurde.

4.1. UV-Bestrahlungssystem mit integriertem Online-DLS-System

In ein bereits in vorherigen Studien etabliertes UV-Bestrahlungssystem wurde ein Online-DLS-Gerät integriert und getestet (Redecke *et al.*, 2009). Online DLS-Messungen im konstanten laminaren Fluss wurden bisher nur in Studien zur Untersuchung von Polystyrol-Latexpartikeln angewendet. Leung *et al.* konnten 2006 erfolgreich zeigen, dass mittels DLS-Messungen im Fluss durch eine nach Chowdhury *et al.* (1984) modifizierte Autokorrelationsfunktion sowohl die Größe als auch die Geschwindigkeit der Partikel bestimmt werden kann. Die Genauigkeit des modifizierten Verfahrens der Partikelmessung über den Bereich von Durchmessern (50, 100 und 250 nm) und Geschwindigkeiten (0 bis 6,5 cm/s) schien besser als die der herkömmlichen DLS-Datenanalyseverfahren zu sein. Nach derzeitigem Kenntnisstand wurden jedoch noch keine Proteine mittels DLS-Messungen im konstanten Fluss charakterisiert. Eine Vielzahl von industriellen und biologischen Anwendungen würde jedoch von der Online-Überwachung von Dispersionen unter Flussbedingungen profitieren. Auch in der Forschung sind DLS-Messungen im Fluss von besonderem Interesse. So könnte zum Beispiel direkt vor und nach einer SAXS-Messung die Dispersität der entsprechenden Probe untersucht werden, um Aggregationen in der Probe vor oder während der Messung ausschließen zu können. Eine zuverlässige Methode zur Messung von Partikelgrößen im Flusssystem bietet den Vorteil, dass das entsprechende System verlustfrei vermessen werden kann und die Messungen direkt und ohne Zeitverzögerungen, in denen sich die Zusammensetzung der Probe ändern könnte, erfolgen. Die in dieser Arbeit durchgeführten online DLS-Messungen der verschiedenen Proteine zeigen, dass eine Ermittlung der Partikelgröße auch bei Proteinen im strömenden Medium generell möglich ist. Dabei musste jedoch berücksichtigt werden, dass die Fließgeschwindigkeit signifikante Auswirkung auf die Ermittlung der hydrodynamischen Radien hat, ebenso wie das Molekulargewicht und die Konzentration des Proteins in Lösung. Leung *et al.* hatten bereits 2006 festgestellt, dass kleinere Partikel im Fluss im Vergleich zur statischen DLS-Messung nur einen geringen Fehler bezüglich der hydrodynamischen Radien aufweisen. Bei größeren Partikeln und geringer Fließgeschwindigkeit ist der Fehler des ermittelten hydrodynamischen Radius ebenfalls klein, nimmt jedoch mit steigender Fließgeschwindigkeit zu. Mit steigendem Molekulargewicht war dieser Effekt auch bei den hier durchgeführten DLS-Messungen der Standardproteine zu beobachten. Im Gegensatz dazu hatte die Akkumulationszeit der einzelnen DLS-Messung kaum einen Einfluss auf die ermittelten R_H -Werte. Die statische DLS-Software konnte zur Auswertung der online DLS-Messungen erfolgreich und zuverlässig eingesetzt werden, wenn eine konstante Fließgeschwindigkeit von 3,0 mL/min und eine Akkumulationszeit von jeweils 20 Sekunden mit 10 Wiederholungen

eingestellt wurde. Die online DLS-Messungen eignen sich hervorragend, um hydrodynamische Radien, Polydispersitäten und Aggregationen von Proteinmolekülen zu verfolgen, wenn mit geringen Fließgeschwindigkeit gearbeitet wird, die Proteinstrukturen vorwiegend globulär und die Moleküle nicht zu groß sind.

4.2. Anwendung des UV-Bestrahlungssystems zur Induktion der Umwandlung und Aggregation des Prion-Proteins

Die Ergebnisse vorangegangener Studien zur PrP-Umwandlung und Aggregation mittels UV-Bestrahlung konnten zunächst reproduziert und bestätigt werden. Durch das integrierte Online-DLS-System sowie durch die Messung der Transmission konnte die Aggregation des PrP effektiv überwacht werden. Gleichzeitig wurde mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen, dass die Umwandlung der α -helikalen PrP^C-Form in eine β -Faltblatt-reiche PrP^{Sc}-Isoform durch die Strahlung im UV-Bereich induziert werden kann. Dabei zeigte insbesondere die Messung der Transmission hinter der Küvette, dass dieser Wert als sicherer Marker und Parameter für den fortschreitenden Umwandlungs- und Aggregationsprozess des PrP fungieren kann. UVC-Strahlung, die normalerweise in vielen Bereichen zur Abtötung von Viren und Bakterien verwendet wird, induzierte bei der Bestrahlung des PrP die Umwandlung und Aggregation ebenso wirksam wie die bereits in vorherigen Experimenten verwendete UVB-Strahlung. Die sehr kurzwellige, energiereiche UVC-Strahlung wird maximal von DNA und anderen Biomolekülen absorbiert und ist äußerst schädlich für genetisches Material und biologische Gewebe (Girard *et al.*, 2011). Während UVC-induzierte Veränderungen von Nukleinsäuren sauerstoffunabhängig sind, werden photochemische Schäden von Proteinen hauptsächlich durch ROS vermittelte photodynamische Reaktionen verursacht, welche auch die PrP-Umwandlung und Aggregation induzieren (Chin *et al.*, 1995).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Prozess der PrP-Umwandlung durch die Parameter Wellenlänge, Laserleistung, Fließgeschwindigkeit und Bestrahlungszeit beeinflusst wird. Sowohl durch die Erhöhung der Laserleistung als auch durch kurzwelligere, energiereichere Strahlung kann die PrP-Umwandlung beschleunigt und somit die Bestrahlungszeit bei geringer Fließgeschwindigkeit verkürzt werden. Die entstandenen Produkte unterscheiden sich nach der UVC- und UVB-Bestrahlung nicht voneinander, lediglich die Entstehungszeit variiert. Folglich wurde ein leistungsfähiges System zur Erzeugung von größeren Mengen spezifischer, löslicher PrP-Oligomere etabliert, dessen Erfolg schon während der UV-Bestrahlung zum einen aufgrund der mittels DLS ermittelten Radienverteilung sowie der Erhöhung der DLS-Zählrate und zum anderen durch die Abnahme der Transmission der UV-bestrahlten PrP-Probe verfolgt

werden kann. Im Gegensatz zu anderen Umwandlungssystemen müssen die gebildeten PrP-Oligomere für weitere Analysen nicht von möglicherweise störenden Komponenten getrennt werden, wie beispielsweise von den Kupferionen beim metallkatalysierten Aggregationstest. Außerdem können mit dem UV-System zeitaufgelöste Untersuchungen durchgeführt und binnen kurzer Zeit große Mengen der spezifischen Oligomere erzeugt werden.

Neben der Etablierung eines neuen technischen Systems zur Erzeugung oligomerer PrP-Spezies konnten auch neue Erkenntnisse in Bezug auf den Mechanismus der Umwandlung des PrP gewonnen werden.

Aufgrund der Unlöslichkeit des PrP^{Sc} und dessen Neigung zur Aggregation stehen derzeit keine hochauflösenden Strukturen zur Verfügung. Jedoch wurden bereits mehrere 3D-Strukturmodelle von PrP^{Sc} postuliert, die auf Ergebnissen verschiedenster biochemischer und biophysikalischer Methoden, wie spektroskopische Analysen, Elektronenmikroskopie, Faser-Röntgenbeugung, Röntgenkleinwinkelstreuung, Wasserstoff/Deuterium (H/D)-Austausch, limitierte Proteolyse und Oberflächenreaktivitätsmessungen basieren (Huang *et al.*, 1996; Wille *et al.*, 2002; Govaerts *et al.*, 2004; Tattum *et al.*, 2006; Cobb *et al.*, 2007; Wille *et al.*, 2009; Baron *et al.*, 2011; Smirnovas *et al.*, 2011; Vázquez-Fernández *et al.*, 2012; Amenitsch *et al.*, 2013; Groveman *et al.*, 2014; Requena und Wille, 2014). Eine kürzlich durchgeführte Beurteilung offenbarte jedoch Diskrepanzen zwischen den derzeit bekannten experimentellen Daten und den theoretischen Modellen (Requena und Wille, 2014). Folglich sind trotz großem Interesse an der Strukturaufklärung des PrP^{Sc} bis heute nur wenige molekulare Details dieser Isoform bekannt (Diaz-Espinoza und Soto, 2012). Die zur Zeit anerkannten strukturellen Merkmale des PrP^{Sc} sind beispielsweise ein erhöhter Anteil an β -Faltblatt-Strukturen, der auch bei den UV-bestrahlten PrP-Proben mittels CD-Spektroskopie nachgewiesen wurde, und eine im Vergleich zum PrP^C erhöhte Proteinase K-Resistenz, obwohl letzteres Merkmal nicht obligatorisch ist. Fibrilläres PrP^{Sc} zeigt eine typische *Cross- β* -Faltblatt-Architektur, die charakteristisch für Amyloidstrukturen ist (Caughey *et al.*, 1991; Gasset *et al.*, 1993; Nguyen *et al.*, 1995; Prusiner, 1998; Safar *et al.*, 1998; Wille *et al.*, 2009).

Die unter Ausnutzung der bisher bekannten Strukturinformationen von PrP^{Sc} mittels Modellierungsverfahren vorgeschlagenen theoretischen Modelle zur Beschreibung der PrP^{Sc}-Struktur variieren mehr oder weniger stark. Das auf Faser-Röntgenbeugung und Computermodellierungstechniken basierende „ β -helikale Modell“ postuliert einen Kern aus einem viersträngigen β -Faltblatt, gebildet durch das Segment ~90-175, das in einer β -helikalen Konfiguration organisiert ist, während die Helices α 2 und α 3 des PrP^C ihre native Konformation beibehalten (Govaerts *et al.*, 2004). Das „Spiral-Modell“ beruht auf molekulardynamischen

Simulationen. Während der Umwandlung des PrP^C durch die Verlängerung der beiden nativen β -Faltblätter im PrP^C soll ein einziger langer β -Faltblatt-Strang erzeugt werden, welcher mit anderen PrP-Molekülen interagiert und dadurch zur Polymerisation führt (DeMarco *et al.*, 2006). In beiden Modellen ist die Grundeinheit der Oligomere ein Trimer. Diese theoretischen Strukturmodelle des PrP^{Sc} wurden relativ schnell widerlegt (DeMarco *et al.*, 2006). Deuteriumaustauschexperimente mit aus dem Gehirn infizierter Mäuse stammenden PrP^{Sc} zeigten einen langsamem Austausch im Bereich des gesamten C-Terminus beginnend im Bereich der AS 80-90, was für eine Struktur mit kontinuierlichen β -Faltblatt-Strängen typisch ist, da das Deuterium in diesem Sekundärstruktur-Motiv über eine Wasserstoffbrücke eine stabile Bindung ausbildet und somit gegen beide vorgeschlagenen Modelle spricht (Smirnovas *et al.*, 2009 und 2011). Daraus resultiert ein komplett anderes Strukturmodell für PrP^{Sc}, das sogenannte „erweiterte *in-Register* β -Faltblatt-Modell“ (Cobb *et al.*, 2007; Smirnovas *et al.*, 2011). Dieses PrP^{Sc}-Modell beinhaltet β -Faltblatt-Stränge, die über relativ kurze Wendungen und/oder Schleifen verbundenen sind, und besitzt keine α -Helices. Die parallelen β -Faltblätter bilden einen Stapel mit einer *in-Register* Anordnung aus, was ein unbestimmtes Wachstum der Fibrillen erlaubt. Allerdings wurden auch zu diesem Modell widersprüchliche Daten erhalten. Einerseits wurde mittels CD-Spektroskopie von PrP^{Sc} kein reines β -Faltblatt-Signal gemessen. Andererseits könnten diesem postulierten Modell folgend keine oligomeren Spezies entstehen, sondern ausschließlich Fibrillen, was sowohl durch diese Arbeit als auch bereits durch viele vorherige Studien widerlegt wurde (Jansen, 2001; Silveira *et al.*, 2005; Redecke *et al.*, 2006 und 2009; Larda *et al.*, 2013; Trevitt *et al.*, 2014).

Da diese PrP-Oligomere in Verdacht stehen, die neurotoxischen und infektiösen Spezies der Prionen-Erkrankungen zu sein, ist es von großem Interesse, oligomere PrP-Strukturen zu untersuchen (Silveira *et al.*, 2005; Simoneau *et al.*, 2007; Laganowsky, 2012). Um aufzuklären, wodurch die postulierte Neurotoxizität und Infektiosität zustandekommt, wird eine leistungsfähige *in-vitro*-Methode zur Erzeugung der spezifischen Oligomere in ausreichender Menge benötigt.

Die meisten bis heute bekannten Methoden zur Herstellung von PrP-Oligomeren weisen keine physiologischen Bedingungen auf. So wurden Oligomere mit einem hydrodynamischen Radius von 6,5 nm und einer Masse über 200 kDa hergestellt, indem Gu-HCl-denaturiertes, rekombinantes hPrP90-231 gegen Harnstoff-Puffer dialysiert wurde (Gerber *et al.*, 2007). Ebenfalls durch Dialyse in Harnstoff-Puffer wurde rekombinantes Hamster PrP90-231 in ein β -Oktamer umgewandelt mit einem hydrodynamischen Radius von etwa 6 nm (Larda *et al.*, 2013). Vendrely *et al.* inkubierte 2005 Maus PrP23-231 in Natriumcitrat zur Herstellung eines

Gemisches aus zwei Oligomeren mit Durchmessern im Bereich von 6 bis 9 nm bzw. 4 bis 5 nm, wobei das kleinere Oligomer aus 8 bis 15 Monomeren aufgebaut ist. Außerdem wurde aus rekombinantem PrP (Maus 89-231 und Hamster 90-231) ein sogenanntes β -Oligomer durch Rückfaltung (mit Harnstoff) gebildet, welches einen hydrodynamischen Radius von 6,5 nm und ein Molekulargewicht von etwa 300 kDa aufweist (Baskakov *et al.*, 2002). Nach der Methode von Jackson *et al.* (1999) wurde durch Reduktion der Disulfidbrücke des rekombinanten hPrP23-231 und anschließender Rückfaltung aus Gu-HCl-Puffer ein Oligomer mit einem Durchmesser von etwa 47 nm mittels AFM identifiziert (Sasaki *et al.*, 2008). Oligomere, die durch partielle Disaggregation von aus dem Gehirn infizierter Hamster stammendem PrP^{Sc} entstanden sind, wiesen einen Durchmesser von 17-27 nm und 300-600 kDa auf (Silveira *et al.*, 2005).

Bezüglich des hydrodynamischen Radius und des Molekulargewichts entspricht das im Rahmen dieser Arbeit erzeugte, UV-induzierte mPrP89-231-Oligomer dem durch Rückfaltung erzeugten mPrP89-231-Oligomer (Baskakov *et al.*, 2002). Die von Vendrely *et al.* gebildeten mPrP23-231-Oligomere glichen dem UV-Oligomer in Bezug auf die Anzahl der Monomere, aus denen es aufgebaut ist, waren aber viel kleiner. Die Größe des durch UV-Bestrahlung generierten hPrP90-230-Oligomer stimmte in keinerlei Hinsicht mit einem der bereits bekannten hPrP-Oligomere überein. Die Reproduzierbarkeit der Herstellung der löslichen Oligomere des mPrP89-231 sowie des hPrP90-230 konnte jedoch in dieser Arbeit nachgewiesen werden, da die hydrodynamischen Radien (DLS) bzw. Trägheitsradien (SAXS) der durch Oxidation in vorherigen Studien hergestellten Oligomere glichen (Redecke *et al.*, 2006 und 2009). Trevitt *et al.* (2014) erzeugten durch Rückfaltungsexperimente von denaturiertem mPrP91-231 in eine vorwiegend β -Faltblatt-reiche Form eine Vielzahl verschiedener, löslicher, oligomerer Spezies und kamen dann zu dem Ergebnis, dass nur hPrP23-231 ein spezifisches, nicht-fibrilläres, lösliches Oligomer bildet. Die mittels UV-Bestrahlungssysteme erzeugten löslichen Oligomere wiesen jedoch alle der Spezies entsprechende spezifische hydrodynamische Radien auf.

Zur Aufklärung des UV-induzierten Aggregationsprozesses, der in der Entstehung der spezifischen Oligomere resultiert, sollte eine zunächst dem apparenten Molekulargewicht nach scheinbar „dimere“ PrP-Spezies isoliert werden, die während der UV-Bestrahlung in der PrP-Lösung detektiert wurde. Die nicht erfolgreichen Trennungsversuche unter Anwendung verschiedenster Verfahren lassen aber darauf schließen, dass der unter denaturierenden Bedingungen apparente „dimere“ Zustand nicht dem tatsächlichen Molekül unter nativen Bedingungen in Lösung entspricht. Dies wird ebenfalls durch die Radienverteilung aus den

DLS-Messungen der UV-bestrahlten Mischfraktion (Monomer, „Dimer“) deutlich. Möglicherweise bilden die PrP-Monomere durch intermolekulare Wechselwirkungen diffuse, größtenteils ungeordnete Vorläufer-Oligomere, in welchem die Proteine bedingt durch den engen Kontakt infolge radikalischer Oxidationsreaktionen kovalent verknüpfte dimere PrP-Untereinheiten ausbilden beispielsweise durch radikalische Dimerisierung von Tyrosin-Resten (Davies und Dean, 1997; Baskakov *et al.*, 2007; Pattison *et al.*, 2012). Durch weitere Oxidationsreaktionen entstehen in einer Art Reifungsprozess weitere kovalente Verknüpfungen zu trimeren und anschließend tetrameren Untereinheiten. Dadurch bildet das Oligomer schrittweise eine kompaktere, geordnetere Struktur aus, die letztendlich in dem löslichen, spezifischen, β -Faltblatt-reichen Oligomer resultiert. Für die mittels UV-Bestrahlung erzeugten Oligomer-Vorstufen und die spezifischen, finalen Oligomere konnte kein Nachweis für kovalente Bindungen zwischen den monomeren PrP-Bausteinen und/oder für Oxidationen an definierten Aminosäureresten erbracht werden. Jedoch lassen sowohl die detektierten Proteinbanden auf dem denaturierenden SDS-Gelen als auch die Ergebnisse der online DLS-Messungen die Schlussfolgerung zu, dass die spezifischen Oligomere das finale Resultat eines zunächst diffusen Aggregats aus vorwiegend α -helikalen PrP-Monomeren sind. Aufgrund der aufgenommenen CD-Spektren scheint die Umwandlung vom vorwiegend α -helikalen Zustand in die β -Faltblatt-reiche Struktur mit der Oligomerisierung einherzugehen. Sowohl Lührs *et al.* (2006) als auch Hafner-Bratkovic *et al.* (2011) sehen die Dimerisierung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Umwandlung des PrP^C in PrP^{Sc} an, dies kann aufgrund der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse nicht bestätigt werden, da nur Fraktionen mit signifikantem Oligomeranteil ein typisches β -Faltblatt-Signal aufwiesen.

Bisher wurden zwei Hauptmechanismen vorgeschlagen, um die Ausbreitung von PrP^{Sc} aus PrP^C und der Aggregation in Amyloidfibrillen zu erklären (Corsaro *et al.*, 2012). Der erste Mechanismus geht davon aus, dass das korrekt gefaltete PrP verschiedene Zwischenstufen durchläuft, von denen einige zur Selbstassoziation imstande sind und nicht-native oligomere Spezies in verschiedenen Größen und Strukturen bilden können (Caughey, 2001). Beim zweiten Mechanismus wird davon ausgegangen, dass die Interaktion zwischen PrP^{Sc} mit PrP^C die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} induziert, wodurch stabile oligomere Aggregate generiert werden (Aguzzi, 2004). In diesen beiden Modellen wird monomeres PrP^C allein oder durch die Anwesenheit von anderen PrP^{Sc}-Molekülen in PrP^{Sc} umgewandelt, welche sich dann zu oligomeren Strukturen zusammenlagern. Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die UV-induzierten oligomeren Spezies entstehen, indem die monomere PrP-Moleküle eine Art diffuses Vorläufer-Oligomer bilden, welches mit voranschreitender

oxidativer Schädigung kovalente Verknüpfungen ausbildet und eine Änderung der Struktur in die β -Faltblatt-reiche PrP-Isoform zur Folge hat.

4.3. Das Prion-Protein als Übergangsmetall-bindendes Protein

Das PrP ist das am besten untersuchte Übergangsmetall-bindende amyloidogene Protein, welches in Verbindung mit neurodegenerativen Erkrankungen steht (Prusiner *et al.*, 1998; Linden *et al.*, 2008). Der Nachweis erhöhter Konzentrationen von Übergangsmetallen in Hirngewebe von Pateinten, die mit Prionen infiziert sind, deutet auf einen Zusammenhang zwischen der Bindung von Übergangsmetallionen durch das PrP und den neurodegenerativen Erkrankungen hin, ebenso wie die nachgewiesenen hohen Konzentrationen an Kupferionen. Mittels TXRF-Analyse konnten sowohl im Rahmen dieser Arbeit als auch 2006 durch Redecke *et al.* Kupferionen in PrP-Proben detektiert werden, welche *in vitro* unter metallkatalysierten oxidativen Bedingungen erzeugt wurden. Das PrP besitzt vier bis sechs Kupfer-Bindungsstellen, welche in der *Octarepeat*-Region des PrP sowie an den Histidin-Resten 95 und 110 (mPrP) bzw. 96 und 111 (hPrP) lokalisiert sind (Brown *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2005; Gaggelli *et al.*, 2005; Viles *et al.*, 2008). Die hohe Bindungsaffinität dieser Histidin-Reste zu Übergangsmetallionen kann durch die starke unspezifische Bindung an Ni-NTA-Agarose-Matrix und die damit verbundenen Probleme bei der Abtrennung der prozessierten Hexahistidinsequenz vom mPrP89-231 und hPrP90-230 im Rahmen dieser Arbeit belegt werden. Es gibt viele Studien zur Ermittlung der Bindungsaffinität von Cu(II) zum PrP, die je nach verwendeter Untersuchungsmethode und PrP-Spezies im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-14} M liegt (Jackson *et al.*, 2001; Davies und Brown, 2008; Kozlowski *et al.*, 2010). Neben Kupfer können auch andere Metallionen von PrP gebunden werden, die nächsthöhere Affinität weist Zn(II) auf (Qin *et al.*, 2002; Leach *et al.*, 2006). Zink ist das einzige Metall, das genauso wie Kupfer die PrP-Endozytose induziert (Pauly und Harris, 1998; Perera und Hooper, 2001). Es hemmt, wie Kupfer auch, die Fibrillenbildung des rekombinanten PrP und fördert im größeren Ausmaß als Kupfer die PrP-PrP Wechselwirkungen (Bocharova *et al.*, 2005; Kenward *et al.*, 2007). Zink wird ausschließlich durch die *Octarepeat*-Region gebunden, dabei sind vier *Octarepeats* notwendig, um ein Zn(II)-Ion zu koordinieren (Walter *et al.*, 2007). Da die *Octarepeat*-Region bei dem verkürzten hPrP90-230 nicht vorhanden ist, wurde folglich durch TXRF-Analyse der mit Zink inkubierten PrP-Probe in dieser Arbeit auch kein Zink nachgewiesen, was die postulierten Bindungsstellen zusätzlich validiert.

4.4. Einfluss des GPI-Ankers auf die Umwandlung des Prion-Proteins

Ein relevanter Parameter bei der Aggregation ist der GPI-Anker, durch den das PrP^C-terminal an der Zelloberfläche gebunden ist. Der GPI-Anker kann durch das Enzym Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase (PIPLC) vom PrP^C abgetrennt werden, im Gegensatz zum PrP^{Sc}, dessen PIPLC-Schnittstelle wahrscheinlich durch die Konformationsänderung nicht mehr zugänglich ist (Stahl *et al.*, 1990). In mit Maus-*Scrapie* infizierten Gewebekultur-Zellen erfolgt die Bildung von PrP^{Sc} an der Zelloberfläche und/oder entlang des endozytischen Weges (Caughey und Raymond, 1991; Borchelt *et al.*, 1992; Marijanovic *et al.*, 2009). Aufgrund der Lokalisierung von PrP^C und PrP^{Sc} in der Umgebung von Cholesterin- und Sphingolipid-reichen Membranmikrodomänen (Lipid Rafts), in der sich GPI-verankerte Proteine befinden, scheint der GPI-Anker für die Bildung von PrP^{Sc} wichtig zu sein (Kaneko *et al.*, 1997; Taraboulos *et al.*, 1995; Baron *et al.*, 2002; Baron *et al.*, 2003). Es wurde jedoch auch gezeigt, dass in *E. coli* hergestelltes rekombinantes PrP^C, welches weder einen GPI-Anker noch Glykosylierungen besitzt, *in vitro* durch die Zugabe von infiziertem Hirnhomogenisat Protease-resistentes PrP bilden kann (Kirby *et al.*, 2003; Atarashi *et al.*, 2007; Colby *et al.*, 2007). Andere Studien wiederum postulieren, dass der GPI-Anker, wenn überhaupt, nur minimale Auswirkungen auf die Prionen-Infektiosität hat. Die Entfernung der GPI-Anker aus reifem PrP^{Sc} reduzierte die Prionen-Infektiosität beispielsweise nicht (Lewis *et al.*, 2006). Weiterhin wurde ankerloses PrP^{Sc} in GPI-defizienten Mäusen in Form von Amyloidfibrillen generiert, welches hochinfektiös war (Chesebro *et al.*, 2005). Obwohl der GPI-Anker in nativem PrP^C und PrP^{Sc} vorhanden ist, bleibt seine genaue Rolle bei Prionen-Erkrankungen unklar.

Die Daten über den Einfluss des GPI-Ankers bei TSE-Infektionen divergieren. Um die Auswirkungen des GPI-Ankers auf die PrP-Umwandlung bzw. Aggregation *in vitro* zu untersuchen, sollten dessen charakteristische Eigenschaften in Form von Aminosäuren am PrP nachgeahmt werden. Da der GPI-Anker aufgrund des lipophilen Anteils die Löslichkeit des PrP herabsetzt und den zusätzlichen Einsatz von verschiedenen Detergentien zur Stabilisierung des Proteins zur Folge hätte, welche wiederum die PrP-Umwandlung beeinflussen und Ergebnisse verfälschen könnten, wurde der GPI-Anker durch die vier Aminosäurereste Glutamat, Phenylalanin, Glutamat, Alanin am C-Terminus simuliert. Die zusätzlichen Aminosäurereste haben die PrP-Löslichkeit nicht beeinträchtigt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vergleichende Untersuchungen mit und ohne mimikrierten GPI-Anker durchgeführt. Auf die inhibitorische Wirkung der Peptide hat dieser Anhang im Wesentlichen kaum einen Einfluss. Dies impliziert, dass die Bindung der stabilisierenden,

inhibitorischen Peptide nicht unmittelbar am C-terminalen Ende der Moleküle erfolgt. Der den GPI-Anker simulierende Anhang hat jedoch generell einen destabilisierenden Effekt auf die Struktur des PrP gezeigt. Dies wurde durch die direkte Auswirkung auf die Aggregationsgeschwindigkeit des PrP im metallkatalysierten Aggregationstest deutlich. Der simulierte GPI-Anker destabilisierte die vorwiegend α -helikale Struktur und beschleunigte die Aggregation. Die PrP-Umwandlung kommt durch Störung der strukturellen Integrität nach Modifikation von Aminosäuren durch Oxidation zustande, dies wird durch die zusätzliche Destabilisierung der Struktur durch den sehr flexiblen C-terminalen Anhang extra begünstigt. Die Flexibilität des C-terminalen EFEA-Anhangs wurde auch durch die SAXS-Daten des humanen PrP-Monomers 90-230 nachgewiesen. In mit *Scrapie* infizierten transgenen Mäusen, die PrP^C ohne GPI-Anker bilden, erfolgte die tödliche Degeneration des Gehirns langsamer, was auf einen Zusammenhang zwischen der Prionen-Pathogenese und dem GPI-verankerten PrP hindeutet (Chesebro *et al.*, 2010). In infizierten Zellen ist für die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} und zur Aufrechterhaltung der Infektion die Bindung des PrP an Membranen notwendig (Caughey und Raymond, 1991; McNally *et al.*, 2009). Außerdem spielt der GPI-Anker bei der Ausbreitung in und entlang neuronaler Schaltkreise eine Rolle (Klingeborn *et al.*, 2011). Wird den transgenen Mäusen, die nur PrP^C ohne GPI-Anker bilden, *Scrapie* ins Gehirn injiziert, akkumuliert PrP^{Sc} fast ausschließlich in extrazellulären Amyloid-Plaques, während bei einer peripheren Inokulation PrP^{Sc} nur im peripheren Gewebe akkumuliert (Chesebro *et al.*, 2005 und 2010; Klingeborn *et al.*, 2011).

Der mittels Aminosäuren simulierte GPI-Anker der verwendeten Konstrukte ist zwar hinsichtlich der Ladung dem nativen GPI-Anker ähnlich, jedoch die Flexibilität eines mit der Membranoberfläche verbundenen GPI-Ankers und des angefügten PrP ist vermutlich unähnlich. So kann im Rahmen dieser Arbeit zwar eine Aussage über die Auswirkung der Ladung und der durch den simulierten GPI-Anhang erhöhten Flexibilität hinsichtlich der Stabilisierung bzw. Destabilisierung der Struktur während der PrP-Umwandlung und Aggregation *in vitro* gemacht werden, jedoch nicht über das tatsächliche Verhalten des membranverankerten PrP.

4.5. Inhibition der Prion-Protein-Umwandlung und Aggregation

Auf dem Gebiet der Therapieentwicklung bei Prionen-Erkrankungen wurden bereits die verschiedensten Agenzien zur Behandlung bzw. Heilung untersucht. Bisher gibt es einige vielversprechende Ergebnisse mit Anti-Prionen-Immunisierungsverfahren (White *et al.*, 2003). Passive Immunisierungsversuche waren am effektivsten, wenn die spezifischen Antikörper

direkt nach einer bekannten Prionen-Exposition therapeutisch verabreicht wurden, um die Ausbreitung des PrP^{Sc} nach versehentlicher iatrogene Exposition auf das sekundäre lymphatische Gewebe zu begrenzen und eine krankheitsverlangsamende Wirkung zu erzielen. Die Antikörper konnten jedoch je nach Bindungsepitop neurotoxische Reaktionen ähnlich der in Prionen-Infektionen auslösen. N-terminal bindende Antikörper waren im Gegensatz zu den C-terminal bindenden aber in der Regel harmlos. Die großen Immunglobulin-Moleküle können allerdings die Blut-Hirn-Schranke (BHS) nicht durchqueren, wodurch die prophylaktische und therapeutische Wirksamkeit der passiven Impfung auf ein frühes Stadium der Prionen-Erkrankung in der Peripherie vor der Neuroinvasion begrenzt ist (Sonati *et al.*, 2013).

Das Problem der Durchquerung der BHS kann möglicherweise durch die Nutzung der eigenen Transportsysteme gelöst werden. Es gibt eine Reihe von Rezeptoren für zirkulierende Peptide oder Plasmaproteine. So könnte durch die Bildung eines Agens aus einem nicht BHS-gängigen, chimären Peptid und einem speziellen schrankengängigen Peptid die BHS durchdrungen werden (Pardridge, 2002). Bereits 1998 und 1999 untersuchten Chabry *et al.* Peptide, welche Sequenzteile des PrP darstellten, und wiesen nach, dass diese Peptide die Bildung des PrP^{Sc} *in vitro* inhibieren können. Des Weiteren wurden in einer Studie von Rehders *et al.* 2009 Oktapeptide der globulären Domäne der hPrP-Sequenz synthetisiert und deren Bindungsaffinität an das hPrP^C durch SPR sowie der Einfluss auf die PrP-Umwandlung bzw. Aggregation untersucht. Dabei wurden zwei Peptide mit starker Bindung zum PrP identifiziert. Zum Nachweis, ob diese Bindung einen Einfluss auf die PrP-Umwandlung und Aggregation hat, musste ein Verfahren angewendet werden, bei dem die native Struktur des PrP erhalten bleibt. Es wurde schon mehrfach der Beweis erbracht, dass die strukturelle Umwandlung durch Oxidation von Seitenketten ausgelöst wird, welche durch Cu(II)-Zugabe zu rekombinantem PrP induziert werden kann und in einer Protease-resistenten, nicht amyloidogenen Form des PrP resultiert (Bocharova *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu anderen Methoden, die die PrP-Struktur durch denaturierende Agenzien beeinflussen, behält das PrP beim metallkatalysierten Aggregationstest seine native Konformation und bildet im Verlauf die β -Faltblatt-reichen, löslichen Oligomere (Baskakov und Bocharova, 2005; Leffers *et al.*, 2005; Redecke *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010). Mit Hilfe dieses Aggregationstests konnte bereits von Rehders *et al.* (2009) nachgewiesen werden, dass nur eines der beiden bindenden Peptide die Aggregation hemmt, was bedeutet, dass eine Bindung an das PrP nicht gleichzeitig auch die Inhibition der PrP-Umwandlung und Aggregation zur Folge haben muss. Da dieser Aggregationstest leicht, schnell und ohne die Beeinträchtigung der nativen Struktur des Proteins durchgeführt werden

kann, wurde er auch in dieser Arbeit zur Identifizierung von Inhibitoren der PrP-Umwandlung bzw. Aggregation des PrP verwendet.

Dazu wurden Sequenzen von Bindungspartnern des PrP, die spezifisch mit PrP interagieren, untersucht. Die entsprechenden Peptide wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Schachner Camartin am Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg (ZMNH) identifiziert und für ein Screening bezüglich Umwandlungs- und/oder Aggregationsinhibitoren des PrP verwendet. Dabei wurde festgestellt, dass die beiden Peptide 13 und 14 als potentielle Inhibitoren fungieren, die die oxidativ-induzierte Umwandlung des PrP inhibieren.

Das Peptid 13 enthält einen Sequenzbereich des Dally-Proteins (*Division abnormally delayed*) aus *Drosophila melanogaster* und ist ein Heparansulfat (HS)-modifiziertes Protein der Fruchtfliege. Das reife Protein besitzt 626 Aminosäuren. Dieses Glypikan ist ein Heparinsulfatreiches Proteoglykan, welches mit der Zelloberfläche über eine kovalente Bindung an einem GPI-Anker verbunden ist (Nakato *et al.*, 1995). Obwohl es dieses Protein in Säugetieren nicht gibt und es daher kein direkter Bindungspartner des PrP ist, so konnte doch eine hohe Bindungsaffinität zum PrP und eine komplette Inhibition der PrP-Umwandlung und Aggregation nachgewiesen werden, wobei das PrP in seiner vorwiegend α -helikalen Form stabilisiert wird und es sich somit um einen Umwandlungsinhibitor handelt.

Die Sequenz des Peptids 14 stammt aus dem tPA (*tissue plasminogen activator*, Aminosäurereste 311-334) der Maus, welches dem humanen tPA sehr ähnlich ist. Humanes tPA (527-530 Aminosäuren) ist eine Serinprotease, deren Beteiligung an einen Prion-Plasminogen-Komplex postuliert wird (Ryou *et al.*, 2003). tPA wird vermehrt als Reaktion auf mentalen Stress produziert und spielt eine Rolle bei der Neurodegeneration und der neuronalen Plastizität (Jern *et al.*, 1989; Qian *et al.*, 1993; Tsirka *et al.*, 1995 und 1996; Baranes *et al.*, 1998; Yepes *et al.*, 2000). Es kann die Blut-Hirn-Schranke über Wechselwirkungen mit einem Zelloberflächenrezeptor durchqueren, was für die Therapieanwendung relevant ist (Yepes *et al.*, 2003). Eine Hochregulation von tPA-Konzentrationen parallel zu dem Auftreten von Prionen-Erkrankungen konnte ebenso nachgewiesen werden, wie die erhöhte Anfälligkeit von tPA- sowie Plasminogen-defizienten Mäusen für TSE (Xanthopoulos *et al.*, 2005). Dem tPA konnte eine hochaffine Wechselwirkung zum PrP ($K_D < 2,5$ nM) nachgewiesen werden, vergleichbar mit der im Rahmen dieser Arbeit für das Peptid 14C ($K_D < 65$ μ M) bestimmten Affinität (Ellis *et al.*, 2002). Außerdem wurde die oxidativ-induzierte Aggregation des PrP durch das Peptid 14C komplett inhibiert und die α -helikale PrP Form stabilisiert. Diese Inhibition konnte sowohl mit Hilfe des metallkatalysierten Aggregationstests als auch durch die Methode der UV-induzierten Umwandlung belegt werden.

Des Weiteren wurde das Peptid 12 als möglicher Beschleuniger der PrP-Umwandlung bzw. Aggregation identifiziert. Die Sequenz des Peptids 12 entspricht einem Teil der intrazellulären Domäne des Contactin-assoziierten Proteins (Caspr), welches einen nativen Bindungspartner des PrP darstellt (Peles *et al.*, 1997). Das sehr gut charakterisierte Adhäsionsmolekül Caspr ist ein negativer Regulator des Neuritenwachstums in ZNS-Neuronen und in cis-Interaktion mit dem GPI-verankerten neuronalen Zelladhäsionsmolekül F3/Contactin assoziiert, welches Caspr an die Zelloberfläche transportiert (Peles *et al.*, 1997; Faivre-Sarrailh *et al.*, 2000). Die Interaktion zwischen Caspr und GPI-verankertem PrP hemmt die Verbreitung von Caspr an der Zelloberfläche sowie das Neuritenwachstum in Neuronen, was durch die proteolytische Aktivität des extrazellulären Matrix-Glykoproteins Reelin ausgeglichen wird (Quattrocchi *et al.*, 2002; Devanathan *et al.*, 2010). Die Bindung der ausgewählten Peptidsequenz an PrP konnte durch die ermittelte hohe Bindungsaffinität nachgewiesen werden. Diese Peptidsequenz beinhaltet jedoch entweder nicht den gesamten bindenden Teil des Caspr-Proteins, wodurch kein inhibitorischer Effekt auf die Aggregation des PrP bzw. sogar ein leicht gegenteiliger Effekt auftritt. Möglicherweise wird aber auch die native Struktur des PrP durch die Bindung des Caspr-Proteins leicht destabilisiert, wodurch ein für die oxidative Umwandlung positiver kinetischer Effekt resultiert. Es wird nämlich davon ausgegangen, dass für die PrP-Aggregation eine kinetische Barriere existiert, die ähnlich charakteristisch ist wie die des Kristallwachstums. Dies könnte auch die Einheitlichkeit der Spezies-spezifischen PrP-Aggregate erklären (Come *et al.*, 1993). Die Überwindung dieser Barriere wird vermutlich durch Destabilisierung der Struktur begünstigt. Anhand der CD-Spektren wird deutlich, dass die Destabilisierung des PrP durch Bindung des Peptids 12 sogar zu einer nahezu kompletten Entfaltung des PrP führt, da ein CD-Signal mit einem *Random coil*-typischen Kurvenverlauf auftritt.

Da sich die inhibierende und nicht-inhibierende Wirkung aller getesteten Peptide auf die Umwandlung des verkürzten hPrP121-230 und des längeren hPrP90-230 im Wesentlichen kaum unterscheidet, wird die Bindungsdomäne der verschiedenen Peptide im Bereich des gefalteten C-Terminus des PrP vermutet. Ob die am PrP gebundenen Peptide als Monomere binden oder Dimere bilden, die für den inhibitorischen Effekt verantwortlich sind, konnte abschließend nicht geklärt werden. Im Gegensatz zu den monomeren Peptiden mit C-terminalem Cystein-Rest zeigten die mittels Wasserstoffperoxid dimerisierten Peptide einen ähnlichen Effekt auf das Aggregationsverhalten des PrP wie die entsprechenden monomeren Peptide ohne C-terminalem Cystein-Rest. Dies könnte ein Anzeichen dafür sein, dass die Peptide mit C-terminalem Cystein-Rest zunächst als Monomer wirken und erst nach der

Bindung an das PrP dimerisieren. Dadurch ist die Inhibition bei den Peptiden mit Cystein-Rest am C-Terminus effizienter als bei den zuvor dimerisierten und ohne C-terminalem Cystein-Rest. Eine weitere Möglichkeit wäre jedoch auch, dass die während des metallkatalysierten Aggregationstests gebildeten Dimere als solche an das PrP binden, was bei den zuvor dimerisierten Peptiden aufgrund der zusätzlichen Oxidationen der Methionin- und Histidin-Reste durch das hohe Redoxpotential des Wasserstoffperoxids scheinbar nicht so erfolgreich möglich ist. Die kovalenten Modifikationen der Seitenketten können die Wechselwirkung der Peptide signifikant verändern.

Die inhibitorische Wirkung der Peptide 13 und 14 stellt jedoch einen guten Ausgangspunkt für die Entwicklung eines neuen Therapieansatzes für Prionen-Krankheiten dar. Da die Peptide jedoch im Körper schnell proteolytisch abgebaut werden, müssen diese zunächst modifiziert werden. Durch die Verwendung von D-Aminosäuren, verschiedener Peptidrückgratmodifikationen oder Thioether-Brücken, deren Bindungen stabiler als Peptidbindungen und Disulfidbrücken sind, könnten stabile, wirksame Peptidanaloga hergestellt werden (Coy *et al.*, 1976; Pert *et al.*, 1976; Roemer *et al.*, 1977; Chorev *et al.*, 1979; Shimohigashi und Stammer, 1982; Tugyi *et al.*, 2005; Moll *et al.*, 2009). Des Weiteren müssen die Peptide bzw. Peptidanaloga soweit modifiziert werden, dass sie von einem der Transportproteine der BHS erkannt werden, um diese durchqueren zu können (Abbott und Romero, 1996). Auf diesem Wege kann es möglich sein in der Zukunft Medikamente zur Therapie gegen TSEs zu entwickeln.

4.6. Kristallisationsversuche

Von den für die Kristallisationsversuche vorgesehenen, gereinigten Proteinen formen mehr als 60 % keine Proteinkristalle, ungefähr 30 % bilden jedoch Proteinkristalle, davon liefern aber nur etwa die Hälfte auswertbare Strukturdaten (Dong *et al.*, 2007; Wernimont und Edwards, 2009). Das PrP zählt im Allgemeinen zu den Proteinen, die nicht kristallisieren. Die Erfolgsrate kann jedoch durch die Kristallisation einzelner Domänen oder durch die Verwendung von Interaktionspartnern erhöht werden. Aufgrund der gemessenen Bindungsaffinitäten der bindenden Peptide und der stabilisierenden Wirkung auf das PrP während des metallkatalysierten Aggregationstests wurde davon ausgegangen, dass diese Eigenschaften der Peptide genutzt werden könnten, um die Bildung eines Proteinkristalls zu begünstigen. Es ist bereits bekannt, dass der Übergang von PrP^C in PrP^{Sc} *in vitro* und *in vivo* durch Antikörper inhibiert und das PrP so stabilisiert werden kann. Dies wurde bereits für die Kristallisation des

hPrP¹¹⁹⁻²³¹ Fragments erfolgreich bewiesen (Antonyuk *et al.*, 2009). Die Anzahl der PDB-Strukturen zeigt jedoch, dass die Kristallisation des PrP schwierig ist, denn im Gegensatz zu den zahlreichen NMR-Strukturen von PrP aus mehreren Spezies, wie Mensch, Rind, Schaf, Elch, Pferd, Schwein, Hund, Katze, Kaninchen, Hamster und Maus, gibt es derzeit nur wenige Kristallstrukturen von PrP aus Mensch, Schaf, Kaninchen und Maus (Biverstahl *et al.*, 2004; Eghiaian *et al.*, 2004; Lysek *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2008; Antonyuk *et al.*, 2009; Ilc *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Khan *et al.*, 2010; Pérez *et al.*, 2010; Perez-Pineiro *et al.*, 2011; Sonati *et al.*, 2013). Daher wurde versucht, die gefaltete Domäne des hPrP (121-230), welche eine geringere Flexibilität aufweist, im Komplex mit den bindenden Peptiden zu kristallisieren und dadurch auch die Bindungsregion zu identifizieren. Bei Ko-Kristallisationsversuchen ist es wichtig Kenntnis über entsprechende kinetische Parameter wie die Bindungsaffinität zu haben (Hoepfner *et al.*, 2013). Dadurch kann der Ligandenüberschuss bestimmt werden, der nötig ist, um annähernd eine Rezeptorbelegung von 100 % zu erreichen und somit eine zu niedrige Ligandenkonzentration, die in eine inhomogene Proteinlösung resultieren kann, auszuschließen. Außerdem können die Kristallisationsbedingungen (insbesondere pH und Ionenstärke) die Ligandenlöslichkeit beeinflussen und dies hätte ebenfalls eine inhomogene Proteinlösung und im Falle des PrP sogar die PrP-Aggregation zur Folge, was wiederum die Kristallisation verhindern würde. Trotz der Kenntnisse über die Bindungsaffinität und des ermittelten Ligandenüberschusses bildete sich der gewünschte Proteinkristall nicht. Für zukünftige Kristallisationsexperimente könnte jedoch versucht werden, die Peptide mittels *Cross-Linking* zuvor an das PrP zu binden, um die Entstehung einer inhomogenen Proteinlösung während der Kristallisation auszuschließen.

Proteinkristallisation kann auch *in vivo* erfolgen. Dieses Phänomen tritt als nativer Prozess durch biologische Selbstassemblierung auf (Doye und Poon, 2006). Diese Methode der Proteinkristallisation wurde lange vernachlässigt, da eigentlich angenommen wurde, dass Proteinaggregation und Kristallisation schädlich für die Zelle ist. Doch einige vielversprechende Studien haben gezeigt, dass es nicht nur möglich ist *in-vivo*-Kristalle verschiedener Proteine zu erzeugen, sondern dass diese auch noch geeignete Beugungsbilder zur Strukturaufklärung liefern können (Hasegawa *et al.*, 2011; Koopmann *et al.*, 2012; Gati *et al.*, 2014). Für das getestet mPrP konnte zwar eine Produktion des PrP nachgewiesen werden, doch es wurden keine Kristalle *in vivo* gebildet. Dies könnte daran liegen, dass das Zytosol nicht das richtige Kompartiment für die Kristallisation ist. Denn die Lokalisation des Proteins in einem bestimmten, zellulären Kompartiment sowie die Regulierung der unterschiedlichen

zellulären Proteinabbau- und Transportwege haben einen großen Einfluss auf die *in-vivo*-Kristallisation (Schönherr, Klinge *et al.*, 2015). Für folgende *in-vivo*-Kristallisationsexperimente sollten Signalsequenzen an das Protein angefügt werden, um den Transport des Proteins in andere Kompartimente zu initiieren und dadurch die Kristallbildung zu begünstigen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Methode der Ko-Kristallisation des PrP-Peptid-Komplexes für die Generierung von PrP-Strukturdaten die erfolgversprechendste ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Interaktion zwischen dem Protein und den Peptiden hochaffin ist. Das bedeutet nicht zwangsläufig, dass der Komplex deswegen erfolgreich kristallisiert, aber es ist ein starkes Indiz dafür. Die *in-vivo*-Kristallisation sollte jedoch auch nicht vernachlässigt werden, da die Möglichkeit besteht, dass das PrP in einem anderen Kompartiment kristallisieren könnte.

4.7. Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich ist DLS-Messungen von Proteinen im Fluss durchzuführen, jedoch sollte eine Software entwickelt werden, die die Fließgeschwindigkeit bei der Bestimmung der hydrodynamischen Radien möglicherweise besser miteinbezieht. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass durch die oxidative Schädigung des PrP sowohl mittels metallkatalysiertem Aggregationstest als auch durch UV-Strahlung die Umwandlung von PrP^C in PrP^{Sc} induziert werden kann. Durch UV-Strahlung konnten spezifische Intermediate und β -Faltblatt-reiche Oligomere in großen Mengen erzeugt werden und neue Einblicke in den Mechanismus der Umwandlung des monomeren PrP in das spezifische, lösliche Oligomer erhalten werden. Dabei wurde deutlich, dass die Bildung des Oligomers nicht durch schrittweise Anlagerung von einzelnen Monomeren erfolgt, sondern zunächst ein diffuses Vorläufer-Oligomer entsteht, welches im weiteren Verlauf das spezifische, lösliche Oligomer bildet. Auch die Inhibition dieser Aggregation konnte nachgewiesen werden, dabei wurden zwei Peptide mit einem vielversprechenden inhibitorischen Effekt auf die Aggregation des PrP gefunden, die in der Lage sind die α -helikale Struktur des PrP zu stabilisieren. Diese Peptide bilden eine vielversprechende Grundlage für einen neuen therapeutischen Ansatz zur Behandlung von Prionen-Erkrankungen.

Die erhaltenen Resultate müssen zukünftig verifiziert und vertieft werden. Detailliertere Erkenntnisse über den molekularen Ablauf des UV-induzierten Umwandlungsmechanismus von der zellulären Form des PrP in seine pathogene Isoform könnten durch zukünftige zeitaufgelöste SAXS-Messungen der UV-induzierten Umwandlung des PrP erhalten werden.

Die Bindungsregion der inhibierenden Peptide sollte identifiziert werden, dies könnte durch NMR-Experimente oder SAXS-Messungen des Protein-Peptid-Komplexes in Lösung oder durch die Optimierung der Ko-Kristallisationsversuche des Komplexes erfolgen. Die daraus resultierenden Erkenntnisse über das Bindungsepitop können dann als Grundlage zur Entwicklung eines Medikaments für Prionen-Erkrankungen dienen.

Die inhibierenden Peptide könnten durch die Verwendung von D-Aminosäuren, verschiedenen Peptidrückgratmodifikationen, Thioether-Brücken und durch die Bildung chimärer Peptide soweit modifiziert werden, dass diese einerseits bei einer Verwendung als Medikament nicht vom Körper abgebaut und andererseits durch die BHS transportiert werden können. Diese modifizierten Peptide sollten wiederum hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität und Inhibition der PrP-Umwandlung untersucht werden. Zur Analyse des inhibitorischen Einflusses könnte neben dem metallkatalysierten Aggregationstest zukünftig auch das UV-System genutzt werden, da die vergleichenden Messungen der Transmission einen Befund über den Aggregationsgrad des PrP liefern. Dadurch wäre es möglich potentielle Agentien zur Behandlung von Prionen-Erkrankungen schnell *in vitro* zu analysieren.

5. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Geräte

Tabelle 14: Verwendeten Geräte, deren Gerätetyp und Hersteller

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Affinitätschromatographie-Säule	<i>HisTrap</i> FF	GE Healthcare
Autoklav	VX-120	Systec GmbH
Branson Sonifizierer	<i>Sonifier</i> 250/450	Emerson Electric Co
CD-Spektrometer	J-810 Spektropolarimeter	Jasco
	J-815 CD Spektrometer	Jasco
Diodenlaser	Millenia Pro Xs	Newport Corporation
DLS-Geräte	<i>Spectroscatter</i> 201	Molecular Dimensions
	<i>SpectroSIZE</i> 300	Xtal Concepts GmbH
	<i>SpectroProbe</i> 400	Xtal Concepts GmbH
	<i>SpectroLight</i> 600	Xtal Concepts GmbH
Durchflusskapillare	-	Hellma Analytics
ELISA-Reader	<i>GENios microplate reader</i>	Tecan
FPLC-System	GE-FPLC	Pharmacia Biotec
	<i>ÄKTApurifier System</i>	GE Healthcare
Frequenzverdoppler/ -verdreifacher	FHG	Newport Corporation
Geldokumentationssystem	UV-Systeme	Intas
Gelelektrophorese-Kammer (Agarose)	<i>PerfectBlue</i> Gelsystem Mini S	Peqlab Biotechnologie
Gelelektrophorese-Kammer (Polyacrylamid)	SE 260 <i>Mighty Small II</i>	Hoefer Inc.
Gelelektrophorese-Netzgerät (Agarose)	<i>Power PAC</i> 300	Bio-Rad
Gelelektrophorese-Netzgerät (Polyacrylamid)	EV231	Peqlab Biotechnologie
Größenausschluss- chromatographie-Säulen	<i>HiLoad</i> 16/60 <i>Superdex</i> 75 <i>prep grade</i>	GE Healthcare
	<i>Superose</i> 12 10/300 GL	GE Healthcare
Gelgießstand (Polyacrylamid)	<i>Multiple Gel Caster</i>	Hoefer Inc.
Ionenaustauschchromatographie- Säule	<i>Resource</i> S	GE Healthcare
Kristallisationsroboter	<i>Honeybee</i> 961/963	Genomic Solutions
Kristallplatten-Inkubator	RUMED® 3 001	Rubarth
Kühl-/Gefrierschrank	4 °C <i>Comfort</i>	Liebherr
	-20 °C <i>Premium No Frost</i>	Liebherr
	-80 °C SLT-10LS-90V	Harris

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Laser für UV-Bestrahlung	Tsunami ps 10 W <i>Pump</i>	Newport Corporation
Lyophylle	ALPHA 1-2 LD	Christ
Magnetrührer	VMS-A	VWR International GmbH
	MR 80	Heidolph
	MR 3 001	Heidolph
Massenspektrometer (Universität Hamburg)	6224 ESI-TOF	Agilent
	MALDI TOF-TOF UltrafleXtreme	Bruker Daltonics
Massenspektrometer (UKE)	LC/MSD <i>Trap XCT Ultra</i>	Agilent
Mikroskope und Photosysteme	<i>Crystal Score</i>	Diversified Scientific Inc.
	Mikroskop SZX12 mit Kamera Nikon DS-Fi2	Olympus Nikon
	Diavert	Leitz
	SONICC	Formulatrix
Nanodrop-Spektrometer	ND-1 000 UV-Vis	Peqlab Biotechnologie
	ND-2 000C Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie
	NanoDrop <i>Lite</i>	Thermo Scientific
PCR-Thermocycler	PCR- <i>Cycler Mastercycler personal</i>	Eppendorf
Peristaltikpumpe	EP-1 <i>Econo Pump</i>	Bio-Rad
pH-Meter	<i>Five Easy FE20</i>	Mettler-Toledo
	<i>Seven Easy pH</i>	Mettler-Toledo
Pipettierroboter	Lissy	Zinsser Analytic
Schrankinkubatoren	37 °C Inkubator Kelvitron®t	Heraeus Instruments
Schüttelinkubatoren	IRC-1-U	Adolf Kühner AG
	Innova®4 330	New Brunswick Scientific
	<i>Ampere Chart Multitron II</i>	Lufors AG
Schüttler mit Kreisbewegungen	GFL-3 017	GFL
Sensorchip	CM5	Biacore
<i>Speedvac</i>	Savant SC110	Thermo Electron
Spektrophotometer	GeneQuant 1 300	GE Healthcare
	CO 8 000 <i>Cell Density Meter</i>	WPA biowave
SPR-Spektroskopie	<i>Biacore T-1 000</i>	Biacore
Synchrotron	DORIS III (X33 SAXS Messplatz)	EMBL, HASYLAB/DESY, Hamburg, Deutschland
<i>Steril-Bench</i>	<i>Lamin Air HB 2 448</i>	Heraeus Instruments
Thermomixer	<i>Comfort</i>	Eppendorf

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
TXRF-Spektrometer	S2 PICOFOX	Bruker
Ultrazentrifuge	Optima TM L-100 XP Ultracentrifuge (UKE)	Beckman Coulter
Ultrazentrifuge	Centrikon T-1180	Kontron Instruments
Vortexer	Reagenzglasschüttler	VWR International
Waagen	TE3102S	Sartorius AG
	CP224S-0CE	Sartorius AG
Wasserbad	WB 14	Memmert
Western Blot-Kammer (Semi-Dry-Blotter)	V20-SDB	SCIE-PLAS
Zählkammer	Neubauer Improved 0,100 mm Tiefe, 0,0025 m ²	Assistant
Zentrifugen	5 804 R	Eppendorf
	5 810 R	Eppendorf
	5 415 R	Eppendorf
	<i>Minispin Plus</i>	Eppendorf
	Sorvall RC-5B	DuPont Instruments

5.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

Materialien	Hersteller
Amicon Ultra 4, Ultra 15, Ultra 0,5; MWCO 3 kDa, 10 kDa <i>Ultrafree-MC 30 000 NMWL</i>	Millipore
<i>Bond Elut Pipette SPE</i>	Agilent
Cellulose Acetat Filter	Sartorius Stedim Biotech
Dialyse Schlauchmembran Spectra/Por 3 MWCO 3500	Spectrum Laboratories Inc.
Einmalküvetten	Sarstedt
Falcon Tubes 15 mL, 50 mL	Sarstedt
Gel-Blotting-Paper GB005 <i>Whatman</i>	GE Healthcare
<i>HLA Plate Nunc</i>	Brand
Immobilon-P Transfer Membran, Filtertyp Polyvinylidenfluorid (PVDF), Porengröße 0,45 µm	Millipore
Kulturröhrchen 13 mL	Sarstedt
<i>Microplates 96-Well ELISA, PS, U-bottom, Microlon 200, med. binding</i>	Greiner bio-one
Ni-NTA-Agarose-Matrix	Qiagen
Parafilm	Bemis
Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1 000 µL	Sarstedt, Eppendorf
Reaktionsgefäße 0,2 mL, 0,5 mL, 1,5 mL, 2,0 mL	Sarstedt, Eppendorf
Serologische Pipetten 1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50 mL	Sarstedt
Spritzen 1 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL	Omnifix Braun

Materialien	Hersteller
Sterilfilter	VWR International
<i>Tissue Culture Plate 6/24-Well Flat Bottom with Lid</i>	Sarstedt
Zellkulturflaschen 75 cm ² , PE Vented Cap	Sarstedt
Zip Tip C ₁₈ Pipette Tips	Millipore

5.1.3. Chemikalien

Tabelle 16: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller

Hersteller	Chemikalien
Applichem Darmstadt, Germany	Ameisensäure, Coomassie <i>Brilliant Blue</i> G250, DTT, EDTA, Glucose, Glutaraldehydlösung, Gu-HCl, Harnstoff, Hefeextrakt, Imidazol, Iodacetamid, Di-Natriumhydrogenphosphat, Nickelsulfat, Paraffin, PEG 300, Tricin, Trypanblau
Carl Roth Karlsruhe, Germany	Acrylamid (Rotiphorese Gel 30, Gel 40), Agar-Agar, Agarose, Ammoniumsulfat, Ampicillin-Natriumsalz, APS, L-Arabinose, BisTris, BisTris-HCl, Chloramphenicol, Ethanol, Glycerin, Glycin, IPTG, Di-Kaliumhydrogenphosphat, Kanamycinsulfat, Magnesiumchlorid, Milchpulver, Natriumacetat, Natriumcitrat, Natriumthiosulfat, PMSF, reduziertes Glutathion, Silbernitrat, TEMED, Tris-HCl, Tris-Base, Trypton/Pepton, Wasserstoffperoxid 30 %
Merck Darmstadt, Germany	Acetonitril, Bromphenolblau-Natriumsalz, Calciumchlorid, Formaldehyd, Kaliumacetat, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumsulfat, Natriumazid, Natriumcarbonat, Natriumhydroxid, Salzsäure, TEMED
Riedel-de Haën, Honeywell Specialty Chemicals GmbH Seelze, Germany	Zink
Serva Heidelberg, Germany	Serva Blau
Sigma-Aldrich Seelze, Germany	<i>p</i> -Aminobenzamidin-Zelite, Ammoniumhydrogencarbonat, Calciumacetat, DMSO, Ethidiumbromid, Gentamicin-Lösung, Kupfer, Luminol, oxidiertes Glutathion, <i>para</i> -Hydroxycoumarinsäure, SDS, Tetracyclin, Tween-20
Thermo Fisher Scientific GmbH Bremen, Germany	BSA-Lösung, Coomassie <i>Protein Assay Reagent</i> , Glycin
VWR International GmbH Hannover, Germany	Essigsäure, Glycin, Isopropanol, MES, Natriumchlorid, X-Gal

5.1.4. Kommerzielle Kristallisationslösungen, Kits und Enzyme

Tabelle 17: Verwendete kommerzielle Kristallisationslösungen, Kits, Enzyme und deren Hersteller

Hersteller	Kristallisationslösungen
Qiagen	AmSO ₄ Suite, Classic Suite, ComPAS Suite, Cryos Suite
Molecular Dimensions	JCSG+ Suite, Morpheus, PACT premier
Hampton Research	PCT
	Kits
Peqlab Biotechnologie	<i>peqGold Plasmid Miniprep Kit I, peqGold Gel Extraction Kit I (classic-line & safety line)</i>
Thermo Scientific	<i>Thermo Scientific Gene Jet Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific Gene Jet Gel Extraction Kit</i>
	Enzyme
Promega	GoTaq DNA Polymerase
Fermentas	Taq DNA Polymerase, DpnI, BamHI, EcoRI, T4-DNA Ligase
Merck	BSA, Proteinase K
Sigma	Aldolase, Ferritin, Lysozym, RNase A, TEV-Protease, Thaumatin, Trypsin

5.1.5. DNA und Proteingrößenmarker

Tabelle 18: Verwendete DNA- sowie Proteingrößenmarker und deren Hersteller

Molekül	Größenmarker	Hersteller
DNA	Fast Ruler™ <i>Low Range DNA Ladder</i> , SM1103	Fermentas
	Fast Ruler™ <i>Middle Range DNA Ladder</i> , SM1113	
	Fast Ruler™ <i>High Range DNA Ladder</i> , SM1123	
Protein	<i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i> , SM0431	
	Page Ruler™ <i>Unstained Low Range Protein Ladder</i>	

5.1.6. Plasmide und Oligonukleotide

Die genomischen Sequenzen der verwendeten PrP-Konstrukte wurden während dieser Arbeit in den pRSET A-Vektor der Firma Invitrogen (Abbildung 48) kloniert. Die pRSET-Vektoren sind von pUC abgeleitete Expressionsvektoren, die für die *High-Level-Genexpression* und Reinigung von geklonten Genen in *E. coli* entwickelt wurden. Diese hohen Expressionslevel werden durch die Anwesenheit des T7-Promotors ermöglicht. Der Vektor codiert zudem ein N-terminales Fusionspeptid, welches ein ATG-Translationsstartcodon, einen Polyhistidin-Tag, eine Transkript-stabilisierende Sequenz des Gen 10 des Phage T7, das sogenannte Xpress™-Epitop, eine Enterokinase-Schnittstelle und eine *Multiple Cloning Site* (MCS) umfasst.

Der Polyhistidin-*Tag* des Fusionspeptids fungiert als Metallbindungsdomäne und ermöglicht eine einfache Reinigung von rekombinanten Proteinen durch immobilisierte Metallaffinitätschromatographie.

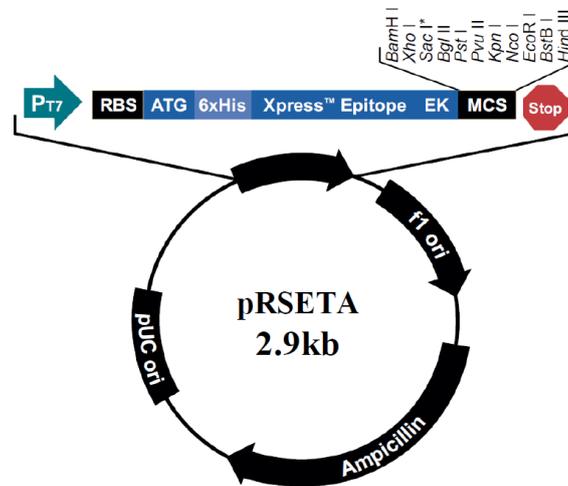


Abbildung 48: Vektorkarte von pRSET A

Des Weiteren wurden die entsprechenden Sequenzen der PrP-Konstrukte in die pFastBac-Vektoren pFastBac 1 und pFastBac HT B (Abbildung 49) kloniert. Die pFastBac-Vektoren sind eine Reihe von Vektoren, die dem Bac-to-Bac[®] Protokoll folgend für die Baculovirus-induzierte Expression der Zielgene in infizierten Insektenzellen verwendet werden können. Der pFastBac 1-Vektor verfügt über einen starken AcMNPV-Polyhedrin (PH)-Promotor für die *High-Level-Genexpression* sowie eine *Multiple Cloning Site* (MCS) (Anderson *et al.*, 1996). Der pFastBac HT B-Vektor verfügt zudem über einen N-terminalen 6 x His-*Tag* und eine TEV-Protease-Schnittstelle zur Entfernung des 6 x His-*Tags* nach der Proteinreinigung (Polayes *et al.*, 1996). Das Bac-to-Bac[®] Baculovirus-Expressionssystem wurde entwickelt, um schnell und effizient einen rekombinanten Baculovirus für die *High-Level-Expression* des Zielgens in Insektenzellen herzustellen (Ciccarone *et al.*, 1997). Durch die Ausnutzung der *Site-spezifischen Transposition* des Tn7 Transposons wird die Erzeugung von rekombinanter Bacmid-DNA vereinfacht und verbessert.

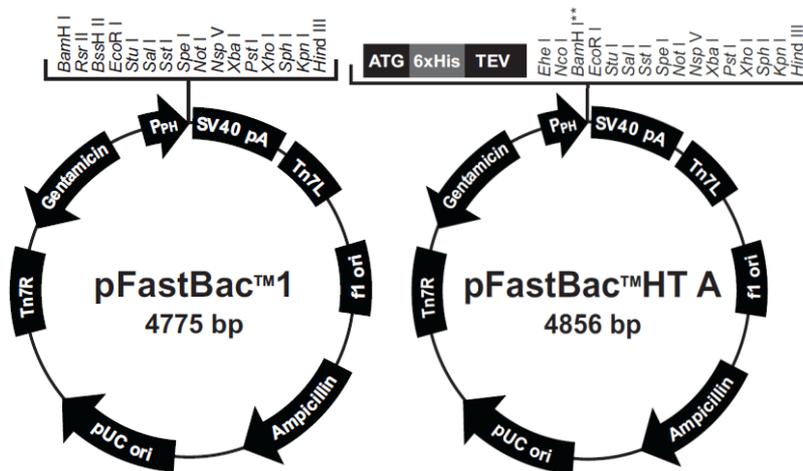


Abbildung 49: Vektorkarten von pFastBac 1 und pFastBac HT A. Der Vektor pFastBac HT B unterscheidet sich vom pFastBac HT A nur durch ein zusätzliches Nukleotid vor der *Bam*HI-Schnittstelle und einer damit verbundenen Leserahmenverschiebung.

In der Tabelle 19 sind die Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Vektoren zusammengefasst.

Tabelle 19: Verwendete Vektoren mit deren Größe und Eigenschaften sowie deren Hersteller

Vektoren	Größe [bp]	Eigenschaften	Hersteller
pRSET A	2 897	Amp ^R , MCS, Enterokinase Schnittstelle, N-terminaler (His)6-Tag , T7 Promotor, f1 und pUC Origin	Invitrogen
pFastBac 1	4 775	Amp ^R , Gen ^R , MCS, Polyhedrin Promotor, SV40 Polyadenylierungssignal, Mini Tn7 Elemente (Tn7L, Tn7R), f1 und pUC Origin	Invitrogen
pFastBac HT B	4 856	Amp ^R , Gen ^R , MCS, Polyhedrin Promotor, N-terminaler (His)6-Tag , TEV Schnittstelle SV40 Polyadenylierungssignal, Mini Tn7 Elemente (Tn7L, Tn7R), f1 und pUC Origin	Invitrogen

Für die Klonierungen der PrP-Gensequenzen wurden die in der folgenden Tabelle 20 dargestellten Oligonukleotide verwendet, welche von der Firma Metabion bezogen wurden.

Tabelle 20: Verwendete Oligonukleotide sowie deren Sequenz und Länge

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Länge [bp]
hPrP90_ <i>Bam</i> HI_TEV_fw	AAGGATCCGAAACTTGTATTTCCAGGGCG GTCAAGGAGGTGGCA	45
hPrP121_ <i>Bam</i> HI_TEV_fw	AAGGATCCGAAACTTGTATTTCCAGGGCG TGGTGGGGGGCCTT	44
hPrP_ <i>Eco</i> RI_re	AAGAATTCCTATTACGATCCTCTCTGGTAAT AGGCCT	37

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	Länge [bp]
hPrP_4_EcoRI_re	AAGAATTCCGATCCTCTCTGGTAATAGGCC	30
mPrP89_BamHI_TEV_fw	AAGGATCCGAAAACCTTGTATTTCCAGGGCG GCCAAGGAGGG	41
mPrP89_EcoRI_re	AAGAATTCCTATTAGCTGGATCTTCTCCCG	30
hPrP90_BamHI_Start_fw	AAGGATCCATGGGTCAAGGAGGTGGCACC	29
hPrP121_BamHI_Start_fw	AAGGATCCATGGTGGTGGGGGGCCTTG	27
mPrP89_BamHI_Start_fw	AAGGATCCATGGGCCAAGGAGGGGGTAC	28

Um die klonierten Konstrukte zu überprüfen, wurden spezielle Oligonukleotide der Firma Metabion zur Sequenzierung eingesetzt, welche in Tabelle 21 aufgeführt sind.

Tabelle 21: Auflistung der verwendeten Sequenzierungsprimer mit Produktnummer, Sequenz und Länge

Produktnummer	Name	Sequenz (5'-3')	Länge [bp]
mi-mos1026	pBakPAC-FP	TAAAATGATAACCATCTCGC	20
-	pFastBac RP	TTCAGGTTCAAGGGGAGGTG	20
-	pUC/M13 FP	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG	23
-	pUC/M13 RP	AGCGGATAACAATTCACACAGG	23
mi-mos1094	T7	TAATACGACTCACTATAGGG	20
mi-mos1075	pRSET-RP	ATGCTAGTTATTGCTCAGC	19

5.1.7. Bakterienstämme

Tabelle 22: Verwendete Bakterienstämme, deren jeweiliger Genotyp und Hersteller

Stamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 λ thi ⁻ 1 gyrA96 relA1	Invitrogen
<i>E. coli</i> XL10 Gold	Tet ^R Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^R]	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLys S	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pLys S (Cam ^R)	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21-AI	F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm araB::T7RNAP-tetA	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH10Bac	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ rpsL nupG/pMON14272/pMON7124	Invitrogen

5.1.8. Insektenzellen

S. frugiperda Sf9-Zellen sind klonale Isolate abgeleitet von der parentalen *Spodoptera frugiperda* Zelllinie IPLB-SF-21-AE. Die Zellen wurden zum Wachsen in serumfreiem, proteinfreiem, optimiertem Insektenzellkulturmedium adaptiert. In dem Medium erfolgt neben dem Wachstum und der Pflege der *Spodoptera frugiperda*-Zellen auch die Großproduktion von rekombinanten Proteinen unter Verwendung des Baculovirus-Expressionsvektor-Systems (BEVS). Die *Sf9*-Zellen wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Das für die Insektenzellen verwendete Medium Insect-Xpress (*Protein-Free Medium with L-Glutamine*) wurde von der Firma BioWhittaker Lonza bezogen.

5.1.9. Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 23: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen mit den jeweiligen Konzentrationen der Substanzen

Medium/Puffer/Lösung	Substanz	Konzentration
2 x YT-Medium	Trypton	16 g/L
	Natriumchlorid	5 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
Agar-Medium	Hefeextrakt	5 g/L
	Natriumchlorid	5 g/L
	Trypton	10 g/L
	Agar	15 g/L
Ammoniumhydrogencarbonat-Stocklösung (Dehydrierung Trypsinspaltung)	Ammoniumhydrogencarbonat	25 mM in 50 % Acetonitril
Ampicillin-Stocklösung	Ampicillin Natriumsalz	100 mg/mL
	Glycerin 100 %	50 % (v/v)
Anodenpuffer (pH 7,0) (nativer Anodenpuffer Serva)	BisTris-HCl	50 mM
APS-Lösung	APS	10 % (w/v)
Arabinose-Stocklösung	Arabinose	20 % (w/v)
Bindungspuffer (pH 8,0) (Reinigung/Rückfaltung)	Tris-Base	10 mM
	reduziertes Glutathion	10 mM
	Na ₂ HPO ₄	100 mM
Blockierungslösung (Western Blot)	BSA	3 % (w/v) in TBS-Puffer
Calciumchlorid-Stocklösung	Calciumchlorid	0,1 M
Calciumchlorid-Puffer für kompetente Zellen	Calciumchlorid	0,1 M
	Glycerin	10 % (v/v)
Chloramphenicol-Stocklösung	Chloramphenicol	30 mg/mL in Ethanol

Medium/Puffer/Lösung	Substanz	Konzentration
Coomassie-Entfärbelösung	Essigsäure	20 % (v/v)
Coomassie-Färbelösung	Isopropanol	25 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Coomassie Blau	0,1 % (w/v)
ECL <i>Solution</i> A (Western Blot)	Luminol	50 mg in 0,1 M Tris-Puffer pH 8,6
ECL <i>Solution</i> B (Western Blot)	<i>para</i> -Hydroxycoumarinsäure	11 mg in 10 mL DMSO
Elektrodenpuffer (10 x) (SDS-Gelelektrophorese)	Tris-Base	250 mM
	Glycin	1,9 M
	SDS	1 % (w/v)
Elutionspuffer hPrP121 (pH 8,0) (Reinigung/Rückfaltung)	Tris-Base	10 mM
	Na ₂ HPO ₄	100 mM
	Imidazol	250 mM
Elutionspuffer hPrP90 (pH 5,8) (Reinigung/Rückfaltung)	Tris-Base	10 mM
	Na ₂ HPO ₄	100 mM
	Imidazol	500 mM
Entwicklerlösung (Silberfärbung)	Formaldehyd (37 %)	0,04 % (v/v)
	Natriumcarbonat	2,5 % (w/v)
Ethidiumbromid-Färbelösung	Ethidiumbromid	0,4 µg/mL in 1 x TAE-Puffer
Färbelösung (Silberfärbung)	Formaldehyd (37 %)	0,05 % (v/v)
	Silbernitrat	0,1 % (w/v)
Fermentationsmedium (pH 7,5)	Hefeextrakt	5 g/L
	K ₂ HPO ₄	44 mM
	KH ₂ PO ₄	15 mM
	Na ₃ Citrate	4 mM
	(NH ₄) ₂ SO ₄	15 mM
	Trypton	10 g/L
Fixierlösung (Silbernitratfärbung)	Ethanol	30 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
Gentamicin-Stocklösung	Gentamicin	10 mg/mL
Glucose-Stocklösung	Glucose	50 % (w/v)
Glutathion-Stocklösung	reduziertes Glutathion	300 mM
	oxidiertes Glutathion	30 mM
Hefeextrakt-Stocklösung	Hefeextrakt	10 % (w/v)
IPTG-Stocklösung	IPTG	1 M
Kanamycin-Stocklösung	Kanamycin	10 mg/mL

Medium/Puffer/Lösung	Substanz	Konzentration
Kathodenpuffer (nativer Kathodenpuffer Serva) (<i>blue native</i> PAGE)	BisTris	15 mM
	Tricin	50 mM
	Serva Blau	0,002 % (w/v)
LB-Medium	Trypton	10 g/L
	Natriumchlorid	5 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
Magnesiumsulfat-Stocklösung	Magnesiumsulfat	1 M
Natriumacetat-Puffer (pH 5,0)	Natriumacetat	5 mM
Natriumacetat-Puffer (pH 4,5)	Natriumacetat	10 mM
Natriumacetat-Puffer (pH 5,0)	Natriumacetat	10 mM
Probenpuffer (2x) (<i>blue native</i> PAGE ohne SDS)	Bromphenolblau	0,5 % (w/v)
	Glycerin 100 %	25 % (v/v)
	Sammelgelpuffer (pH 6,8)	12,5 % (v/v)
	Coomassie Brilliant Blue	0,1 % (w/v)
Probenpuffer (2x) (SDS-Gelelektrophorese)	SDS	10 % (w/v)
	Bromphenolblau	0,5 % (w/v)
	Glycerin 100 %	25 % (v/v)
	Sammelgelpuffer (pH 6,8)	12,5 % (v/v)
	DTT	0,2 % (w/v)
Puffer 1 (pH 7,5) (Affinitätschromatographie)	Natriumphosphat	10 mM
Puffer 2a (pH 4,5) (Affinitätschromatographie)	Natriumacetat	10 mM
Puffer 2b (pH 5,0) (Affinitätschromatographie)	Natriumacetat	10 mM
	Imidazol	500 mM
Puffer (pH 5,0) (Größenausschlusschromat.)	Natriumacetat	100 mM
	Imidazol	50 mM
Puffer 1 (pH 5,0) (Ionenaustauschchromatographie)	Natriumacetat	5 mM
Puffer 2 (pH 5,0) (Ionenaustauschchromatographie)	Natriumacetat	1 M
Puffer A (pH 8,0) (Reinigung/Rückfaltung)	Tris-Base	10 mM
	reduziertes Glutathion	10 mM
	Na ₂ HPO ₄	100 mM
	Gu-HCl	4 M
Puffer B (pH 8,0) (Reinigung/Rückfaltung)	Tris-Base	10 mM
	Na ₂ HPO ₄	100 mM
Puffer C (pH 8,0) (Reinigung/Rückfaltung)	Tris-Base	10 mM
	Na ₂ HPO ₄	100 mM
	Imidazol	50 mM

Medium/Puffer/Lösung	Substanz	Konzentration
Puffer N3 (pH 4,8) Bacmid-Isolierung	Gu-HCl	4,2 M
	Kaliumacetat	0,9 M
Puffer P1 (pH 8,0) Bacmid-Isolierung	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
Puffer P2 Bacmid-Isolierung	Natriumhydroxid	200 mM
	SDS	1 %
Reduktionslösung (Silberfärbung)	Ethanol	30 % (v/v)
	Glutaraldehydlösung (25 %)	0,5 % (v/v)
	Natriumacetat	7 % (w/v)
	Natriumthiosulfat	0,2 % (w/v)
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	Tris-HCl	0,5 M
SDS-Lösung	SDS	10 % (w/v)
Stopplösung (pH 8,0) (Silberfärbung)	EDTA	50 mM
Tetracyclin-Stocklösung	Tetracyclin	10 mg/mL in 50 % (v/v) Ethanol
Transferpuffer (pH 8.3) (Western Blot)	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Isopropanol	20 % (v/v)
Trenngelpuffer (pH 8,8)	Tris-HCl	1,5 M
TBS-Puffer (pH 7,5)	Tris-HCl	20 mM
	Natriumchlorid	150 mM
TBS-T-Puffer (pH 7,5)	Tween-20	0,05 % (v/v) in TBS-Puffer
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE, 10 x) (pH 8,0)	Tris-Base	0,8 M
	EDTA	0,02 M
	Essigsäure	25 % (v/v)
Tris-Puffer (pH 8,0)	Tris-Base	10 mM
Trypton-Stocklösung	Trypton/Pepton	20 % (w/v)
X-Gal-Stocklösung	X-Gal	100 mg/mL

Der pH-Wert wurde bei den Puffern und Lösungen, die direkt in Kontakt mit dem Protein gekommen sind, mit Essigsäure und NaOH eingestellt. Bei allen anderen wurden Salzsäure und NaOH verwendet.

5.2. Methoden

5.2.1. Molekularbiologische Methoden

5.2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Technik, die zur Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragments eingesetzt wird, das zwischen zwei bekannten Nukleotidsequenzregionen liegt, auf deren Grundlage die benötigten Oligonukleotide entworfen werden.

Für diese Arbeit wurden zunächst die Gensequenzen der drei PrP-Konstrukte in den Expressionsvektor pRSET A und die Bac-to-Bac[®] Baculovirus-Expressionsvektoren pFastBac 1 sowie pFastBac HT B kloniert. Dazu wurde die Amplifikation der entsprechenden PrP-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Die PCR erfolgte in 0,2 mL Reaktionsgefäßen mit den entsprechenden Oligonukleotiden (Abschnitt 5.1.6. Plasmide und Oligonukleotide) und weiteren Komponenten (Tabelle 24) im 50 µL Reaktionsansatz.

Tabelle 24: Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze mit *Taq* Polymerase der Firma Fermentas

Komponente	Konzentration der Stocklösung	Volumen
Template DNA	10 pg–1 µg	1 µL
10 x <i>Taq</i> Puffer + KCl		5 µL
dNTP Mix	2 mM	5 µL
Primer (<i>forward</i>)	200 pmol/µL	1 µL
Primer (<i>reverse</i>)	200 pmol/µL	1 µL
MgCl ₂	25 mM	5 µL
<i>Taq</i> Polymerase	5 U/µL	1,25 µL
ddH ₂ O		ad 50 µL

Die optimierten Parameter der einzelnen Schritte und Zyklen der Polymerase-Kettenreaktion im Thermocycler sind in der folgenden Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25: Optimale Parameter der PCR im Thermocycler

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	96 °C	2 min	1
Denaturierung	96 °C	30 s	30
Anlagerung	54 °C	1 min	
Elongation	70 °C	1 min	
Finale Elongation	70 °C	5 min	1

5.2.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die einfachste und effektivste Methode zur Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe. Diese wurde mit Agarose-Gelen in horizontalen Gelsystemen zur Überprüfung der einzelnen Schritte bei der Klonierung durchgeführt. Die entsprechende Menge Agarose (0,8; 1 bzw. 2 % (w/v)) wurde in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Sobald die Agarose-Lösung auf etwa 60 °C abgekühlt war, wurde die gelöste Agarose mit 0,02 µL Ethidiumbromid-Stocklösung (10 mg/mL) pro mL versetzt und in eine horizontale Gelkammer mit einem entsprechenden Probenkamm gegossen.

Das auspolymerisierte Gel wurde mit Laufpuffer bedeckt und die Geltaschen mit 5 µL DNA-Proben, die zuvor mit 1 µL 6 x *Loading Dye* versetzt wurden, beladen. Die Elektrophorese zur Größenauftrennung der DNA-Fragmente wurde bei 80-90 V (konstant) für 60 Minuten gestartet. Anschließend wurden die Gele mit den fluoreszierenden DNA-Banden unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

5.2.1.3. Reinigung von PCR-Fragmenten

Um die PCR-Fragmente für die weiteren Klonierungsschritte verwenden zu können, mussten diese vom DNA-Template und den Oligonukleotiden getrennt werden. Dazu wurde zunächst das Restriktionsenzym *DpnI* zum PCR-Ansatz gegeben, um die methylierte Template-DNA abzubauen. Die PCR-Fragmente werden dabei nicht beeinträchtigt, da diese nicht methyliert sind. Für die Reaktion wurden 45 µL PCR-Ansatz mit 4 µL 10 x Tango-Puffer und 1 µL *DpnI* (10 U/µL) versetzt und zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurden die PCR-Fragmente von den Oligonukleotiden und der zerkleinerten Template-DNA mittels *peqGold Gel Extraction Kit* bzw. *Thermo Scientific Gene Jet Gel Extraction Kit* nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers isoliert. Die gereinigten PCR-Fragmente wurden mit 30 µL ddH₂O eluiert.

5.2.1.4. Restriktionsspaltung

Restriktionsendonukleasen gehören zu einer großen Gruppe von Enzymen, die DNA an spezifischen Sequenzen spalten, indem sie spezifische Palindrom-Sequenzen in Doppelstrang-DNA erkennen. Dies wird beim Klonieren ausgenutzt, denn dadurch können Gene in der gewünschten Orientierung zum Beispiel in Expressionsvektoren eingebaut werden.

Sowohl das jeweilige PCR-Fragment als auch die Vektoren wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Damit das Gen in der gewünschten Orientierung in den Vektor ligiert wird, erfolgte eine Behandlung der Fragmente und Vektoren mit zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen. Für die Restriktion wurden die Enzyme *EcoRI* und *BamHI* verwendet. Die Ansätze wurden gemäß den Angaben des Herstellers der Enzyme mit den entsprechenden Puffern versetzt. Das Volumen für die Restriktionsreaktion der PCR-Fragmente betrug 40 μL und das der Vektoren 20 μL . Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde die geschnittene DNA mittels *peqGold Gel Extraction Kit* bzw. *Thermo Scientific Gene Jet Gel Extraction Kit* nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers isoliert.

5.2.1.5. Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die Absorption von Nukleinsäuren kann bei 260 nm photometrisch bestimmt werden. Die Konzentration der geschnittenen und gereinigten DNA wurde mit einem Nanodrop-Spektrometer gemessen. Dazu wurde 1 μL der DNA-Lösung analysiert. Doppelsträngige DNA hat eine Konzentration von 50 ng/ μL bei einer Absorption A_{260} von 1,0 (Maniatis *et al.*, 1982). Außerdem kann durch photometrische Messung der Reinheitsgrad der DNA-Lösung bestimmt werden, indem der Quotient aus A_{260}/A_{280} berechnet wird. Eine reine doppelsträngige DNA-Lösung hat einen Quotienten von 1,8 bis 2,0, ist dieser kleiner, dann weist die Probe Proteinverunreinigungen auf.

5.2.1.6. Ligation

Durch Ligasen können zwei DNA-Moleküle unter ATP-Verbrauch miteinander verknüpft werden. Die Ligation der geschnittenen und gereinigten PCR-Fragmente mit den Vektoren wurde zwei Stunden bei 22 °C bzw. 37 °C oder über Nacht bei 14 °C durchgeführt. Das Volumen der Ligationsansätze betrug 20 μL und enthielt 50 bis 100 ng Vektor sowie die doppelte bis dreifache molare Konzentration des Inserts, 10 x Ligase-Puffer, bidestilliertes Nuklease-freies Wasser und 1 U T4-DNA-Ligase.

5.2.1.7. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Damit die Plasmid-DNA von Bakterienzellen besser aufgenommen werden kann, müssen die Zellen eine gewisse Kompetenz aufweisen. Zur Herstellung von chemisch kompetenten Zellen wurden 5 mL flüssiges LB-Medium gegebenenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt, mit dem gewünschten Bakterienstamm aus einem Glycerinstock angeimpft und über

Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Am folgenden Tag wurde 1 mL der Übernachtskultur in 100 mL flüssiges LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und erneut bei 37 °C sowie maximal 250 rpm im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 Minuten auf Eis gekühlt und dann durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 800 x g pelletiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 10 mL kaltem Calciumchlorid-Puffer (0,1 M CaCl₂, 10 % Glycerin) vorsichtig resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten 15-minütigen Zentrifugation wurde das Zellpellet in 2 mL kaltem Calciumchlorid-Puffer vorsichtig suspendiert, in 1,5 mL Reaktionsgefäßen zu je 50 µL bzw. 100 µL aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verwendung der chemisch kompetenten Zellen erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

5.2.1.8. Transformation von *E. coli*-Zellen

Die Übertragung von nicht-viraler freier DNA in kompetente Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet. Die für die Transformation benötigten kompetenten Zellen wurden langsam auf Eis aufgetaut. Zu 50 µL chemisch kompetenter Zellen wurden 5 µL des Ligationsansatzes bzw. 1-2 µL des isolierten Plasmids (1-50 ng) in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben. Zum Einschleusen der Plasmid-DNA in die Bakterienzelle wurde der Reaktionsansatz 10 Minuten auf Eis, dann 20 Sekunden bei 42 °C und nochmal 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 1 mL flüssigem LB-Medium wurden die Zellen mit dem Plasmid für 30 bis 60 Minuten bei 37 °C und 300 rpm im Thermomixer geschüttelt.

Der Transformationsansatz wurde entweder auf Selektivagarplatten ausplattiert (50 bis 200 µL je Platte) oder es wurden 300 µL bis 1 mL zu 5 mL flüssigem LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum gegeben und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank bzw. Schüttelinkubator inkubiert.

Da die verschiedenen Bakterienstämme die Plasmid-DNA unterschiedlich gut und effizient aufnehmen können, war es teilweise nötig, die Inkubationszeiten während der Transformation entsprechend anzupassen.

5.2.1.9. Glycerin-Stammkulturen

Für die Herstellung einer Glycerin-Stammkultur wurden die Bakterienstämme in 3 mL flüssigem LB-Medium mit dem korrespondierenden Antibiotikum über Nacht bei 37 °C

inkubiert. 800 µL der üN-Kultur wurden in einem 2 mL Reaktionsgefäß mit 600 µL Glycerin durch invertieren gemischt und bei -80 °C gelagert.

5.2.1.10. Plasmidpräparation

Die aus der Transformation resultierenden Klone wurden einzeln von der Selektivagarplatte gepickt und in jeweils 5 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt. Wenn der Transformationsansatz über Nacht in flüssigem LB-Medium kultiviert wurde, konnte dieser direkt verwendet werden. Die üN-Kultur wurde entsprechend der Angaben der Hersteller der entsprechenden Plasmidpräparationskits pelletiert und die Minipräparation zur Extraktion der Plasmid-DNA durchgeführt (*peqGold Plasmid Miniprep Kit I, Thermo Scientific Gene Jet Plasmid Miniprep Kit*). Die Plasmid-DNA wurde mit 50 bis 75 µL ddH₂O eluiert und die Konzentration am Nanodrop-Spektrometer bestimmt. Die Plasmid-DNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

5.2.1.11. DNA-Sequenzierung

Nach der abgeschlossenen Klonierung wurde die extrahierte Plasmid-DNA auf die Richtigkeit der Nukleotidsequenz überprüft. Um sicher zu sein, dass das Plasmid das entsprechende Insert enthält, wurde zunächst ein Testverdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Eco*RI, dem entsprechenden Puffer, 0,5-1,0 µg/µL Plasmid-DNA und bidestilliertem Wasser in einem Gesamtvolumen von 10 µL für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Die positiv getestete Plasmid-DNA wurde zur weiteren Analyse von der Firma GATC Biotech mit der *LIGHTrun* Sequenzierungsmethode untersucht. Dazu wurden 5 µL Plasmid-DNA (80-120 ng) mit 5 µL des jeweiligen Sequenzierungsoligonukleotides versetzt und an die Firma versendet.

5.2.1.12. Bac-to-Bac[®] System

Um zu testen, ob PrP in Insektenzellen ebenfalls löslich hergestellt oder wohlmöglich spontan *in-vivo*-Kristalle gebildet werden, wurden die Gensequenzen der PrP-Konstrukte in die pFastBac-Vektoren kloniert.

Für das Bac-to-Bac[®] Expressionssystem wurden zunächst die pFastBac-Konstrukte mit dem gewünschten Gen durch Transformation in DH10Bac *E.coli*-Zellen eingeschleust. Die DH10Bac-Zellen verfügen über einen Baculovirus-*Shuttlevektor* (Bacmid) und ein Helferplasmid, das die Erzeugung eines rekombinanten Bacmids nach Transposition des

pFastBac-Expressionskonstruktes erlaubt. 100 μL der chemisch kompetenten DH10Bac-Zellen wurden mit 1,0-1,5 μL Plasmid-DNA (60-170 ng) versetzt und dann 30 Minuten auf Eis, 45 Sekunden bei 42 °C und 2 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 900 μL flüssigem LB-Medium in ein 15 mL Kulturröhrchen überführt und vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zellsuspension wurde 1:10 sowie 1:100 mit LB-Medium verdünnt, davon wurden je 100 μL auf Selektivagarplatten (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kanamycin, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Gentamicin, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tetracyclin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 5-Brom-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (Bluo-Gal), 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ IPTG) ausplattiert und 48 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Von der Selektivagarplatte wurden die weißen Klone gepickt, in je 5 mL flüssigem LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (25 μL Kanamycin 10 mg/mL, 5 μL Gentamicin 7 mg/mL, 5 μL Tetracyclin 10 mg/mL) überführt und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert.

Die üN -Kultur wurde für die Bacmid-Isolierung 20 Minuten bei 2 800 x g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 250 μL Puffer P1 resuspendiert, in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt und nach Zugabe von 250 μL Puffer P2 invertiert. Dann wurden 350 μL Puffer N3 hinzugegeben und der Reaktionsansatz wurde erneut invertiert. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 14 000 x g wurde der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß dekantiert, mit 700 μL Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20 oder -80 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde nach einer erneuten 10-minütigen Zentrifugation bei 14 000 x g der Überstand verworfen, die pelletierte DNA mit 700 μL eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen und wiederum 10 Minuten bei 14 000 x g zentrifugiert. Das verbliebene Pellet wurde bei 55 °C etwa 3-4 Stunden im Thermomixer getrocknet und in 30 μL sterilem bidestilliertem Nuklease-freiem Wasser über Nacht bei 4 °C resuspendiert. Die Bacmid-DNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop-Spektrometer bestimmt und bei 4 °C gelagert.

Um den Einbau des gewünschten Gens in das Bacmid zu überprüfen wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Die PCR-Reaktion erfolgte in 0,2 mL Reaktionsgefäßen mit den entsprechenden Oligonukleotiden (Abschnitt 5.1.6.) und weiteren Komponenten (Tabelle 26) im 25 μL Reaktionsansatz.

Tabelle 26: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Kontroll-PCR der pFastBac-Konstrukte

Komponente	Konzentration der Stocklösung	Volumen
Rekombinante Bacmid DNA	1-2 μg	4 μL
10 x <i>Taq</i> Puffer + KCl		2,5 μL
dNTP Mix	2 mM	2,5 μL

Komponente	Konzentration der Stocklösung	Volumen
Primer (<i>forward</i>)	200 pmol/ μ L	0,5 μ L
Primer (<i>reverse</i>)	200 pmol/ μ L	0,5 μ L
MgCl ₂	25 mM	2,5 μ L
<i>Taq</i> Polymerase	5 U/ μ L	0,5 μ L
ddH ₂ O		ad 25 μ L

In der folgenden Tabelle 27 sind die optimierten Parameter der einzelnen Schritte und Zyklen der Polymerase-Kettenreaktion im Thermocycler aufgeführt.

Tabelle 27: Optimale Parameter für die Kontroll-PCR der pFastBac-Konstrukte im Thermocycler

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
Initiale Denaturierung	93 °C	3 min	1
Denaturierung	94 °C	45 s	30
Anlagerung	55 °C	45 s	
Elongation	72 °C	5 min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	1

10 μ L des PCR-Ansatzes wurden mit 2 μ L 6 x *Loading Dye* versetzt und zur Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anhand der Größe des erhaltenen PCR-Fragments wurde analysiert, ob die Transposition stattgefunden hat (Tabelle 28).

Tabelle 28: Größe der PCR-Fragmente nach der Kontroll-PCR der pFastBac-Konstrukte

Probe	Größe des PCR-Fragments
Bacmid allein	~300 bp
Bacmid transponiert mit pFastBac 1	~2 300 bp + Größe des Inserts
Bacmid transponiert mit pFastBac HT B	~2 430 bp + Größe des Inserts

5.2.1.13. Rekombinante Genexpression in *Sf9*-Zellen

Für die rekombinante Genexpression in *Sf9*-Zellen wurden die Zellen nach der Verdünnung zunächst mit Trypanblau (1:1) versetzt, in eine Zählkammer gegeben und die Anzahl der Zellen ermittelt. Für die Transfektion wurde 1 μ g der Bacmid-DNA mit 100 μ L Insektenzellmedium versetzt. Es wurden jeweils 2, 4, 6 und 8 μ L ESCORT IV Reagenz zu weiteren 100 μ L Insektenzellmedium gegeben. Anschließend wurden beide Ansätze vereinigt, gemischt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Das Gemisch wurde tropfenweise in 2 mL Zellsuspension mit $1,6 \cdot 10^6$ Zellen/*Well* in eine 6-*Well*-Zellkulturplatte überführt. Nach Inkubation bei 27 °C für fünf Stunden wurde das Medium durch frisches Medium mit Penicillin und Streptomycin

ersetzt. Nach weiteren vier Tagen bei 27 °C wurde das Medium, welches das P1-Virus enthielt, abgenommen und bei 4 °C gelagert. Für den P2-Stock wurden jeweils 1,5 mL Zellsuspension mit 500 µL P1-Stock versetzt und für 48 Stunden bei 27 °C inkubiert. Das P2-Virus enthaltene Medium wurde abgenommen, damit der P3-Stock entsprechend dem P2-Stock hergestellt und anschließend bei 4 °C gelagert.

Zur rekombinanten Genexpression wurden in einer 24-Well-Platte $0,4 \cdot 10^6$ Zellen/Well mit unterschiedlichen Verdünnungen des P2-Stocks (1:500, 1:100, 1:10) versetzt. Die Inkubation erfolgte für 72 bzw. 96 Stunden bei 27 °C. Zur Überprüfung der erfolgreichen Genexpression wurden die Zellen manuell mit dem Medium abgelöst und für 5 Minuten bei $16\ 600 \times g$ in einem Reaktionsgefäß pelletiert. Das Pellet wurde in 50 µL Probenpuffer (2 x) aufgenommen, 15 Minuten im Ultraschallbad behandelt und für 5 Minuten bei 96 °C gekocht. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE gefolgt von einem Western Blot analysiert, wie im Abschnitt 5.2.2.10. beschrieben. Der einzige Unterschied war, dass die geblottete Membran zwischen 25 und 35 kDa durchgeschnitten wurde und der Teil der Membran mit Proteinen größer als 35 kDa mit dem primären Antikörper *mouse* anti-Aktin (1:5 000 in 3 % (w/v) BSA in TBS-T-Puffer) anstelle des anti-His-Antikörpers behandelt wurde.

5.2.1.14. Rekombinante Genexpression in *E. coli*-Zellen

Die rekombinante Genexpression erfolgte zunächst nach der bereits für verschiedene PrP-Konstrukte etablierten Methode in dem Bakterienstamm *E. coli* BL21(DE3)pLys S (Georgieva *et al.*, 2004). Der pRSET A-Vektor mit der entsprechenden Gensequenz wurde in die kompetenten Zellen transformiert und diese wurden über Nacht auf einer LB-Agarplatte mit 100 µg/mL Ampicillin und 30 µg/mL Chloramphenicol bei 37 °C inkubiert. Mit einer einzelnen Zellkolonie von der Agarplatte wurden dann 3 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin sowie 30 µg/mL Chloramphenicol angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurden 200 mL LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin sowie 30 µg/mL Chloramphenicol mit 1 mL der üN-Kultur versetzt und bei 37 °C bis zu einer Zelldichte OD_{600} von 0,9 bis 1,0 im Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellsuspension wurde über Nacht bei 4 °C gelagert.

Für die präparative Genexpression wurden in einem 5 L Kolben 900 mL Fermentationsmedium mit 2,7 mL 1 M Magnesiumsulfat-Lösung, 2,7 mL 0,1 M Calciumchlorid-Lösung, 2,7 mL 50 % (w/v) Glucose-Lösung, 30 µg/mL Chloramphenicol und 100 µg/mL Ampicillin sowie 100 mL einer Vorkultur versetzt. Bei einer Zelldichte OD_{600} von 1,6 bis 1,8 wurde die Genexpression mit 0,4 mM IPTG induziert. Außerdem wurden 20 mL Hefeextraktlösung

10 % (w/v), Trypton-/Pepton-Lösung 20 % (w/v) und Glucose-Lösung 50 % (w/v) hinzugefügt, dies wurde nach zwei Stunden wiederholt. Nach weiteren zwei Stunden wurden die Zellen in 250 mL Zentrifugenbechern für 15 Minuten bei 2 800 x g pelletiert. Die Zellpellets wurden bei -20 °C gelagert und ein Expressionsprofil erstellt.

Da die Zellen während der Expression jedoch immer abstarben, wurde die rekombinante Genexpression im Rahmen dieser Arbeit optimiert, indem verschiedene *E. coli*-Stämme sowie Nährmedien mit unterschiedlichen Zusammensetzungen und Zusätzen verwendet wurden, darauf wird im Ergebnisteil genauer eingegangen. Der effizienteste Stamm (BL21-AI) wurde dann zur weiteren Optimierung verwendet.

In die kompetenten *E. coli* BL21-AI-Zellen wurde der pRSET A-Vektor mit der zu exprimierenden Gensequenz eingeschleust. Die Transformanten wurden auf einer LB-Agarplatte mit 100 µg/mL Ampicillin über Nacht inkubiert.

Für die 200 mL Vorkultur wurde immer eine frisch transformierte *E. coli*-Kolonie zum LB-Medium mit den korrespondierenden Antibiotika gegeben. Die Kultivierung erfolgte bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ 0,8 bis 1,0 bei 37 °C und 220 rpm im Schüttelinkubator, anschließend wurde die Vorkultur über Nacht bei 4 °C gelagert.

Aus dieser Vorkultur wurden für die Expression 40-50 mL in einen 5 L Kolben mit 950 mL 2 x YT-Medium überführt, welches mit 100 µg/mL Ampicillin und 2 mL 50 %iger (w/v) Glucose-Lösung versetzt wurde. Die Zelldichte lag zu Beginn der Kultivierung zwischen OD₆₀₀ 0,1 bis 0,2. Der Ansatz wurde bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ 1,6 bis 1,8 kultiviert, die Genexpression mit 10 mL einer 20 %igen (w/v) Arabinose-Lösung induziert und die Zellen wurden nach vier Stunden geerntet. Die optische Dichte der Zellsuspension wurde erneut bestimmt und die Zellen in 250 mL Zentrifugenbechern für 15 Minuten bei 4 °C und 2 800 x g pelletiert. Die Zellpellets, die das rekombinante Zielprotein in Form von unlöslichen *inclusion bodies* enthielten, wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Um den Erfolg der Expression zu überprüfen, wurde ein Expressionsprofil mittels SDS-PAGE erstellt. Dazu wurden während der Expression 1 mL Proben der Zellsuspension entnommen, eine direkt vor der Induktion und eine weitere bei der Zellernte. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 18 500 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 50 µL Probenpuffer (2 x) aufgenommen. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten bei 96 °C erhitzt und davon 10 µL auf das SDS-Polyacrylamid-Gel zur Analyse aufgetragen.

5.2.1.15. Bestimmung der optischen Dichte (OD₆₀₀)

Durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm kann die Zelldichte von Kulturen bestimmt werden. Zur Messung der Absorption wurde das Spektrophotometer GeneQuant 1 300 verwendet, wobei die Absorption des Lichtes von der Beschaffenheit der absorbierenden Partikel und der Messanordnung des Messgerätes abhängig ist. Dadurch kann der Verlauf des Bakterienwachstums in einer Flüssigkultur untersucht werden. Dazu wurde 1 mL Zellsuspension in eine Einmalküvette gegeben und bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen.

5.2.2. Proteinbiochemische Methoden

5.2.2.1. Zellaufschluss und Protein-Rückfaltung

Die bei -20 °C gelagerten *E. coli*-Zellpellets mit dem Zielprotein in Form von *inclusion bodies* wurden in 25 mL Bindungspuffer resuspendiert und der Zellaufschluss erfolgte, indem die Proben für 10 Minuten (*duty cycle 30, output control 3*) auf Eis sonifiziert wurden. Dann wurde die homogenisierte Probe 30 Minuten bei 4 °C und 18 514 x g zentrifugiert, die *inclusion bodies* pelletiert und der Überstand mit den gelösten *E.coli*-Proteinen verworfen. Das Pellet wurde in 20 mL Bindungspuffer/Puffer A (Verhältnis 4:1) aufgenommen und wiederum 10 Minuten auf Eis sonifiziert. Sofern die Probe komplett homogen war, wurde sie für 15 Minuten bei 4 °C und 18 514 x g zentrifugiert, um die *inclusion bodies* erneut zu pelletieren. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 mL Puffer A suspendiert. Nachdem die Probe homogenisiert wurde, indem sie ein letztes Mal für 10 Minuten sonifiziert wurde, musste noch einmal für 15 Minuten bei 18 514 x g zentrifugiert werden, um die Zellbestandteile zu entfernen. Der Überstand enthielt nun das lösliche, ungefaltete PrP. Da das Protein während dieser Prozedur noch nicht korrekt gefaltet war, konnte das Protokoll zu jeder Zeit unterbrochen und die Proben bei -20 °C gelagert werden.

Zur Reinigung des Zielproteins wurde die Proteinlösung zu einer Ni-NTA-Agarose-Matrix in einen Glassäulenkörper der Firma Bio-Rad gegeben, welche zuvor mit 2 Säulenvolumen (SV) Puffer A äquilibriert wurde, und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit Kreisbewegung inkubiert wurde. Anschließend wurde der Durchlauf (D) aufgefangen und die Ni-NTA-Agarose-Matrix mit 5 SV Puffer A (A) gewaschen, um ungebundenes Protein und Nukleinsäuren zu entfernen. Etwa ein halbes SV Puffer A wurde dabei auf der Matrix belassen. Die Rückfaltung des PrP erfolgte mit Hilfe eines automatisierten FPLC-Systems. Dabei wurde der Puffer A über einen 400 mL Gradienten mit einer Flussrate von 0,4 mL/min gegen den

Puffer B ausgetauscht, wodurch die Gu-HCl Konzentration linear von 4 M auf 0 M herabgesetzt wurde. Dann wurde die Ni-NTA-Agarose-Matrix mit 1 SV Puffer B (B) gespült und 1½ SV Puffer C (C) gewaschen, um bindende Verunreinigungen zu entfernen. Eluiert wurde das nun korrekt gefaltete PrP in zwei Schritten. Die erste Elutionsfraktion (E1) hatte ein Volumen von etwa 3½ SV und die zweite Elutionsfraktion (E2) von etwa 2 SV.

Proben der gesammelten Reinigungsfraktionen (D, A, B, C, E1, E2) wurden zur Analyse auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Dazu wurden 20 µL der Proben mit 20 µL Probenpuffer (2 x) versetzt, 5 Minuten bei 96 °C erhitzt und davon 20 µL im Gel aufgetrennt.

5.2.2.2. Regeneration der Ni-NTA-Agarose-Matrix

Die Ni-NTA-Agarose-Matrix wurde nach jeder Verwendung den Herstellerangaben von Qiagen folgend regeneriert und anschließend in 20 % (v/v) Ethanol gelagert.

5.2.2.3. Abspaltung des 6 x His-Überhangs mittels TEV-Protease

Die Fraktionen der Reinigung (siehe 5.2.2.1.), die das lösliche PrP enthalten, wurden zunächst für die anschließende Abspaltung des His-*Tags* vereinigt. Das Protokoll für die Restriktion mit der TEV-Protease wurde während dieser Arbeit optimiert und wird daher im Ergebnisteil detailliert beschrieben. Der grundlegende Ablauf ist im folgenden Abschnitt dargestellt.

Das lösliche, nativ gefaltete PrP wurde über Nacht gegen Tris-Puffer (10 mM, pH 8,0) dialysiert, um die Imidazol-Konzentration zu verringern. Dabei bildete sich eine geringe Menge Proteinpräzipitat, welches durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit einem Nanodrop-Spektrometer bestimmt.

Zur Proteinlösung wurde anschließend eine Glutathion-Stocklösung (300 mM Glutathion red., 30 mM Glutathion oxid.) im Verhältnis 1:100 (v/v) und TEV-Protease im Verhältnis 1:100 (w/w) gegeben. Der Ansatz wurde 3-4 Stunden oder über Nacht bei 25 °C im Wasserbad bzw. bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Visualisierung des Erfolges der Abspaltung des N-terminalen His-*Tags* wurde der Ansatz mittels SDS-PAGE elektrophoretisch analysiert, indem 20 µL Probe mit 20 µL Probenpuffer (2 x) für 5 Minuten bei 96 °C erhitzt wurden, davon wurden dann 20 µL auf das Gel aufgetragen.

Zur Trennung des nativen PrP von der TEV-Protease, dem abgespaltenen His-Tag und ungeschnittenem Protein wurden zwei verschiedene Methoden in Abhängigkeit vom Proteinkonstrukt gewählt.

Einerseits wurde der Ansatz mit Ni-NTA-Agarose-Matrix (1 mL/20 mg Protein) in einem Glassäulenkörper der Firma Bio-Rad 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit Kreisbewegung inkubiert, wenn es sich beim enthaltenen PrP um die kurze humane C-terminale Domäne (121-230) handelte. Anschließend wurde der Durchlauf, welcher das geschnittene native PrP enthielt, aufgefangen und die Säule mit Tris-Puffer gewaschen. Die an die Säulenmatrix bindende TEV-Protease, der His-Tag sowie ungeschnittenes PrP wurden mit dem Elutionspuffer hPrP90 eluiert.

Wenn das humane PrP 90-230 oder das murine PrP 89-231 mit der TEV-Protease geschnitten wurde, erfolgte die anschließende Entfernung der TEV-Protease durch spezifische Bindung an *p*-Aminobenzamidin-Zelite (50-80 mg/g Protease). Die Inkubation erfolgte 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler mit Kreisbewegung, anschließend wurden die *p*-Aminobenzamidin-Zelite wieder über die Fritte einer Glaskörpersäule von der Proteinlösung abgetrennt.

Nach der jeweiligen Trennung von PrP und Protease wurden die Proben (20 µL), welche zuvor im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer (2 x) versetzt und 5 Minuten bei 96 °C erhitzt wurden, mittels SDS-PAGE bezüglich Reinheit analysiert.

Die Fraktion mit dem geschnittenen Protein wurde über Nacht in Natriumacetat-Puffer (10 mM, pH 5,0) dialysiert und am folgenden Tag bei 18 514 x g und 4 °C für 45-60 Minuten zentrifugiert, um entstandenes Proteinpräzipitat zu entfernen.

Die Proteinkonzentration wurde mit einem Nanodrop-Spektrometer bestimmt und anschließend wurde die Proteinlösung bis zur gewünschten Konzentration, wie im folgenden Abschnitt 5.2.2.4. beschrieben, eingeengt.

5.2.2.4. Konzentration von Proteinlösungen

Die Konzentration von Proteinlösungen erfolgte in einem Zentrifugalkonzentrator Amicon Ultra-15 der Firma Millipore mit einem *Molecular Weight Cut-Off* (MWCO) von 10 kDa. Die Proteinlösung wurde bis zur gewünschten finalen Konzentration bei 4 °C und 2 880 x g eingeengt und dann bei 4 °C gelagert.

5.2.2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration einer Lösung wurde durch die Messung der Absorption der Lösung mit einem Nanodrop-Spektrometer bei 280 nm (A_{280}) bestimmt. Das Messverfahren ist wenig sensitiv und beruht auf dem Absorptionsverhalten aromatischer Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin), die bei etwa 280 nm ihr Absorptionsmaximum aufweisen. Zur Konzentrationsbestimmung wurden jeweils 2 μL der Proteinlösung eingesetzt. Zusammen mit dem Molekulargewicht sowie dem molaren Extinktionskoeffizienten des jeweiligen Proteins (Tabelle 29), der mit dem Programm ProtParam des *ExpASy Proteomics Servers* aus der Aminosäuresequenz berechnet wurde, konnte mit der folgenden Formel 3 die Konzentration der Proteinlösung bestimmt werden.

$$c = \frac{A_{280} \text{ MW}}{\epsilon d}$$

Formel 3: c = Konzentration der Proteinlösung, A_{280} = gemessene Absorption bei 280 nm, MW = Molekulargewicht des Proteins, ϵ = molarer Extinktionskoeffizient des Proteins, d = Küvettschichtdicke

Tabelle 29: Molekulargewichte (MW) und molare Extinktionskoeffizienten (ϵ) der PrP-Konstrukte mit und ohne His-Tag

Proteinname	His-Tag	Anzahl AS	MW [Da]	ϵ [$\text{L mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
hPrP90-230	+	184	21 042,2	30 495
	-	141	16 060,8	22 015
hPrP90-230+EFEA	+	188	21 518,7	30 495
	-	145	16 537,3	22 015
hPrP121-230	+	153	17 982,8	24 995
	-	110	13 001,4	16 515
hPrP121-230+EFEA	+	157	18 459,2	24 995
	-	114	13 477,9	16 515
mPrP89-231	+	186	21 267,4	35 995
	-	143	16 286,1	27 515

5.2.2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode, bei der die Größe von Proteinen, aber auch Nukleinsäuren, in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) in Polyacrylamid-Gelen analysiert werden kann. Durch das Aufkochen der Proteinproben und das im Probenpuffer vorhandene SDS werden oligomere Proteine in ihre Untereinheiten dissoziiert und denaturiert. Durch die Wechselwirkungen zwischen den hydrophoben Ketten des SDS und den hydrophoben Bereichen des denaturierten Proteins wird der entfaltete Zustand des Proteins stabilisiert. Die

Sulfat-Gruppen des SDS sind stark negativ geladen und überdecken, wenn SDS an den Polypeptidketten gebunden hat, die normalerweise vorhandenen Ladungen des Proteins. Das SDS-Polyacrylamid-Gel ist ein diskontinuierliches System, in dem die denaturierten Proteine zunächst in einem Sammelgel konzentriert werden und dann als schmale Banden in das Trenngel gelangen, wo die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld getrennt werden (Shapiro *et al.*, 1967; Laemmli, 1977; Garfin, 1990; Maizel, 2000).

Zur Herstellung der SDS-Polyacrylamid-Gele wurden zunächst die in Tabelle 30 angegebenen Komponenten für das Trenngel gemischt, in einen *Multiple Gel Caster* gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Trenngel polymerisiert war, wurde das Isopropanol entfernt und die Mischung für das Sammelgel (Tabelle 30) dazugegeben.

Tabelle 30: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die SDS-PAGE

Komponenten	Trenngel 15 %	Sammelgel 4 %
ddH ₂ O	1,2 mL	6,1 mL
30 % Acrylamid/Bisacrylamid Verhältnis 37:5:1	2,5 mL	1,3 mL
Puffer	1,3 mL	2,5 mL
10 % SDS	50 µL	100 µL
TEMED	3 µL	10 µL
10 % APS	25 µL	50 µL

Die Proteinproben wurden mit Probenpuffer (2 x) versetzt und durch Erhitzen für 5 bis 10 Minuten bei 96 °C denaturiert. Die Gele wurden in eine *Mighty Small II* Gelkammer eingespannt, diese wurde mit Elektrodenpuffer (1 x) gefüllt und 20 µL der jeweiligen Probe sowie 8 µL Proteingrößenmarker wurden in die Probenaschen des Sammelgels gegeben. Die Elektrophorese erfolgte für etwa eine Stunde bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA.

5.2.2.7. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

Bei der nativen Gelelektrophorese bleibt die native Proteinfaltung und Nettoladung erhalten, daher werden die Proteine dabei nicht nach ihrer Molekülmasse, sondern nach ihrem isoelektrischen Punkt und hydrodynamischen Radius aufgetrennt. Der Unterschied zwischen der SDS-PAGE und der nativen PAGE besteht vorwiegend darin, dass letztere auf die Zugabe von SDS verzichtet und die Proben ungekocht auf das Gel aufgetragen werden. Es gibt drei native PAGE-Verfahren, die als *clear native*, *blue native* und quantitative präparative native

kontinuierliche-PAGE (QPNC-PAGE) bezeichnet werden. In dieser Arbeit wurden die *clear native* und *blue native* PAGE-Verfahren durchgeführt (Schägger und von Jagow, 1991; Schägger *et al.*, 1994; Wittig und Schägger, 2005; Wittig *et al.*, 2006; Kastenholz, 2006).

Bei der *blue native* PAGE wird im Gegensatz zur *clear native* PAGE der Probenpuffer und Kathodenpuffer mit Coomassie *Brillant Blue* versetzt. Durch den Farbstoff sind die Proteine schon während der Elektrophorese auf dem Gel sichtbar, da das Coomassie an die hydrophoben und kationischen Bereiche im Protein bindet, die dadurch eine negative Nettoladung haben. Die Gele sind wie bei der SDS-PAGE diskontinuierlich, d. h. sie bestehen aus einem Trenngel und einem Sammelgel, deren Zusammensetzung in Tabelle 31 aufgelistet ist. Die Proteinproben wurden mit dem Probenpuffer (2 x, ohne SDS) im Verhältnis 1:1 gemischt und auf das native Gel aufgetragen. Da bei der Elektrophorese viel Wärme erzeugt wird, erfolgte die Elektrophorese auf Eis, um dadurch eine mögliche Denaturierung der nativen Proteine zu vermeiden. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Spannung von 50 V gestartet, bis die Proteine durch das Sammelgel gewandert waren. Für die Wanderung der Proteine durch das Trenngel wurde eine Spannung von 150 bis 200 V gewählt.

Tabelle 31: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels für die *blue* und *clear native* PAGE

Komponenten	Trenngel (7 %)	Sammelgel (4 %)
ddH ₂ O	14 mL	6,4 mL
40 % Acrylamid/Bisacrylamid Verhältnis 19:1	4,5 mL	1 mL
Puffer	6,25 mL	2,5 mL
TEMED	12,5 µL	10 µL
10 % APS	125 µL	50 µL

5.2.2.8. Coomassie-Färbung von Polyacrylamid-Gelen

Die Proteinbanden in einem Polyacrylamid-Gel können durch Färbung mit Coomassie-Farbstoff visualisiert werden, welcher im sauren Milieu Komplexe mit den kationischen und unpolaren Seitenketten der Polypeptidkette bildet. Dazu wurde das vom Sammelgel abgetrennte Trenngel für etwa eine Stunde oder über Nacht in Coomassie-Färbelösung gelegt. Anschließend wurde das Gel solange in Entfärber geschwenkt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Die Gele wurden dann bis zur fotografischen Dokumentation in ddH₂O gelagert.

5.2.2.9. Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Die Silberfärbung ist eine weitere Methode, um Proteinbanden auf einem Polyacrylamid-Gel sichtbar zu machen. Die Nachweisgrenze für Coomassie liegt je nach verwendetem Coomassie-Farbstoff bei 0,1 bis 1,0 µg Protein pro Bande im Polyacrylamid-Gel (Neuhoff *et al.*, 1988; Garfin, 1990). Die Silberfärbung ist dagegen sehr viel sensitiver und hat eine Nachweisgrenze von 0,1 bis 1 ng pro Gelbande (Garfin, 1990; Chevallet, 2006).

Zur Silberfärbung wurden die Proteine zunächst durch die Fixierlösung im Gel denaturiert und ausgefällt, außerdem wurde SDS herausgewaschen. Dazu wurde das Gel 45 Minuten auf einem Schüttler mit Kreisbewegung inkubiert. Anschließend wurde das Gel weitere 45 Minuten in der Reduktionslösung geschwenkt, gefolgt von drei Waschschritten mit ddH₂O von jeweils 30 Minuten. Die Färbung erfolgte für 30 Minuten in der Färbelösung mit Silbernitrat, dabei lagern sich die Silberionen an negativ geladene Seitenketten im Protein an. Um die überschüssigen Silberionen wieder zu entfernen, wurde das Gel für 5 Minuten mit ddH₂O gewaschen. Durch alkalisches Formaldehyd in der Entwicklerlösung wurden die Silberionen anschließend zu elementarem Silber reduziert. Wenn die Proteinbanden nach etwa 2 bis 5 Minuten gut erkennbar waren, wurde die Reaktion durch Zugabe von Stopplösung beendet. Die Gele konnten einige Tage in der Stopplösung gelagert werden.

5.2.2.10. Western Blot

Der Western Blot, auch Immunoblot genannt, ist eine Methode zum spezifischen Nachweis von Proteinen, welche zuvor in einem Gel elektrophoretisch getrennt und durch Übertragung auf eine Nitrozellulose-Membran dauerhaft fixiert wurden. Detektierbar werden die Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

Bei dem durchgeführten *Semi-Dry-Blot*-Verfahren wurde das Proteingemisch zunächst mit Hilfe der SDS-PAGE entsprechend der Molekulargewichte getrennt. Die zuvor mit Isopropanol aktivierte Transfermembran (PVDF) wurde mit dem Gel zwischen jeweils zwei in Transferpuffer getränkten Filterpapieren in eine Blot-Kammer gelegt. Nach dem Transfer der Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA/Gel für 60 Minuten wurden zunächst die freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Transfermembran für 30 bis 45 Minuten in einer Blockierungslösung blockiert. Anschließend wurde die Membran dreimal 5 Minuten mit TBS-T-Puffer gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit einer verdünnten (1:1 000 in 3 % (w/v) BSA in TBS-T-Puffer) primären Antikörper-Lösung (Tetra-His *Antibody: mouse*

anti-(H)₄ IgG1, BSA-free, Qiagen) inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen der Membran mit TBS-T-Puffer für jeweils 5 Minuten wurde der verdünnte (1:5 000 in 5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T-Puffer) sekundäre Antikörper (*rabbit anti-mouse IgG-HRP*, Santa Cruz Biotechnology) zur Membran gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den mit dem Markerenzym Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugierten sekundären Antikörper wurde die Chemolumineszenzreaktion des Luminols in der ECL *Solution A* katalysiert. Die Entwicklung der Membran erfolgte, nachdem sie zuvor erneut dreimal mit TBS-T-Puffer und einmal mit TBS-Puffer für 5 Minuten gewaschen wurde, mit einem Gemisch aus 12 mL ECL *Solution A*, 1,2 mL ECL *Solution B* und 30 µL Wasserstoffperoxid für 2 Minuten unter Lichtausschluss. Durch die Entnahme der Membran aus der Lösung wurde die Reaktion gestoppt und die Membran sofort gescannt. Für die Inkubationsschritte wurde ein Schüttler mit Kreisbewegung verwendet.

5.2.2.11. Proteinase K (PK) Sensitivitätstest

Proteinase K ist eine Endopeptidase mit geringer Substratspezifität, die in der Molekularbiologie zum Proteinabbau bei der DNA- bzw. RNA-Isolierung verwendet wird. Um die Sensitivität von PrP gegenüber PK zu testen, wurden das jeweilige Protein und PK in verschiedenen molaren Verhältnissen (250:1, 350:1, 500:1) eingesetzt. Die Proteine wurden mit PK für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, dabei wurden nach 10, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten 10 µL Proben des Ansatzes entnommen und die Reaktion mit 1 µL PMSF (10 mM) gestoppt. Die abgenommenen Proben wurden anschließend mit 10 µL Probenpuffer (2 x, ohne DTT) für 4 Minuten bei 96 °C erhitzt und mittels SDS-PAGE analysiert.

5.2.2.12. Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Für die DLS-Messungen wurden verschiedene DLS-Geräte verwendet. Die statischen DLS-Messungen der Standardproteine (Lysozym, Thaumatin, BSA, Aldolase und Ferritin) wurden mit dem *Spectroscatter 201* (Molecular Dimensions) mit einem He-Ne Laser bei einer Wellenlänge von 690 nm und einer konstanten Temperatur von 20 °C durchgeführt. Dazu wurden 20 µL Probe in eine Quarzküvette überführt und diese mit einer Akkumulationszeit von 20 Sekunden zehnmal unter Verwendung der Autopilot-Funktion der Software *SpectroSize* gemessen. Die Stammlösungen der Proteine wurden mit 20 mM Phosphat-Puffer angesetzt. Die Proteinproben wurden zunächst für 45 Minuten bei 16 600 x g und 4 °C zentrifugiert, die genaue Konzentration mit dem Nanodrop-Spektrometer bestimmt und auf eine final zu

messende Proteinkonzentration von jeweils 5 bzw. 8 mg/mL eingestellt. Die Konzentration wurde mit Hilfe der ermittelten Extinktionskoeffizienten und des Molekulargewichts berechnet. Des Weiteren wurden DLS-Messungen mit einem *SpectroLight* 600 der Firma Xtal Concepts durchgeführt. Hierzu wurden die Proben für 45 Minuten bei 16 600 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden 1-5 µL der Probe in eine spezielle Trägerplatte (HLA *Plate Nunc*), welche zuvor mit Paraffinöl überschichtet wurde, unter das Öl pipettiert. Die Messung erfolgte bei einer Temperatur von 20 °C mit einer Akkumulationszeit von 30 Sekunden mit 10 Wiederholungen.

Der hydrodynamische Radius R_H von Proteinen kann mit Hilfe des Molekulargewichts M der Proteine sowie der Avogadro-Konstanten N_A berechnet werden (Formel 4). Zur Berechnung wurde ein spezifisches Partikelvolumen V_S mit $0,73 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$ und die Hydratation h mit $0,35 \text{ g Wasser/g Protein}$ verwendet (Redecke *et al.*, 2009).

$$R_H = \left(\frac{3 M (V_S + h)}{4 \pi N_A} \right)^{\frac{1}{3}}$$

Formel 4: Berechnung des hydrodynamischen Radius R_H [m]: M = Molekulargewicht des Makromoleküls [g/mol], V_S = spezifisches Partikelvolumen [cm^3g^{-1}], h = Hydratation, N_A = Avogadro-Konstante [mol^{-1}]

5.2.2.13. UV-induzierte Umwandlung des Prion-Proteins

• Versuchsaufbau

Die UV-induzierte Umwandlung des PrP erfolgte basierend auf Vorarbeiten von Redecke *et al.* 2009. Da im Laufe dieser Arbeit je nach Fragestellung das generelle Setup spezifisch angepasst wurde, erfolgt die detaillierte Beschreibung im Ergebnisteil, im Folgenden sind jedoch die grundlegenden Abläufe dargestellt.

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rübhausen des Instituts für Angewandte Physik der Universität Hamburg wurden die PrP-Konstrukte mit Hilfe eines Ti:Saphir-Lasers (Tsunami) mit Licht im UVB-Wellenlängenbereich bestrahlt. Die UV-induzierte Umwandlung des rekombinanten PrP, erfolgte in einem Reinraum mit einer konstanten Temperatur von $22 \pm 0,5 \text{ °C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von $40 \pm 3 \%$. Zusätzlich erfolgten statische DLS-Messungen, um die gebildeten Intermediate und oligomeren Zustände nachzuweisen und dadurch die erfolgreiche Induktion der Umwandlung des PrP zu visualisieren.

Für den Aufbau des gepulsten Lasersystems wurde der Ti:Saphir-Laser mit einem Spektralbereich von 700-1 000 nm verwendet, der von einem Diodenlaser (Millennia) mit

532 nm gepumpt wurde. Die Einstellung der gewünschten Wellenlänge im UV-Bereich erfolgte mittels Frequenzverdoppler/-verdreifacher (FHG), außerdem wurde ein beweglicher Klappspiegel zur Blockierung des Laserstrahls eingesetzt.

Die Proteinlösung wurde mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe aus dem Reservoir in den UV-Strahl und anschließend wieder zurück ins Reservoir geleitet, so dass ein geschlossener Kreislauf entstand (Abbildung 50). Die Transmission der UV-Strahlung hinter der Probe sowie die Laserleistung vor der Probe bei umgeklapptem Spiegel wurden jeweils durch einen Messkopf aufgezeichnet. Vor jedem Lauf wurde das System mit dem entsprechenden Puffer gespült, dann wurde die Proteinlösung, welche zuvor 45 Minuten bei 4 °C und 18 500 x g zentrifugiert wurde, in das Reservoir gegeben. Der Puffer wurde dem Totvolumen des Systems entsprechend gegen die Proteinlösung durch Pumpen ausgetauscht. Zur Analyse des Verlaufs der UV-induzierten Umwandlung der PrP-Konstrukte wurden Proben zu spezifischen Zeitpunkten entnommen, von denen jeweils 20 µL nach Versetzen mit 20 µL SDS-Probenpuffer (2 x, ohne DTT) für 5 Minuten auf 96 °C erhitzt und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert wurden. Nach Beendigung der Bestrahlung wurde die Proteinlösung vollständig aus dem Kreislauf entnommen und bei 4 °C bis zur weiteren Analyse bzw. Verwendung gelagert.

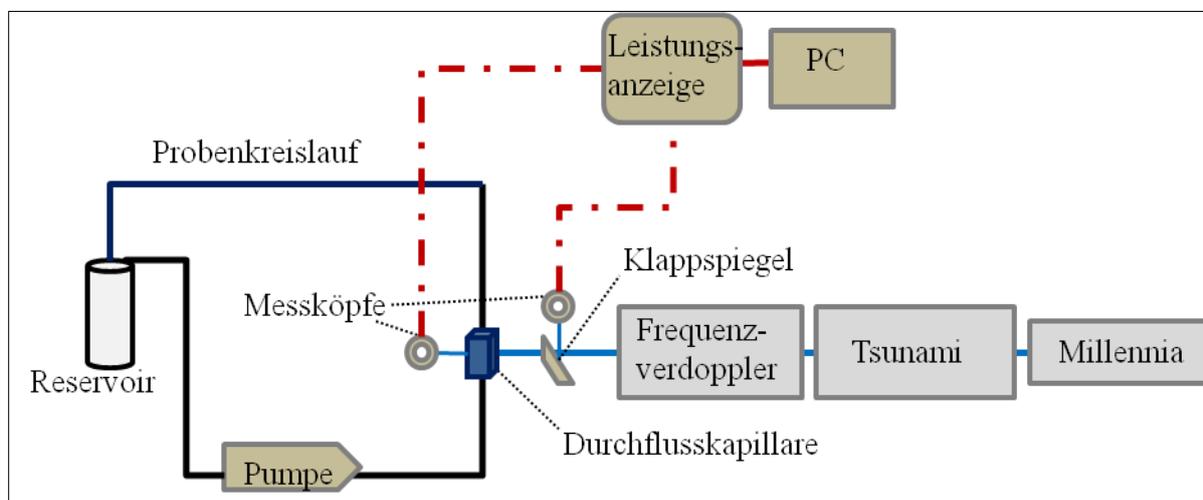


Abbildung 50: Schematische Darstellung des ursprünglichen Versuchsaufbaus für die UV-induzierte Umwandlung des PrP. Das jeweilige PrP-Konstrukt wurde mit dem Tsunami-Laser mit Frequenzverdoppler bzw. -verdreifacher bestrahlt. Aus dem Reservoir gelangte die Proteinlösung durch die peristaltische Pumpe über die Bestrahlungsküvette (Durchmesser 5 mm) zurück ins Reservoir. Mit den Messköpfen vor und hinter der Bestrahlungsküvette wurde die Leistung bzw. Transmission des Lasers aufgezeichnet.

• Kalibriergel zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Nach der UV-Bestrahlung enthielten die bestrahlten PrP-Proben sowohl PrP-Monomere als auch intermediäre Zwischenzustände. Um die Konzentration der intermediären

Zwischenprodukte nach der Bestrahlung auf dem Polyacrylamid-Gel abschätzen zu können, wurde ein Kalibriergel mit verschiedenen Konzentrationen an PrP-Monomeren angefertigt. Dazu wurden Eichlösungen vom monomeren hPrP90-230 im Konzentrationsbereich von 1 bis 0,025 mg/mL hergestellt, von denen jeweils 20 µL mit 20 µL SDS-Probenpuffer (2 x) vermischt und für 5 Minuten bei 96 °C erhitzt wurden. Jeweils 20 µL der Ansätze wurden mittels SDS-PAGE sowie anschließender Coomassie-Färbung visualisiert.

- **Stabilitätstest**

Zur Evaluierung der Stabilität des PrP unter verschiedenen Pufferbedingungen wurde ein Stabilitätstest mit verschiedenen Konzentrationen an Natriumchlorid (50 bis 500 mM, Stammlösung 4 M) und Natriumacetat (20 bis 200 mM, Stammlösung 1 M, pH 5,0) durchgeführt. Die eingesetzte Konzentration des monomeren hPrP90-230 betrug 0,875 mg/mL und wurde für 60 Minuten bei Raumtemperatur unter den jeweiligen Pufferbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 45 Minuten bei 16 600 x g zentrifugiert, jeweils 20 µL mit 20 µL Probenpuffer (2 x) versetzt, für 5 Minuten bei 96 °C erhitzt und jeweils 20 µL der Ansätze elektrophoretisch analysiert. Anhand der nach der Zentrifugation erkennbaren Proteinpräzipitate und der Intensität der Gelbanden im Vergleich zum PrP in 10 mM Natriumacetat-Puffer wurde die Stabilität des PrP bestimmt.

- **Konzentration der UV-bestrahlten Proteinproben**

Zur Konzentration der Proteinlösung wurden zwei verschiedene Verfahren angewandt. Zum einen wurde eine Amicon *Ultrafree-MC* 30 000 NMWL (*Nominal Molecular Weight Limit*)-Konzentrationseinheit verwendet. Die Konzentrormembran wurde zuvor mit 5 % Triton X-100 in ddH₂O deaktiviert, um unspezifische Proteinbindung zu minimieren. Dazu wurde der Konzentration mit ddH₂O zentrifugiert und die benetzte Membran dann mit 0,5 mL der Triton-X-Lösung für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung der Lösung wurde die Membran achtmal mit ddH₂O gewaschen und weitere zweimal durch Zentrifugation mit ddH₂O gespült. Anschließend wurde die Proteinlösung bei 4 °C und 2 880 x g konzentriert.

Außerdem wurde eine Filtrationseinheit (*USY Disposable Ultrafilter Units*, 50 000 MWCO) der Firma Advantec MFS, Inc. verwendet, welche zuvor mit 5 % Tween-20 in ddH₂O deaktiviert wurde. Zunächst wurde die Membran zweimal mit ddH₂O gespült und dann über Nacht mit der Tween-20-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Lösung verworfen, die Membran 15 Mal mit ddH₂O gewaschen und zweimal durch Filtration mit

ddH₂O gespült. Die Proteinlösung wurde anschließend in die Filtrationseinheit gegeben und durch den Druck, der durch das Einspritzen von Luft mit einer 10 mL Spritze erzeugt wurde, durch die Membran gepresst, wobei die Proteine konzentriert wurden. Durch die große Porengröße der Membran sollten nicht nur die intermediären Zwischenstufen konzentriert werden, sondern durch die mehrmalige Zugabe von Natriumacetat-Puffer (10 mM, pH 5,0) und wiederholte Konzentration sollte außerdem das PrP-Monomer ausgespült werden.

- **Affinitätschromatographie**

Bei der Affinitätschromatographie handelt es sich speziell um die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC). Dabei ist eine metallkomplexierende Gruppe an der Matrix immobilisiert. Das verwendete multivalente Übergangsmetallion ist in diesem Fall Ni(II) und an Nitrilotriessigsäure gebunden. Die Nickelionen bilden mit Histidin-Resten einen Protein-Nickel-Chelatkomplex und das Protein kann sowohl durch einen pH- als auch einen Imidazol-Gradienten wieder von der Säule eluiert werden (www.qiagen.com 2001).

Für die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie wurde ein ÄKTApurifier System mit einer HisTrap FF Nickel-Sepharose-Säule verwendet. Die Elution des Proteins erfolgt im ersten Lauf über einen pH-Gradienten, indem ein Natriumphosphat-Puffer (10 mM) mit einem pH von 7,5 gegen einen Natriumacetat-Puffer (10 mM) mit einem pH von 4,5 ausgetauscht wurde. Im zweiten Lauf wurde durch einen Imidazol-Gradienten das Protein von der Säule eluiert. Dazu wurde der Natriumacetat-Puffer (10 mM, pH 4,5) durch einen Natriumacetat-Imidazol-Puffer (10 mM, 500 mM, pH 5,0) mit Imidazol angereichert und dadurch die Histidine vom Imidazol aus dem Protein-Nickel-Chelatkomplex verdrängt. Es wurden jeweils 5 mL Proteinlösung für die Affinitätschromatographie verwendet. Nach beiden Läufen wurden die mittels kontinuierlicher Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm ermittelten proteinhaltigen Fraktionen mit Hilfe der SDS-PAGE-Analyse visualisiert.

- **Größenausschlusschromatographie**

Bei der Größenausschlusschromatographie werden Moleküle nach ihrem Molekulargewicht und ihrer Form getrennt. Das poröse Trägermaterial besitzt eine definierte Porengröße, in die die kleineren Moleküle eindringen können und dadurch einen längeren Weg zurücklegen müssen als die großen Moleküle. Daher durchlaufen die großen Moleküle der aufgetragenen Proteinlösung die Säule leichter und erscheinen in den früheren Fraktionen im Gegensatz zu den später eluierenden kleinen Molekülen. Für die Größenausschlusschromatographie wurde ein ÄKTApurifier System mit zwei verschiedenen Säulen und unterschiedlichen Parametern

verwendet (Tabelle 32). Die Säulen mussten vor dem Lauf mit einem Säulenvolumen ddH₂O gewaschen und mit einem Säulenvolumen des entsprechenden Puffers äquilibriert werden. Die Probe wurde mit einer entsprechenden Probenschleife injiziert und die Elution des Proteins mit einer kontinuierlichen Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm verfolgt. Die proteinhaltigen Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

Tabelle 32: Parameter der verwendeten Säulen für die Größenausschlusschromatographie

Parameter	<i>HiLoad 16/600 Superdex 75 prep grade</i>	<i>Superose 12 10/300 GL</i>
Säulenvolumen	120 mL	24 mL
Puffer	100 mM Natriumacetat, 50 mM Imidazol, pH 5,0	
Probenvolumen	5 mL	200 µL
Flussrate	1 mL/min	0,7 mL/min
Volumen der Elution	160 mL	35 mL
Volumen der Fraktion	1,8 mL	0,5 mL

• Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie werden die Moleküle nach ihrer Nettoladung getrennt. Wird ein Proteingemisch auf eine Ionenaustauschchromatographie-Säule gegeben, durchlaufen neutrale Moleküle und Proteine, die die gleiche Ladung wie die Ionen auf der Matrix besitzen, die Säule. Im Gegensatz dazu werden die den Matrix-Ionen entgegengesetzt geladenen Proteine an die Matrix-Ionen gebunden und mit Hilfe eines Konzentrationsgradienten der Gegenionen im verwendeten Puffer schrittweise von der Ionenaustauschersäule eluiert.

Zur Durchführung dieses chromatographischen Verfahrens wurde ebenfalls ein ÄKTApurifier System mit der Kationenaustauschersäule *Resource S* verwendet. Die Säule wurde zunächst mit je einem Säulenvolumen ddH₂O und dem Proteinpuffer (5 mM Natriumacetat, pH 5,0) gespült. Es wurden 5 mL Proteinlösung injiziert. An die Matrix gebundene Proteine wurden mit einem linearen Gradienten auf bis zu 1 M Natriumacetat (pH 5,0) eluiert. Die kontinuierliche Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm erfolgte bei einer Flussrate von 3,5 bis 4,0 mL/min über ein Gesamtvolumen von 45 mL. Die gesammelten proteinhaltigen Elutionsfraktionen mit einem Volumen von 0,5 mL wurden mittels SDS-PAGE analysiert.

• Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation ist eine Methode zur Trennung von Makromolekülen aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit in einem Lösungsmittel durch

Ausnutzung der Zentrifugalkraft. Dazu wurde in ein Zentrifugenröhrchen (15 bzw. 10 mL) das Lösungsmittel OptiPrep™ (Iodixanol) mit einem Konzentrationsgradienten geschichtet, wobei die Iodixanol-Fraktion mit der geringsten Dichte die oberste Schicht bildete. Das Lösungsmittel wurde mit Natriumacetat-Puffer (10 mM, pH 5,0) entsprechend verdünnt, um die verschiedenen Konzentrationen für den Gradienten herzustellen (Tabelle 33). Auf die oberste Lösungsmittelschicht wurde vorsichtig die Proteinlösung gegeben und in einer Ultrazentrifuge (L-100 XP Ultrazentrifuge) bei zwei verschiedenen Bedingungen am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf im Institut für Neuropathologie zentrifugiert.

Tabelle 33: Lösungen für die Dichtegradienten-Ultrazentrifugation

Konzentration OptiPrep™ [%]	1. Lauf eingesetztes Volumen [mL]	2. Lauf eingesetztes Volumen [mL]
50	1,50	0,52
40	1,50	0,52
30	1,50	0,52
20	4,50	1,56
10	1,50	0,52
5	0,75	0,20
Proteinprobe	0,60	0,20

Die UV-bestrahlten PrP-Proben wurden in verschiedenen Ausgangskonzentrationen eingesetzt (0,6 und 2,0 mg/mL). Der erste Lauf der Ultrazentrifugation erfolgte für fünf Stunden bei 200 000 x g und 4 °C, der zweite Lauf wurde für vier Stunden bei 260 000 x g und 4 °C durchgeführt. Die zentrifugierten Proben wurden fraktioniert. Hierzu wurden nach dem ersten Lauf 1,0 mL und nach dem zweiten Lauf 0,5 mL vorsichtig aus dem oberen Meniskus abgenommen. Diese wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert.

5.2.2.14. Metallkatalysierte oxidative Umwandlung des Prion-Proteins

Die metallkatalysierte Oxidation des PrP erfolgte in 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,0). Dazu wurde die Proteinlösung mit einer Ausgangskonzentration zwischen 2,5 und 5,0 mg/mL zunächst 45 Minuten bei 4 °C und 18 500 x g zentrifugiert. Die Konzentration des Proteins wurde mit dem Nanodrop-Spektrometer genau bestimmt, um unter Berücksichtigung des Molekulargewichts und des entsprechenden Extinktionskoeffizienten die Proteinkonzentration auf 44 µM in 60 µL einzustellen. Die Proteinlösung wurde in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß mit 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,0) auf 60 µL aufgefüllt und ein 15-20 mg schweres Kupferplättchen hinzugefügt. Um eventuelle Abweichungen besser zu erkennen, wurde jeweils

ein dreifacher Ansatz durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden 60 μL PrP (44 μM) ohne Kupferzusatz verwendet. Die Kupfer-haltigen Proben wurden für die entsprechende Zeit bei 37 °C im Wasserbad inkubiert, während die Negativproben für dieselbe Zeit bei 4 °C lagerten.

Für den metallkatalysierten oxidativen Aggregationstest mit Peptid wurden 44 μM Proteinlösung mit 308 μM Peptid (2 mg/mL) versetzt, welches zuvor in 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 5,0) gelöst wurde, und mit Natriumacetat-Puffer auf 60 μL aufgefüllt. Die Protein-Peptid-Proben wurden vor der Zugabe von Kupfer alle für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde ebenfalls ein Dreifachansatz mit entsprechenden Negativkontrollen mit und ohne Peptid bzw. Kupfer für die proteinspezifische Zeit im Wasserbad bei 37 °C bzw. bei 4 °C belassen.

Anschließend wurden die Proben in neue 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt, um diese vom Kupfer zu trennen. Dann wurden die Proben 45 Minuten bei 4 °C und 16 000 x g zentrifugiert, um möglicherweise gebildete Proteinaggregate zu pelletieren. Aus dem oberen Meniskus des Überstandes wurden jeweils 25 μL der Proteinlösung abgenommen, in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß gegeben und anschließend mittels Bradford-Test, SDS-PAGE, DLS-Messung und CD-Spektroskopie analysiert.

- **Bradford-Test zur Bestimmung der Proteinkonzentration**

Für den Bradford-Test wurden 1:5, 1:10 Verdünnungen der Proteinlösung mit Natriumacetat-Puffer (10 mM, pH 5,0) hergestellt. Dann wurden in eine 96-Well-Platte jeweils 10 μL unverdünnte sowie 1:5 und 1:10 verdünnte Proteinlösung pipettiert und 250 μL Coomassie *Protein Assay Reagent* vorsichtig zugegeben. Anschließend wurde die Platte bei 595 nm in einem ELISA-Reader zweimal mit zehn gemittelten Messungen pro Well ausgelesen. Für die Auswertung wurden die bereits vorhandenen Messdaten der Kalibrierung von Lysozym sowie bovinem Serumalbumin (BSA) herangezogen und die metallkatalysierten Proben wurden den Negativkontrollproben gegenübergestellt.

- **Dimerisierung der Peptide mit C-terminalem Cystein-Rest**

Die Peptide mit einem Cystein-Rest am C-Terminus sollten dimerisiert werden, um den Effekt des dimerisierten Peptids auf die Aggregation des PrP zu untersuchen. Dazu wurde 1 mg des jeweiligen Peptides mit 500 μL 3 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung versetzt und 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Peptide in der Lyophylle gefriergetrocknet.

5.2.2.15. Probenpräparation für die Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz (TXRF)-Analyse

Als Proteinprobe für die TXRF-Messungen wurde das hPrP90-230+EFEA ohne Hexahistidinsequenz verwendet. Nachdem das Protein 45 Minuten bei 4 °C und 16 000 x g zentrifugiert wurde, wurden 28 1,5 mL Reaktionsgefäße mit 60 µL hPrP90-230+EFEA mit einer Konzentration von 4 mg/mL gefüllt. Zu 14 Proben wurde je ein Stück Kupfer und zu den anderen 14 Proben ein Stück Zink mit einem Gewicht von 15-20 mg gegeben. Die eine Hälfte der Proben mit Zink bzw. Kupfer wurden für 8 Stunden und die andere Hälfte für 16 Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit derselben Inkubationszeit sowie gleichem Metall vereinigt und 10 Minuten bei 4 °C und 16 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 mL Natriumacetat-Puffer (10 mM, pH 5,0) resuspendiert, 10 Minuten bei 4 °C und 16 000 x g erneut pelletiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt und dann das Pellet in 200 µL Natriumacetat-Puffer aufgenommen. Für die TXRF-Messungen wurden die Proben mit den verschiedenen Inkubationszeiten und Metallen sowie die reine Proteinprobe und der Natriumacetat-Puffer als Kontrollen verwendet.

Vor der Messung wurden je 2 µL der mit Zink und Kupfer inkubierten Proben mit 38 µL Natriumacetat-Puffer sowie 4 µL der Standardlösung versetzt. Außerdem wurden noch zu 40 µL des monomeren PrP sowie 40 µL des Natriumacetat-Puffers jeweils 4 µL der Standardlösung gegeben. Die aus Scandium und Gallium im 10:1 Verhältnis hergestellte Standardlösung wurde angesetzt, indem 200 mg/L Scandium (4,4 mM) und 20 mg/L Gallium (0,3 mM) gemischt wurden.

Für die Dreifachbestimmung der Proben sowie des Puffers wurden jeweils 2 µL Lösung auf einem Quarz- oder Plexiglas-Probenträger vorbereitet, indem die Proben auf den Trägern mit einer Infrarotlampe getrocknet wurden. Die Proben wurden dann auf einem Probenwechsler montiert und die TXRF-Daten über Nacht mit einem S2 PICOFOX (Bruker) aufgenommen. Diese Arbeiten wurden mit Hilfe von Martin Bernhard an der Universität Paderborn durchgeführt. Die gewählte Datenerfassungszeit pro Probe betrug 1 000 Sekunden. Das Spektrometer wurde mit einem Standard vor der Datenerhebung kalibriert. Gallium wurde als interner Standard verwendet (1,82 mg/L). Zum Vergleich wurde Scandium (18,2 mg/L im Verhältnis 10:1) für eine Abschätzung der „Matrixeffekte“ verwendet. Die Elementkonzentrationen wurden mit dem Programm *Spectra* (Bruker) erhalten.

Zur Ermittlung der Menge an PrP in den zur TXRF-Messung verwendeten Proben, wurden je 2 µL Proteinprobe mit 42 µL Natriumacetat-Puffer mit und ohne 6 M Harnstoff gemischt und anschließend 5 Minuten bei 96 °C gekocht. Die Proben wurden unverdünnt und in den Verdünnungen 1:2 sowie 1:4 mittels Bradford-Test analysiert.

5.2.2.16. Massenspektrometrie

Vor der massenspektrometrischen Analyse wurden die Proteinproben mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und die gewünschten Proteinbanden nach der Coomassie-Färbung ausgeschnitten. Die Gelstücke wurden entweder direkt zur Analyse an das Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf geschickt, wo die proteolytische Spaltung und massenspektrometrische Untersuchung durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Schlüter erfolgte, oder proteolytisch mit Trypsin nach dem folgenden Protokoll geschnitten und in der MS-Abteilung der Universität Hamburg gemessen.

- **Proteolytische Spaltung mit Trypsin im Gel**

Für die massenspektrometrische Untersuchung wurden die Proteine zuvor im SDS-Polyacrylamid-Gel durch die Endopeptidase Trypsin in kleinere Peptidfragmente proteolytisch gespalten und aus dem Gel extrahiert. Die Größe der dabei entstehenden Peptidfragmente konnte zuvor bestimmt werden, da Trypsin spezifisch hinter den basischen Aminosäuren Arginin und Lysin durch die Hydroxylierung der Peptidbindung am Carboxy-Ende schneidet. Dazu wurden zunächst die zu untersuchenden Proteinbanden aus dem SDS-Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten, zerkleinert und in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt. Die Gelbanden wurden entfärbt, indem diese in 100 µL der Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung zur Dehydrierung (25 mM in 50 % Acetonitril) für 10 Minuten gevortext und kurz zentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Um die Gelstücke zu rehydrieren wurden diese in 100 µL Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (25 mM) erneut für 10 Minuten gemischt und anschließend kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die beiden Schritte der De- und Rehydrierung der Gelstücke wurden so oft wiederholt, bis die Gelbanden komplett entfärbt waren.

Die weißen Gelstücke wurden für 20 Minuten in der *Speedvac* getrocknet. Zur Reduktion der Disulfidbrücke wurden 100 mM DTT in Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (25 mM, 25-30 µL) zu den Gelstücken gegeben. Der Ansatz wurde gemischt, kurz zentrifugiert und eine Stunde bei 56 °C im Thermomixer inkubiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Aminocarboxymethylierung mit Iodacetamid (55 mM) in Ammonium-

hydrogencarbonat-Lösung (25 mM, 25-35 μ L), um die reduzierten Cysteine vor einer Reoxidation durch Luft-Sauerstoff zu schützen. Die Gelstücke wurden mit der Iodacetamid-Lösung gemischt, kurz zentrifugiert und die Inkubation wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss durchgeführt. Anschließend wurde der Überstand wiederrum verworfen. Die Gelstücke wurden mit 100 μ L Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (25 mM) gewaschen, 10 Minuten gemischt, kurz zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Dann wurden die Gelstücke mit 100 μ L Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (25 mM in 50 % Acetonitril) dehydriert, dazu 5 Minuten gemischt, zentrifugiert und die Re- sowie Dehydrierung erneut wiederholt. Die anschließende Trocknung der Gelstücke erfolgte für 20 Minuten in der *Speedvac*. Für die folgende Spaltung mit Trypsin wurde 1 mg Trypsin in 2 mL ddH₂O gelöst und mit Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung verdünnt, um eine Konzentration von 12,5 ng/ μ L Trypsin zu erhalten. Die Gelstücke wurden mit der Trypsin-Lösung bedeckt, 10 Minuten auf Eis inkubiert, mit Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung (25 mM) überschichtet und dann für 15 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Peptide aus dem Gel extrahiert. Hierzu wurde der Überstand zunächst in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und die Gelstücke wurden dann mit einer 5 %igen Ameisensäure-Lösung in 50 % Acetonitril bedeckt, 20-30 Minuten im Thermomixer bei 500 rpm gemischt, zentrifugiert und für 15 Minuten sonifiziert. Der Überstand wurde in das 1,5 mL Reaktionsgefäß zu dem Spaltungsansatz gegeben. Dieser Schritt wurde noch einmal wiederholt. Das Reaktionsgefäß mit den Überständen der Spaltung wurde gut gemischt, kurz zentrifugiert und das Volumen auf 10-20 μ L in der *Speedvac* eingeengt.

Die Proben mussten vor der massenspektrometrischen Analyse entsalzt werden. Hierzu wurden diese mit entsprechenden Pipettenspitzen (*Zip Tip C₁₈ Pipette Tips*) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Proben wurden in der MS-Abteilung der Universität Hamburg mit einem MALDI-TOF-TOF gemessen.

5.2.2.17. Zirkulardichroismus (CD)-Spektroskopie

Mit Hilfe von CD-Spektren ist es möglich die Sekundärstruktur von Proteinen schnell zu charakterisieren. Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass chirale Moleküle die links- und rechts-zirkularpolarisierten Lichtstrahlen unterschiedlich stark absorbieren.

Die Messungen wurden zunächst mit einem J-715 und anschließend an einem J-815 CD-Spektrometer von Jasco mit der Software *Spectra Manager* durchgeführt. Dazu wurde der Puffer bzw. die entsprechende Probe in eine Quarzglas-Küvette mit einer Schichtdicke von

1 mm gegeben und mit einem Intervall von 0,1 nm im Wellenlängenbereich von 260 bis 190 nm bei 20 °C gemessen. Um am Ende ein reines Proteinsignal zu erhalten, wurden vor jeder Probenmessung fünf CD-Spektren des dazugehörigen Puffers aufgezeichnet. Aus den Puffer-Messungen sowie aus den 15 CD-Spektren der Proben-Messungen wurden Mittelwerte gebildet und die Puffer-Messung wurde vom Proben-Spektrum subtrahiert.

Für die Darstellung konzentrationsunabhängiger CD-Spektren wurde die *Mean Residue Ellipticity* berechnet (Formel 5) und anschließend die Wellenlänge gegen die *Mean Residue Ellipticity* aufgetragen.

$$\theta = \theta \frac{M}{10 c l n}$$

Formel 5: Berechnung der *Mean Residue Ellipticity* θ : θ =gemessene Elliptizität [mdeg], M=molare Masse [g/mol], c=Konzentration des Analyten [mg/mL], l=Länge der Küvette [cm], n=Anzahl der Aminosäuren im Protein.

Zur Bestimmung der Schmelzpunkte der PrP-Konstrukte wurden die Proteinlösungen in eine Quarzglas-Küvette mit einer Schichtdicke von 1 mm gegeben und bei den Wellenlängen 208 und 220 nm im Temperaturbereich von 20 bis 96 °C gemessen. Die Temperatur wurde dabei langsam erhöht und die Messung der Elliptizität erfolgte in 0,5 °C-Schritten. Die Temperatur wurde gegen die *Mean Residue Ellipticity* aufgetragen. Die Datenpunkte wurden durch eine sigmoide Kurve mit dem Programm *Origin 9.1* der OriginLab Corporation (Northampton, USA) angepasst. Der Wendepunkt der Sigmoidfunktion, welcher auch den Schmelzpunkt darstellt, wurde durch das Programm ermittelt.

5.2.2.18. Kleinwinkelbeugung (Small angle X-ray scattering - SAXS)

Monomeres PrP wurde mit einem Konzentrator (Amicon Ultra, 10 MWCO, Millipore) angereichert und die Konzentration mittels Nanodrop-Spektrometer überprüft. Es wurden verschiedene Proben-Konzentrationen hergestellt, diese für 45 Minuten bei 16 600 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mittels DLS-Messungen wurde untersucht, ob die konzentrierten Proben monodispers sind.

Die mittels UV-induzierter Umwandlung generierten spezifischen PrP-Oligomere wurden zunächst mit einer Filtereinheit (Amicon *Ultrafree*-MC, 30 000 NMWL, Millipore) bei 2 880 x g und 4 °C in kurzen Zeitintervallen konzentriert, nachdem die Membran ausreichend mit ddH₂O und Puffer gespült wurde. Die konzentrierten Proben wurden mit einer

Pipette resuspendiert, bevor mittels Nanodrop-Spektrometer die Konzentration bestimmt wurde. Nach 45-minütiger Zentrifugation bei 16 600 x g und 4 °C wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und durch DLS-Messungen die Stabilität der spezifischen Oligomere und die Monodispersität der Lösung überprüft. Es wurden mehrere Konzentrationen der Oligomere für die SAXS-Messungen hergestellt.

Um die Form und Größe des monomeren PrP sowie der spezifischen Oligomere zu analysieren wurden SAXS-Messungen am Messplatz X33 der Synchrotron-Quelle DORIS III (EMBL, HASYLAB/DESY, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Proben sowie die entsprechenden Puffer wurden in eine automatische Probeneinspritzkammer platziert. Während der Messung befand sich der Plattendetektor in einem Abstand von 2,7 m zur Probe, die Wellenlänge lag bei 1,5 Å und das Streuprofil wurde im Streuvektorbereich $0,01 < s \leq 6 \text{ \AA}^{-1}$ aufgezeichnet.

Vor der eigentlichen Probenmessung wurde eine BSA-Standardreihe als Referenz gemessen. Anschließend wurden 20-100 µL Probe beginnend mit der niedrigsten Konzentration der Reihe nach untersucht.

Für die Datenanalyse wurde zunächst der Puffer als Hintergrundmessung von den Protein-Spektren abgezogen und die daraus resultierenden Spektren durch die jeweilige Proteinkonzentration skaliert. Die Bestimmung des Trägheitsradius (R_g) und der Beugungsintensität $I(0)$ erfolgte mit Hilfe der Guinier-Analyse (Guinier, 1939; Rehders *et al.*, 2009) unter der Voraussetzung, dass die Beugungsintensität bei sehr kleinen Winkeln ($s < 1,3 R_g^{-1}$) durch $I(s) = I(0) \exp[-(sR_g)^2/3]$ gegeben ist. Zur Berechnung von R_g , $p(r)$ und D_{\max} aus dem vollständigen Datensatz wurde das Software-Paket Gnom (Svergun, 1992) verwendet. Für das *ab initio*-Modelling wurden die Programme DAMMIN (Svergun, 1999) und DAMMIF (Franke und Svergun, 2009) genutzt.

5.2.2.19. Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Spektroskopie

Dieses Verfahren wird sowohl in der Arzneimittelforschung zur Untersuchung der Bindungseigenschaften potentieller Wirkstoffe als auch in der Biochemie zur Bestimmung von Protein-Protein- sowie Protein-DNA-Interaktionen eingesetzt.

Die SPR-Spektroskopie wurde mit einem *Biacore* T1 000-Spektrometer im Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Außenstelle Hamburg, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Kursula sowie mit einem *Biacore* T100-Spektrometer der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Meyer, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, durchgeführt. Dazu wurde ein CM5-Sensorchip

(Carboxy-Methyl-Oberfläche) mit einer Aktivierungslösung (NHS und EDC im molaren Verhältnis 1:1) für 900 Sekunden bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ aktiviert. Dann wurde das PrP, welches zuvor mit Natriumacetat-Puffer (5 mM) bis auf eine Konzentration von 2 μM verdünnt wurde, mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ immobilisiert. Bevor die übrigen freien Bindungsstellen mit einer Ethanolamin-HCl-Lösung über 900 Sekunden mit einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ blockiert wurden, wurde für 5 Minuten mit einer Flussrate von 5 $\mu\text{L}/\text{min}$ sowie für 15 Minuten bei 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ mit Natriumacetat-Puffer (10 mM, pH 5,0) gespült. Die Peptide passierten in unterschiedlichen Konzentrationen mit einer Flussrate von 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ die immobilisierten Prion-Proteine. Die Resonanz wurde anschließend gegen die Peptidkonzentration aufgetragen und die Kurve an das *one-site binding* Modell mit dem Programm *Origin 9.1* der OriginLab Corporation (Northampton, USA) zur Ermittlung der thermodynamischen Dissoziationskonstanten (K_D) angepasst.

5.2.2.20. Proteinkristallisation

Da für eine erfolgreiche Kristallisation eine Übersättigung der Proteinlösung erreicht werden muss, und somit die Proteinkonzentration eine signifikante Rolle spielt, wurde zunächst die geeignete Proteinkonzentration für das Kristallisationsscreening bestimmt.

- **Präkristallisationstest (PCT)**

Für den Präkristallisationstest der Firma Hampton Research wurde das PrP zunächst mit einem Amicon Ultra Konzentrador konzentriert (2,1 und 16,4 mg/mL). Anschließend wurden die konzentrierten Proben 60 Minuten bei 18 000 x g und 4 °C zentrifugiert, um möglicherweise enthaltene Proteinpräzipitate abzutrennen. Als Reservoir wurden in die *Wells* A1 bis A6 500 μL Lösung A1 und in B1 bis B6 500 μL Lösung A2 gegeben. Dann wurden 2 μL der konzentrierten Proteinlösung mit 2 μL der jeweiligen Reservoirlösung ungemischt auf ein silikonisiertes Deckglas pipettiert und das Deckglas über dem entsprechenden Reservoir mit Silikonpaste positioniert. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Tropfen unter einem Lichtmikroskop betrachtet. Klare Tropfen deuten auf eine zu niedrige und trübe Tropfen auf eine zu hohe Proteinkonzentration hin.

Anschließend wurden je 500 μL der Lösung B1 in die *Wells* C1 bis C6 und je 500 μL der Lösung B2 in die *Wells* D1 bis D6 als Reservoir gegeben. Auch in diesem Fall wurden 2 μL der konzentrierten Proteinlösung mit 2 μL der jeweiligen Reservoirlösung ungemischt auf ein silikonisiertes Deckglas pipettiert und das Deckglas über dem entsprechenden

Reservoir mit Silikonpaste positioniert. Die Betrachtung der Tropfen unter dem Lichtmikroskop erfolgte ebenfalls nach 30-minütiger Inkubation. Die klaren Tropfen zeigten auch hier eine zu niedrige Konzentration an.

- **Probenvorbereitung Kristallisation**

Nachdem mittels PCT eine geeignete Konzentration des PrP ermittelt werden konnte, wurde mittels DLS-Messung überprüft, ob die konzentrierte Probe homogen vorlag.

Für die Kristallisationsscreenings wurden PrP-Proben mit Peptid verwendet. Dazu wurde zunächst die Rezeptorbelegung mit Hilfe der Ergebnisse der SPR-Spektroskopie bestimmt und das Protein mit dem entsprechenden Überschuss an Peptid für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Protein-Peptid-Gemisch bei etwa 45 000 x g und 4 °C für eine Stunde in der Ultrazentrifuge zentrifugiert, um mögliche gebildete Aggregate zu pelletieren. Bevor die Protein-Peptid-Probe für den Kristallisationsscreen verwendet wurde, erfolgten zur Kontrolle der Homogenität der Probe DLS-Messungen.

Des Weiteren wurden für Kristallisationsscreenings PrP-Proben mit verschiedenen Konzentrationen Proteinase K versetzt, um durch limitierte Proteolyse flexible Proteinbereiche proteolytisch zu entfernen. Hierzu wurde zunächst die Konzentration des PrP erhöht und die Proben wurden für 45 Minuten bei 16 000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde das PrP im molaren Verhältnis 1:10 000 und 1:100 000 mit PK versetzt und direkt für das Kristallisationsscreening verwendet. Um den Einfluss der PK auf das hPrP121-230 genauer beurteilen zu können, wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben genommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

- **Kristallisationsscreening**

Um einen ersten Einblick zu bekommen, welche Bedingungen das PrP benötigt, um erfolgreich zu kristallisieren, wurden verschiedene kommerzielle Kristallisationsscreening-Kits der Firmen Qiagen und Molecular Dimensions verwendet (Cryos Suite, ComPAS Suite, Classics Suite, AmSO₄ Suite, Morpheus, PACT premier und JCSG+ Suite Kit). Dazu wurde der Kristallisationsroboter *Honeybee* 961/963 (Genomic Solutions) genutzt, der 300 nL der Proteinlösung mit 300 nL des entsprechenden Präzipitanten in die *Wells* einer NeXtal QIA1 *μ*plate 96-Well-Platte pipettiert. 55 μ L der Präzipitantenlösung wurden als Reservoir in die *Wells* der NeXtal-Platte gegeben, diese luftdicht verschlossen und bei 20 °C im Kristallplatten-Inkubator gelagert. Das Kristallwachstum wurde mit dem Mikroskop sowie dem *Crystal Score* System regelmäßig überprüft und dokumentiert.

- **Optimierung von Kristallisationsbedingungen**

Wurden in den Kristallisationsplatten der Screens Kristalle entdeckt, so wurde versucht diese Bedingungen in einen größeren Maßstab zu überführen und zu optimieren. Dazu wurden mehrere Optimierungsansätze durchgeführt, bei denen jeweils eine Komponente des Reservoirpuffers durch Variation der Konzentration der jeweiligen Substanz verändert wurde. Es wurden 100 μL Puffer als Reservoir eingesetzt. 2 μL der Proteinlösung mit der Konzentration aus dem Screen mit 2 μL Reservoir versetzt und als *Sitting Drop* in die Kristallisationsplatte gegeben. Die Platten wurden bei 20 °C im Kristallplatten-Inkubator gelagert und das Kristallwachstum mit dem Mikroskop regelmäßig überprüft.

6. Literaturverzeichnis

- Abbott, N.J., Romero, I.A. „Transporting therapeutics across the blood-brain barrier.“ *Mol Med Today* 2 (3), 1996: 106–113.
- Abskharon, R.N.N., Soror, S.H., Pardon, E., El Hassan, H., Legname, G., Steyaert, J., Wohlkonig, A. „Combining *in-situ* proteolysis and microseed matrix screening to promote crystallization of PrP^C-nanobody complexes.“ *PEDS* 24 (9), 2011: 737-741.
- Aguzzi, A. „Polymenidou, M. Mammalian prion biology: One century of evolving concepts.“ *Cell* 116, 2004: 313-327.
- Aguzzi, A., Falsig, J. „Prion propagation, toxicity and degradation.“ *Nature Neurosci* 15, 2012: 936-939.
- Aguzzi, A., Heikenwalder, M., Polymenidou, M. „Insights into prion strains and neurotoxicity.“ *Nature Rev Mol Cell Biol* 8, 2007: 552-562.
- Aguzzi, A., Sigurdson, C., Heikenwaelder, M. „Molecular Mechanisms of Prion Pathogenesis.“ *Annu Rev Pathol Mech Dis* 3, 2008: 11-40.
- Alfaidy, N., Chauvet, S., Donadio-Andrei, S., Salomon, A., Saoudi, Y., Richaud, P., et al. „Prion protein expression and functional importance in developmental angiogenesis: role in oxidative stress and copper homeostasis.“ *Antioxid Redox Signal* 18 (4), 2013: 400-411.
- Alper, T., Cramp, W.A., Haig, D.A., Clarke, M.C. „Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?“ *Nature* 214, 1967: 764-766.
- Amenitsch, H., Benetti, F., Ramos, A., Legname, G., Requena, J.R. „SAXS structural study of PrP^{Sc} reveals ~11 nm diameter of basic double intertwined fibers.“ *Prion* 7 (6), 2013: 496-500.
- Andreoletti, O., Levavasseur, E., Uro-Coste, E., Tabouret, G., Sarradin, P., Delisle, M.B., Berthon, P., Salvayre, R., Schelcher, F., Negre-Salvayre, A. „Astrocytes accumulate 4-hydroxynonenal adducts in murine scrapie and human creutzfeldt-jakob disease.“ *Neurobiol Dis* 11, 2002: 386–393.
- Anfinsen, C. B. „Principles that govern the folding of protein chains.“ *Science* 181, 1973: 223-230.
- Antonyuk, S.V., Trevitt, C.R., Strange, R.W., Jackson, G.S., Sangar, D., Batchelor, M., Cooper, S., Fraser, C., Jones, S., Georgiou, T., Khalili-Shirazi, A., Clarke, A.R., Hasnain, S.S., Collinge, J. „Crystal structure of human prion protein bound to a therapeutic antibody.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 2009: 2554–255.
- Atarashi, R., Moore, R.A., Sim, V.L., Hughson, A.G., Dorward, D.W., Onwubiko, H.A., et al. „Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein.“ *Nat Methods* 4, 2007: 645-650.
- Baranes, D., Lederfein, D., Huang, Y.Y., Chen, M., Bailey, C.H., Kandel, E.R. „Tissue plasminogen activator contributes to the late phase of LTP and to synaptic growth in the hippocampal mossy fiber pathway.“ *Neuron* 21, 1998: 813–825.
- Baron, G.S., Caughey, B. „Effect of glycosylphosphatidylinositol anchor-dependent and -independent prion protein association with model raft membranes on conversion to the protease-resistant Isoform.“ *J Biol Chem* 278, 2003: 14883-14892.

- Baron, G.S., Hughson, A.G., Raymond, G.J., Offerdahl, D.K., Barton, K.A., Raymond, L.D., Dorward, D.W., Caughey, B. „Effect of glycans and the glycoposphatidylinositol anchor on strain dependent conformations of scrapie prion protein: Improved purifications and infrared spectra.“ *Biochem* 50, 2011: 4479–4490.
- Baron, G.S., Wehrly, K., Dorward, D.W., Chesebro, B., Caughey, B. „Conversion of raft associated prion protein to the protease-resistant state requires insertion of PrP-res (PrP(Sc)) into contiguous membranes.“ *EMBO J* 21, 2002: 1031-1040.
- Baruch-Suchodolsky, R., Fischer, B. „Abeta40, either soluble or aggregated, is a remarkably potent antioxidant in cell-free oxidative systems.“ *Biochem* 48 (20), 2009: 4354-4370.
- Baskakov, I.V., Bocharova, O.V. „In vitro conversion of mammalian prion protein into amyloid fibrils displays unusual features.“ *Biochem* 44, 2005: 2339–2348.
- Baskakov, I.V., Breydo, L. „Converting the prion protein: What makes the protein infectious.“ *Biochimica et Biophysica Acta* 1772, 2007: 692-703.
- Baskakov, I.V., Legname, G., Baldwin, M.A., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. „Pathway Complexity of Prion Protein Assembly into Amyloid.“ *J Biol Chem* 277 (24), 2002: 21140 –21148.
- Baskakov, I.V., Legname, G., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. „Folding of prion protein to its native alpha-helical conformation is under kinetic control.“ *J Biol Chem* 276, 2001: 19687-19690.
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Wälchli, M., Groth, D.F., McKinley, M.P., Prusiner, S.B., Weissmann, C. „Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene.“ *Cell* 46, 1986: 417–428.
- Bazan, J.F., Fletterick, R.J., McKinley, M.P., Prusiner, S.B. „Predicted secondary structure and membrane topology of the scrapie prion protein.“ *Prot Eng* 1, 1987: 125–135.
- Bellingham, S.A., Coleman, L.A., Masters, C.L., Camakaris, J., Hill, A.F. „Regulation of prion gene expression by transcription factors SP1 and metal transcription factor-1.“ *J Biol Chem* 284, 2009: 1291-1301.
- Berlett, B.S., Stadtman E.R. „Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress.“ *J Biol Chem* 272 (33), 1997: 20313–20316.
- Berne, B.J., Pecora, R. „Dynamic Light Scattering with Applications to Chemistry, Biology and Physics.“ *John Wiley & Sons, Inc.*, 1976.
- Berry, D.B., Lu, D., Geva, M., Watts, J.C., Bhardwaj, S., Oehler, A., Renslo, A.R., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., Giles, K. „Drug resistance confounding prion therapeutics.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 2013: E4160–E4169.
- Biverstahl, H., Andersson, A., Graslund, A., Maler, L. „NMR solution structure and membrane interaction of the N-terminal sequence (1-30) of the bovine prion protein.“ *Biochem* 43, 2004: 14940-14947.
- Bocharova, O.V., Breydo, L., Salnikov, V.V., Baskakov, I.V. „Copper(II) inhibits in vitro conversion of prion protein into amyloid fibrils.“ *Biochem* 44, 2005: 6776–6787.
- Borchelt, D.R., Taraboulos, A., Prusiner, S.B. „Evidence for synthesis of scrapie prion protein in the endocytic pathway.“ *J Biol Chem* 267, 1992: 16188-16199.
- Brazier, M.W., Doctrow, S.R., Masters, C.L., Collins, S.J. „A manganese-superoxide dismutase/catalase mimetic extends survival in a mouse model of human prion disease.“ *Free Radic Biol Med* 45, 2008: 184-192.

- Brazier, M.W., Lewis, V., Ciccotosto, G.D., Klug, G.M., Lawson, V.A., Cappai, R., Ironside, J.W., Masters, C.L., Hill, A.F., White, A.R., et al. „Correlative studies support lipid peroxidation is linked to PrP(res) propagation as an early primary pathogenic event in prion disease.“ *Brain Res Bull* 68, 2006: 346–354.
- Brown, D.R. „PrP^{Sc}-like prion protein peptide inhibits the function of cellular prion protein.“ *Biochem* 352 (Pt 2), 2000: 511–518.
- Brown, D.R., Besinger, A. „Prion protein expression and superoxide dismutase activity.“ *Biochem* 334, 1998: 423–429.
- Brown, D.R., Qin, K., Herms, J.W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P.E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., Kretzschmar, H. „The cellular prion protein binds copper *in vivo*.“ *Nature* 390, 1997: 684–687.
- Brown, D.R., Schmidt, B., Kretzschmar, H.A. „Effects of copper on survival of prion protein knockout neurons and glia.“ *J. Neurochem.* 70, 1998: 1686–1693.
- Büeler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R., Autenried, M., Aguet, M., Weissmann, C. „Mice devoid of PrP are resistant to scrapie.“ *Cell* 73, 1993: 1339–1347.
- Büeler, H., Fischer, M., Lang, Y., Bluethmann, H., Lipp, H., DeArmond, S., Prusiner, S.B., Aguet, M., Weissmann, C. „Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein.“ *Nature* 356, 1992: 577–582.
- Burns, C. S., Aronoff-Spencer, E., Dunham, C. M., Lario, P., Avdievich, N. I., Antholine, W. E., Olmstead, M. M., Vrielink, A., Gerfen, G. J., Peisach, J., Scott, W. G., Millhauser, G. L. „Molecular features of the copper binding sites in the octarepeat domain of the prion protein.“ *Biochem* 41, 2002: 3991–4001.
- Burns, C.S., Aronoff-Spencer, E., Legname, G., Prusiner, S.B., Antholine, W.E., Gerfen, G.J., Peisach, J., Millhauser, G.L. „Copper coordination in the full-length, recombinant prion protein.“ *Biochem* 42, 2003: 6794–6803.
- Calvete, J. J., Solis, D. et al. „Glycosylated boar spermadhesin AWN-1 isoforms. Biological origin, structural characterization by lectin mapping localization of O-glycosylation sites, and effect of glycosylation binding.“ *Biol Chem Hoppe Seyler* 375 (10), 1994: 667-673.
- Caughey, B. „Interactions between prion protein isoforms: The kiss of death?“ *Trends Biochem Sci* 26, 2001: 235-242.
- Caughey, B., Baron, G.S., Chesebro, B., Jeffrey, M. „Getting a grip on prions: oligomers, amyloids, and pathological membrane interactions.“ *Ann Rev Biochem*, 2009: 177-204.
- Caughey, B., Race, R., et al. „Comparative sequence analysis, *in vitro* expression and biosynthesis of mouse PrP.“ *Prog Clin Biol Res* 317, 1989: 619-636.
- Caughey, B., Race, R.E. „Potent inhibition of scrapie-associated PrP accumulation by congo red.“ *J Neurochem* 59, 1992: 768 – 771.
- Caughey, B., Raymond, G.J. „The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease and phospholipase sensitive.“ *J Biol Chem* 266, 1991: 18217–18223.
- . „Sulfated polyanion inhibition of scrapie-associated PrP accumulation in cultured-cells.“ *J Virol* 67, 1993: 643 – 650.

- Caughey, B.W., Dong, A., Bhat, K.S., Ernst, D., Hayes, S.F., Caughey, W.S. „Secondary structure analysis of the scrapie-associated protein PrP 27-30 in water by infrared spectroscopy.“ *Biochem* 30, 1991: 7672–7680.
- Chabry, J., Caughey, B., Chesebro, B. „Specific inhibition of *in vitro* formation of protease-resistant prion protein by synthetic peptides.“ *J Biol Chem* 273, 1998: 13203–13207.
- Chabry, J., Priola, S.A., Wehrly, K., Nishio, J., Hope, J., Chesebro, B. „Species-independent inhibition of abnormal prion protein (PrP) formation by a peptide containing a conserved PrP sequence.“ *J Virol* 73, 1999: 6245–6250.
- Chesebro, B., Race, B., Meade-White, K., Lacasse, R., Race, R., et al. „Fatal transmissible amyloid encephalopathy: a new type of prion disease associated with lack of prion protein membrane anchoring.“ *PLoS Pathog* 6, 2010: e1000800.
- Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E., Oldstone, M. „Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie.“ *Science* 308, 2005: 1435–1439.
- Chevallet, M., Luche, S., Rabilloud, T. „Silver staining of proteins in polyacrylamide gels.“ *Nat Protoc* 1 (4), 2006: 1852–1858.
- Chiesa, R., Harris, D.A. „Fishing for Prion Protein Function.“ *PLoS Biol* 7 (3), 2009: 439–443.
- Chin, S., Williams, B., Gottlieb, P., Margolis-Nunno, H., Ben-Hur, E., Hamman, J., Jin, R., Dubovi, E., Horowitz, B. „Virucidal Short Wavelength Ultraviolet Light Treatment of Plasma and Factor VII1 Concentrate: Protection of Proteins by Antioxidants.“ *Blood* 86 (11), 1995: 4331–4336.
- Choi, C. J., Kanthasamy, A., Anantharam, V., Kanthasamy, A.G. „Interaction of metals with prion protein: Possible role of divalent cations in the pathogenesis of prion diseases.“ *Neurotox* 27, 2006: 777–787.
- Choi, S.I., Ju, W.K., Choi, E.K., Kim, J., Lea, H.Z., Carp, R.I., Wisniewski, H.M., Kim, Y.S. „Mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in the brains of hamsters infected with the 263 K scrapie agent.“ *Acta Neuropathol (Berl.)* 96, 1998: 279–286.
- Chorev, M., Shavitz, R., Goodman, M., Minick, S., Guillemin, R. „Partially modified retro-inverso-enkephalinamides: To- pochemical long-acting analogs *in vitro* and *in vivo*.“ *Science* 204, 1979: 1210.
- Chowdhury, D.P., Sorensen, C.M., Taylor, T.W. Merklin, J.F., Lester, T.W. „Application of photon correlation spectroscopy to flowing Brownian motion systems.“ *Appl Opt* 23 (22), 1984: 4149–4154.
- Christie, W.W. *AOCS*. 24. Februar 2014. <http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/GPIanchor/index.htm> (Zugriff am 20. Januar 2015).
- Cobb, N.J., Sönnichsen, F.D., McHaourab, H., Surewicz, W.K. „Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register β -structure.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 2007: 18946–18951.
- Cobb, N.J., Surewicz, W.K. „Prion Diseases and Their Biochemical Mechanisms.“ *Biochem* 48, 2009: 2574–2585.
- Colby, D.W., Prusiner, S.B. „Prions.“ *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3 (1), 2011: a006833.
- Colby, D.W., Zhang, Q., Wang, S., Groth, D., Legname, G., Riesner, D., et al. „Prion detection by an amyloid seeding assay.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 2007: 20914–20919.

- Collinge, J., Whittington, M.A., Sidle, K.C., Smith, C.J., Palmer, M.S., et al. „Prion protein is necessary for normal synaptic function.“ *Nature* 370, 1994: 295-297.
- Colombo, G., Meli, M., Morra, G., Gabizon, R., Gasset, M. „Methionine sulfoxides on prion protein Helix-3 switch on the alpha-fold destabilization required for conversion.“ *PLoS ONE* 4, 2009: e4296.
- Come, J.H., Fraser, P.E., Lansbury, P.T., Jr. „A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1993: 5959-5963.
- Corsaro, A., Thellung, S., Villa, V., Nizzari, M., Florio, T. „Review: Role of Prion Protein Aggregation in Neurotoxicity.“ *Int J Mol Sci* 13, 2012: 8648-8669.
- Cortez, L.M., Sim, V.L. „The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases.“ *Prion* 8 (2), 2014: 197-202.
- Coy, D. H., Kastin, A.J., Schally, A.V., Morin, O., Caron, N.G., Labile, F., Walker, J.M., Fertel, R., Berntson, G.C., Sandman, C.A. „Synthesis and opioid activities of stereoisomers and other D-amino acid analogs of Methionine-Enkephalin.“ *Biochem Biophys Res Commun* 73, 1976: 632-638.
- Creutzfeldt, H.G. „Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems.“ *Z Gesamte Neurol Psychiatr* 57, 1920: 1-18.
- Cuille, J., Chelle, P.-L. „La maladie dite temblante du mouton est-elle inoculable?“ *C R Acad Sci* 203, 1936: 1552-1554.
- Davies, M. J. „The oxidative environment and protein damage.“ *Biochim Biophys Acta* 1703, 2005: 93–109.
- Davies, M.J. „Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences.“ *Biochem Biophys Res Commun* 305, 2003: 761–770.
- Davies, M.J., Dean, R.T. „Radical-mediated protein oxidation: From chemistry to medicine.“ *Oxford University Press, Oxford*, 1997.
- Davies, P., Brown, D.R. „The chemistry of copper binding to PrP: Is there sufficient evidence to elucidate a role for copper in protein function?“ *Biochem* 410, 2008: 237–244.
- de Almeida, C. J., Chiarini, L. B., et al. „The cellular prion protein modulates phagocytosis and inflammatory response.“ *J Leukoc Biol* 77 (2), 2005: 238-246.
- De Luigi, A., Colombo, L., Diomedede, L., Capobianco, R., Mangieri, M., Miccolo, C., Limido, L., Forloni, G., Tagliavini, F., Salmona, M. „The efficacy of tetracyclines in peripheral and intracerebral prion infection.“ *PLoS One* 26, 2008: e1888.
- Demaimay, R., Adjou, K.T., Beringue, V., Demart, S., Lasmézas, C.I., Deslys, J.P., Seman, M., Dormont, D. „Late treatment with polyene antibiotics can prolong the survival time of scrapie-infected animals.“ *J Virol* 71, 1997: 9685-9689.
- DeMarco, M. L., Silveira, J., Caughey, B., Daggett, V. „Structural properties of prion protein protofibrils and fibrils: an experimental assessment of atomic models.“ *Biochem* 45 (51), 2006: 15573–15582.
- Devanathan, V., Jakovcevski, I., Santucci, A., Li, S., Lee, H.J., Peles, E., Leshchyn'ska, I., Sytnyk, V., Schachner, M. „Cellular form of prion protein inhibits Reelin-mediated shedding of Caspr from the neuronal cell surface to potentiate Caspr-mediated inhibition of neurite outgrowth.“ *J Neurosci* 30 (27), 2010: 9292-9305.
- Diaz-Espinoza, R., Soto, C. „High-resolution structure of infectious prion protein: The final frontier.“ *Nat Struct Mol Biol* 19, 2012: 370–374.

- Doh-ura, K. „Therapeutics for prion diseases.“ *Rinsho Shinkeigaku* 43, 2003: 820-822.
- Doh-ura, K., Ishikawa, K., Murakami-Kubo, I., Sasaki, K., Mohri, S., Race, R., Iwaki, T. „Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models.“ *J Virol* 78, 2004: 4999-5006.
- Doh-ura, K., Iwaki, T., Caughey, B. „Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit accumulation of scrapie-associated prion protein.“ *J Virol* 74, 2000: 4894-4897.
- Dong, A., Xu, X., Edwards, A.M., et al. „*In situ* proteolysis for protein crystallization and structure determination.“ *Nat Methods* 4, 2007: 1019-1021.
- Doye, J.P.K., Poon, W.C.K. „Protein Crystallization *in vivo*.“ *Curr Opin Colloid In* 11, 2006: 40-46.
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H.D., Lang, H. „Proteinase K from *Tritirachium album* Limber.“ *Eur J Biochem* 47, 1974: 91-97.
- Eghiaian, F., Grosclaude, J., Lesceu, S., Debey, P., Doublet, B., Treguer, E., Rezaei, H., Knossow, M. „Insight into the PrP^C → PrP^{Sc} conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 2004: 10254-10259.
- Ellis, V., Daniels, M., Misra, R., Brown, D.R. „Plasminogen Activation Is Stimulated by Prion Protein and Regulated in a Copper-Dependent Manner.“ *Biochem* 41 (22), 2002: 6891-6896.
- Faivre-Sarrailh, C., Gauthier, F., Denisenko-Nehrbass, N., Le Bivic, A., Rougon, G., Girault, J.A. „The glycosylphosphatidyl inositol-anchored adhesion molecule F3/contactin is required for surface transport of paranodin/ contactin-associated protein (Caspr).“ *J Cell Biol* 149, 2000: 491-502.
- Feng, B., Wang, Z., Liu, T., Jin, R., Wang, S., Wang, W., Xiao, G., Zhou, Z. „Methionine oxidation accelerates the aggregation and enhances the neurotoxicity of the D178N variant of the human prion protein.“ *Biochim Biophys Acta* 1842 (12A), 2014: 2345-2356.
- Fischer, M., Rulicke, T., et al. „Prion protein (PrP) with deletions restoring susceptibility of PrP knockout mice to scrapie.“ *EMBO J* 15 (6), 1996: 1255-1264.
- Franke, D., Svergun, D.I. „DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering.“ *J Appl Cryst* 42 (2), 2009: 342-346.
- Gaggelli, E., Bernardi, F., Molteni, E., Pogni, R., Valensin, D., Valensin, G., Remelli, M., Luczkowski, M., Kozlowski, H. „Interaction of the human prion protein PrP(106-126) sequence with copper(II), manganese(II) and zinc(II): NMR and EPR studies.“ *J Am Chem Soc* 127, 2005: 996-1006.
- Garfin, D.E. „One-dimensional gel electrophoresis.“ *Methods Enzymol* 182, 1990: 425-441.
- Gasset, M., Baldwin, M.A., Fletterick, R.J., Prusiner, S.B. „Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1993: 1-5.
- Gati, C., Bourenkov, G., Klinge, M., Rehders, D., Stellato, F., Oberthür, D., Yefanov, O., Sommer, B.P., Mogk, S., Duzsenko, M., Betzel, C., Schneider, T.R., Chapman, H.N., Redecke, L. „Serial crystallography on *in vivo* grown microcrystals using synchrotron radiation.“ *IUCrJ* 1 (2), 2014: 87-94.

- Georgieva, D., Koker, M., Redecke, L., Perbandt, M., Clos, J., Bredehorst, R., Genov, N., Betzel, C. „Oligomerization of the proteolytic products in an intrinsic property of prion proteins.“ *Biochem Biophys Res Commun* 323, 2004: 1278–1286.
- Gerber, R., Tahiri-Alaoui, A., Hore, P.J., James, W. „Oligomerization of the human prion protein proceeds via a molten globule intermediate.“ *J Biol Chem* 282, 2007: 6300–6307.
- Gerstmann, J., Straussler, E., Scheinker, I. „Über eine eigenartige hereditärfamiliäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur frage des vorzeitigen lakalen Alterns.“ *Z Neurol* 154, 1936: 736–762.
- Gilch, S., Winkhofer, K.F., Groschup, M.H., Nunziante, M., Lucassen, R., Spielhauer, C., Muranyi, W., Riesner, D., Tatzelt, J., Schatzl, H.M. „Intracellular re-routing of prion protein prevents propagation of PrP^{Sc} and delays onset of prion disease.“ *EMBO J* 20, 2001: 3957–3966.
- Girard, P.M., Francesconi, S., Pozzebon, M., Graindorge, D., Rochette, P., Drouin, R., Sage, E. „UVA-induced damage to DNA and proteins: direct versus indirect photochemical processes.“ *J Physics: Conference Series* 261, 2011: doi:10.1088/1742-6596/261/1/012002.
- Goldburg, W.I. „Dynamic light scattering.“ *Am J Physics* 67 (12), 1999: 1152–1160.
- Goodman, J. „Some fundamental properties of speckle.“ *J Opt Soc Am* 66, 1976: 1145–1150.
- Goold, R., McKinnon, C., Tabrizi, S.J. „Prion degradation pathways: Potential for therapeutic intervention.“ *Mol Cell Neurosci*, 2014: 009.
- Govaerts, C., Wille, H., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. „Evidence for assembly of prions with left-handed β -helices into trimers.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (22), 2004: 8342–8347.
- Gregersen, N., Bross, P., Vang, S., Christensen, J.H. „Protein Misfolding and Human Disease.“ *Annu Rev Genom Hum Gen* 7, 2006: 103–124.
- Griffith, J.S. „Nature of the Scrapie Agent: Self-replication and Scrapie.“ *Nature* 215, 1967: 1043–1044.
- Grossberg, J., Sedmak, J., Sidney E. „A Rapid, Sensitive, and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250.“ *Anal Biochem* 79, 1977: 544–552.
- Groveman, B.R., Dolan, M.A., Taubner, L.M., Kraus, A., Wickner, R.B., Caughey, B. „Parallel in-register intermolecular beta sheet architectures for prion seeded PrP amyloids.“ *J Biol Chem* 289, 2014: 24129–24142.
- Guentchev, M., Siedlak, S.L., Jarius, C., Tagliavini, F., Castellani, R.J., Perry, G., Smith, M.A., Budka, H. „Oxidative damage to nucleic acids in human prion disease.“ *Neurobiol Dis* 9, 2002: 275–281.
- Guentchev, M., Voigtlander, T., Haberler, C., Groschup, M.H., Budka, H. „Evidence for oxidative stress in experimental prion disease.“ *Neurobiol Dis* 7, 2000: 270–273.
- Guinier, A. „La diffraction des rayons X aux tres petits angles; application a l'etude de phenomenes ultramicroscopiques.“ *Annu Phys* 12, 1939: 161–237.
- Hafner-Bratkovic, I., Bester, R., Pristovsek, P., Gaedtke, L., Veranic, P., Gaspersic, J., et al. „Globular domain of the prion protein needs to be unlocked by domain swapping to support prion protein conversion.“ *J Biol Chem* 286, 2011: 12149–12156.
- Haigh, C.L., Marom, S.Y., Collins, S.J. „Copper, endoproteolytic processing of the prion protein and cell signalling.“ *Front Biosci (Landmark Ed)* 15, 2010: 1086–1104.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. „Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview.“ *Methods Enzymol* 186, 1990: 1-85.
- . „Free Radicals in Biology and Medicine.“ *Oxford University Press: Oxford, UK*, 1999.
- Haraguchi, T., Fisher, S., et al. „Asparagine-linked glycosylation of the scrapie and cellular prion proteins.“ *Arch Biochem Biophys* 274 (1), 1989: 1-13.
- Hasegawa, H., Wendling, J., He, F., Trilisky, E., Stevenson, R., Franey, H., Kinderman, F., Li, G., Piedmonte, D.M., Osslund, T., Shen, M., Ketchum, R.R. „In vivo crystallization of human IgG in the endoplasmic reticulum of engineered Chinese hamster ovary (CHO) cells.“ *J Biol Chem* 286 (22), 2011: 19917-19931.
- Hay, B., Barry, R. A., et al. „Biogenesis and transmembrane orientation of the cellular isoform of the scrapie prion protein.“ *Mol Cell Biol* 7 (2), 1987: 914-920.
- Hayflick, L. „Biological aging is no longer an unsolved problem.“ *Ann N Y Acad Sci* 1100, 2007: 1-13.
- Heikenwalder, M., Julius, C., Aguzzi, A. „Prions and Peripheral Nerves: A Deadly Rendezvous.“ *J Neurosci Res* 85, 2007: 2714–2725.
- Hoepfner, A., Schmitt, L., Smits, S.H.J. „Proteins and their Ligands: Their Importance and how to Crystallize them.“ In *Advanced Topics on Crystal Growth*, von Dr. Sukarno Ferreira (Ed.), DOI: 10.5772/53951. ISBN: 978-953-51-1010-1, 2013.
- Hölscher, C., Bach, U.C., Dobberstein, B. „Prion Protein Contains a Second Endoplasmic Reticulum Targeting Signal Sequence Located at Its C Terminus.“ *J Biol Chem* 276, 2001: 13388-13394.
- Holzwarth, G., Doty, P. „The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides.“ *J Am Chem Soc* 87, 1965: 218–228.
- Hsiao, K., Baker, H.F., Crow, T.J., et al. „Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome.“ *Nature* 338, 1989: 342-345.
- Huang, Z., Prusiner, S.B., Cohen, F.E. „Scrapie prions a three-dimensional model of an infectious fragment.“ *Fold Des* 1, 1996: 13–19.
- Ilc, G., Giachin, G., Jaremko, M., Jaremko, L., Benetti, F., Plavec, J., Zhukov, I., Legname, G. „NMR structure of the human prion protein with the pathological Q212P mutation reveals unique structural features.“ *PLoS One* 5, 2010: e11715.
- Jackson, G.S., Hosszu, L.L., Power, A., Hill, A.F., Kenney, J., Saibil, H., et al. „Reversible conversion of monomeric human prion protein between native and fibrilogenic conformations.“ *Science* 283, 1999: 1935-1937.
- Jackson, G.S., Murray, I., Hosszu, L.L., Gibbs, N., Waltho, J.P., Clarke, A.R., Collinge, J. „Location and properties of metal-binding sites on the human prion protein.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 2001: 8531–8535.
- Jakob, A. „Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerations-herden).“ *Z Gesamte Neurol Psychiatr* 64, 1921: 147-228.
- Jansen, K., Schäfer, O., Birkmann, E., Post, K., Serban, H., Prusiner, S.B., Riesner, D. „Structural intermediates in the putative pathway from the cellular prion protein to the pathogenic form.“ *J Biol Chem* 382, 2001: 683–691.

- Jern, C., Eriksson, E., Tengborn, L., Risberg, B., Wadenvik, H., Jern, S. „Changes of plasma coagulation and fibrinolysis in response to mental stress.“ *Thromb Haemostasis* 62, 1989: 767–771.
- Jones, C.E., Klewpatinond, M., Abdelraheim, S.R., Brown, D.R., Viles, J.H. „Probing Copper²⁺ Binding to the Prion Protein Using Diamagnetic Nickel²⁺ and ¹H NMR: The Unstructured N terminus Facilitates the Coordination of Six Copper²⁺ Ions at Physiological Concentrations.“ *J Mol Biol* 346, 2005: 1393-1407.
- Ju, W.K., Park, K.J., Choi, E.K., Kim, J., Carp, R.I., Wisniewski, H.M., Kim, Y.S. „Expression of inducible nitric oxide synthase in the brains of scrapie-infected mice.“ *J Neurovirol* 4, 1998: 445–450.
- Kaneko, K., Vey, M., Scott, M., Pilkuhn, S., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. „COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1997: 2333-2338.
- Kastenholz, B. „Important contributions of a new quantitative preparative native continuous polyacrylamide gel electrophoresis (QPNC-PAGE) procedure for elucidating metal cofactor metabolisms in protein-misfolding diseases--a theory.“ *Protein Pept Lett* 13 (5), 2006: 503-508.
- Kawasaki, Y., Kawagoe, K., Chen, C.J., Teruya, K., Sakasegawa, Y., Doh-ura, K. „Orally administered amyloidophilic compound is effective in prolonging the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner.“ *J Virol* 81, 2007: 12889–12898.
- Kenward, A.G., Bartolotti, L.J., Burns, C.S. „Copper and zinc promote interactions between membrane-anchored peptides of the metal binding domain of the prion protein.“ *Biochem* 46 (14), 2007: 4261-4271.
- Khan, M.Q., Sweeting, B., Mulligan, V.K., Arslan, P.E., Cashman, N.R., Pai, E.F., Chakrabarty, A. „Prion disease susceptibility is affected by beta-structure folding propensity and local side-chain interactions in PrP.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 2010: 19808-19813.
- Kim, J.I., Choi, S.I., Kim, N.H., Jin, J.K., Choi, E.K., Carp, R.I., Kim, Y.S. „Oxidative stress and neurodegeneration in prion diseases.“ *Ann N Y Acad Sci* 928, 2001: 182–186.
- Kimberlin, R. H. „Scrapie agent: prions or virinos?“ *Nature* 297, 1982: 107-108.
- Kirby, L., Birkett, C.R., Rudyk, H., Gilbert, I.H., Hope, J. „*In vitro* cell-free conversion of bacterial recombinant PrP to PrPres as a model for conversion.“ *J Gen Virol* 84, 2003: 1013-1020.
- Kirkwood, T.B. „Understanding the odd science of aging.“ *Cell* 120, 2005: 437-447.
- Klajnert, B., Cortijo-Arellano, M., Cladera, J., Majoral, J.P., Caminade, A.M., Bryszewska, M. „Influence of phosphorus dendrimers on the aggregation of the prion peptide PrP 185-208.“ *Biochem Biophys Res Comm* 364, 2007: 20-25.
- Klingeborn, M., Race, B., Meade-White, K.D., Rosenke, R., Striebel, J.F., Chesebro, B. „Crucial role for prion protein membrane anchoring in the neuroinvasion and neural spread of prion infection.“ *J Virol* 85, 2011: 1484–1494.
- Klingenstein, R., Löber, S., Kujala, P., Godsave, S., Leliveld, S.R., Gmeiner, P., Peters, P.J., Korth, C. „Tricyclic antidepressants, quinacrine and a novel, synthetic chimera thereof

- clear prions by destabilizing detergent-resistant membrane compartments.“ *J Neurochem* 98, 2006: 748-759.
- Koopmann, R., Cupelli, K., Redecke, L., Nass, K., Deponte, D.P., White, T.A., Stellato, F., Rehders, D., Liang, M., Andreasson, J., Aquila, A., Bajt, S., Barthelmess, M., Barty, A., Bogan, M.J., Bostedt, C., Boutet, S., Bozek, J.D., Caleman, C., et al. „In vivo protein crystallization opens new routes in structural biology.“ *Nat Methods* 9 (3), 2012: 259-262.
- Koppenol, W.H. „The Haber-Weiss cycle--70 years later.“ *Redox Rep* 6 (4), 2001: 229-234.
- Kozlowski, H., Luczkowski, M., Remelli, M. „Prion proteins and copper ions. Biological and chemical controversies.“ *Dalton Trans* 39, 2010: 6371–6385.
- Kucziusa, T., Wohlersa, J., Karcha, H., Groschup, M.H. „Subtyping of human cellular prion proteins and their differential solubility.“ *Exp Neurology* 227 (1), 2011: 188–194.
- Laemmli, U.K. „Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4.“ *Nature* 227, 1977: 680–685.
- Laganowsky, A., Liu, C., Sawaya, M.R., Whitelegge, J.P., Park, J., Zhao, M., Pensalfini, A., et al. „Atomic view of a toxic amyloid small oligomer.“ *Science* 335, 2012: 1228–1231.
- Larda, S.T., Simonetti, K., Abdul-Wahid, M.S., Sharpe, S., Prosser, R.S. „Dynamic equilibria between monomeric and oligomeric misfolded states of the mammalian prion protein measured by 19 F NMR.“ *J Am Chem Soc* 135, 2013: 10533-10541.
- Larramendy-Gozaló, C., Barret, A., Daudigeous, E., Mathieu, E., Antonangeli, L., Riffet, C., Petit, E., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Brown, P., Deslys, J.P. „Comparison of CR36, a new heparin mimetic, and pentosan polysulfate in the treatment of prion diseases.“ *J Gen Virol* 88, 2007: 1062-1067.
- Le Pichon, C.E., Valley, M.T., Polymenidou, M., Chesler, A.T., Sagdullaev, B.T., et al. „Olfactory behavior and physiology are disrupted in prion protein knockout mice.“ *Nat Neurosci* 12, 2009: 60-69.
- Leach, S. P., Salman, M. D., Hamar, D. „Trace elements and prion diseases: a review of the interactions of copper, manganese and zinc with the prion protein.“ *Anim Health Res Rev* 7(1-2), 2006: 97-105.
- Lee, S., Antony, L., Hartmann, R., Knaus, K.J., Surewicz, K., Surewicz, W.K., Yee, V.C. „Conformational diversity in prion protein variants influences intermolecular beta-sheet formation.“ *EMBO J* 29, 2010: 251-262.
- Leffers, K.W., Wille, H., Stöhr, J., Junger, E., Prusiner, S.B., Riesner, D. „Assembly of natural and recombinant prion protein into fibrils.“ *Biol Chem* 386, 2005: 569–580.
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.-O.B., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B. „Synthetic mammalian prions.“ *Science* 305, 2004: 673-676.
- Leung, A.B., Suh, K.I., Ansari, R.R. „Particle-size and velocity measurements in flowing conditions using dynamic light scattering.“ *Appl Opt* 45 (10), 2006: 2186-2190.
- Lewis, P.A., Properzi, F., Prodromidou, K., Clarke, A.R., Collinge, J., Jackson, G.S. „Removal of the glycosylphosphatidylinositol anchor from PrP^{Sc} by cathepsin-D does not reduce prion infectivity.“ *Biochem* 395, 2006: 443-448.
- Linden, R., Martins, V.R., Prado, M.A., Cammarota, M., Izquierdo, I., Brentani, R.R. „Physiology of the prion protein.“ *Physiol Rev* 88 (2), 2008: 673-728.
- Lopes, M.H., Santos, T.G. „Prion potency in stem cells biology.“ *Prion* 6 (2), 2012: 142-146.

- Lu, D., Giles, K., Li, Z., Rao, S., Dolgih, E., Gever, J.R., Geva, M., Elepano, M.L., Oehler, A., Bryant, C., Renslo, A.R., Jacobson, M.P., DeArmond, S.J., Silber, B.M., Prusiner, S.B. „Biaryl amides and hydrazones as therapeutics for prion disease in transgenic mice.“ *J Pharmacol Exp Ther* 347, 2013: 325–338.
- Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., et al. „Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei.“ *New Engl J Med* 315, 1986: 997-1003.
- Lührs, T., Zahn, R., Wüthrich, K. „Amyloid Formation by Recombinant Full-length Prion Proteins in Phospholipid Bicelle Solutions.“ *J Mol Biol* 357, 2006: 833–841.
- Lysek, A.A., Schorn, C., Nivon, L.G., et al. „Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 2005: 640-645.
- Maglio, L.E., Perez, M.F., et al. „Hippocampal synaptic plasticity in mice devoid of cellular prion protein.“ *Brain Res Mol Brain Res* 131 (1-2), 2004: 58-64.
- Maizel, J.V. Jr. „SDS polyacrylamide gel electrophoresis.“ *Trends in Biochem Sciences* 25 (12), 2000: 590–592.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. „Molecular cloning: a laboratory manual.“ *Cold Spring Harbor Laboratory*, 1982.
- Marijanovic, Z., Caputo, A., Campana, V., Zurzolo, C. „Identification of an intracellular site of prion conversion.“ *PLoS Pathog* 5, 2009: 1000426.
- Marrot, L., Meunier, J.-R. „Skin DNA photodamage and its biological consequences.“ *J Am Acad Dermatol* 58, 2008: 139-148.
- Martins, V.R., Beraldo, F.H., Hajj, G.N., Lopes, M.H., Lee, K.S., et al. „Prion Protein: Orchestrating Neurotrophic Activities.“ *Curr Issues Mol Biol* 12, 2009: 63–86.
- McLennan H.R., Degli, E.M. „The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species.“ *J Bioenerg Biomembr* 32 (2), April 2000: 153-162.
- McNally, K.L., Ward, A.E., Priola, S.A. „Cells expressing anchorless prion protein are resistant to scrapie infection.“ *J Virol* 83, 2009: 4469–4475.
- Mead, S., Whitfield, J., Poulter, M., Shah, P., Uphill, J., Campbell, T., Al-Dujaily, H., Hummerich, H., Beck, J., Mein, C.A., Verzilli, C., Whittaker, J., Alpers, M.P., Collinge, J. „A Novel Protective Prion Protein Variant that Colocalizes with Kuru Exposure.“ *N Engl J Med* 361, 2009: 21.
- Mendoza-Nunez V.M., Ruiz-Ramos M., Sanchez-Rodriguez M.A., Retana-Ugalde R., Munoz-Sanchez J.L. „Aging-related oxidative stress in healthy humans.“ *Tohoku J Exp Med* 213, 2007: 261-268.
- Milhavel, O., Lehmann, S. „Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies.“ *Brain Res Rev* 38, 2002: 328-339.
- Milhavel, O., McMahon, H.E., Rachidi, W., Nishida, N., Katamine, S., Mange, A., Arlotto, M., Casanova, D., Riondel, J., Favier, A., Lehmann, S. „Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 2000: 13937–13942.
- Millhauser, G.L. „Copper binding in the prion protein.“ *Acc Chem Res* 37, 2004: 79–85.
- Moll, G.N., Kuipers, A., de Vries, L., Bosma, T., Rink, R. „A biological stabilization technology for peptide drugs: enzymatic introduction of thioether-bridges.“ *Drug Dis Today: Technol* 6, 2009: e13-18.

- Moreno, J.A., Radford, H., Peretti, D., Steinert, J.R., Verity, N., Martin, M.G., Halliday, M., Morgan, J., Dinsdale, D., Ortori, C.A., et al. „Sustained translational repression by eIF2 α -P mediates prion neurodegeneration.“ *Nature* 485 (7399), 2012: 507-511.
- Nakato, H., Tracy, A., Selleck, S.B. „The division abnormally delayed (dally) gene: a putative integral membrane proteoglycan required for cell division patterning during postembryonic development of the nervous system in *Drosophila*.“ *Develop* 121, 1995: 3687–3702.
- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W. „Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.“ *Electrophoresis* 9 (6), 1988: 255-262.
- Nguyen, J.T., Inouye, H., Baldwin, M.A., Fletterick, R.J., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Kirschner, D.A. „X-ray diffraction of scrapie prion rods and PrP peptides.“ *J Mol Biol* 252, 1995: 412–422.
- Nico, P.B., de-Paris, F., et al. „Altered behavioural response to acute stress in mice lacking cellular prion protein.“ *Behav Brain Res* 162 (2), 2005: 173-181.
- Nishida, N., Katamine, S., et al. „Prion protein is necessary for latent learning and long-term memory retention.“ *Cell Mol Neurobiol* 17 (5), 1997: 537-545.
- Nishimura, T., Sakudo, A., Nakamura, I., Lee, D.C., Taniuchi, Y., Saeki, K., Matsumoto, Y., Ogawa, M., Sakaguchi, S., Itoharu, S., Onodera, T. „Cellular prion protein regulates intracellular hydrogen peroxide level and prevents copper-induced apoptosis.“ *Biochem Biophys Res Commun* 323, 2004: 218-222.
- Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., McKinley, M.P., Kent, S.B.H., Aebersold, R., Barry, R.A., Tempst, P., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B., and Weissmann, C. „A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein.“ *Cell* 40, 1985: 735-746.
- Oh, J.M., Shin, H.Y., et al. „The involvement of cellular prion protein in the autophagy pathway in neuronal cells.“ *Mol Cell Neurosci* 39 (2), 2008: 238-247.
- Pamplona, R., Naudi, A., Gavin, R., Pastrana, M.A., Sajani, G., Ilieva, E.V., Del Rio, J.A., Portero-Otin, M., Ferrer, I., Requena, J.R. „Increased oxidation, glycooxidation, and lipoxidation of brain proteins in prion disease.“ *Free Radic Biol Med* 45, 2008: 1159-1166.
- Pardridge, W.M. „Drug and gene targeting to the brain with molecular trojan horses.“ *Nature Rev* 1 (2), 2002: 131-139.
- Pattison, D.I., Davies, M.J. „Actions of ultraviolet light on cellular structures.“ *EXS* 96, 2006: 131–157.
- Pattison, D.I., Rahmanto, A.S., Davies, M.J. „Photo-oxidation of proteins.“ *Photochem Photobiol Sci* 11 (1), 2012: 38-53.
- Pauly, P.C., Harris, D.A. „Copper stimulates endocytosis of the prion protein.“ *J Biol Chem* 273 (50), 1998: 33107 - 33110.
- Pecora, R. (Ed.). „Dynamic Light Scattering – Applications of Photon Correlation Spectroscopy.“ *Plenum Press New York & London*, 1985.
- Peles, E., Nativ, M., Lustig, M., Grumet, M., Schilling, J., Martinez, R., Plowman, G.D., Schlessinger, J. „Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor

- with multiple domains implicated in protein-protein interactions.“ *EMBO J* 16, 1997: 978-988.
- Perera, W.S., Hooper, N.M. „Ablation of the metal ion-induced endocytosis of the prion protein by disease-associated mutation of the octarepeat region.“ *Curr Biol* 11 (7), 2001: 519-523.
- Pérez, D.R., Damberger, F.F., Wüthrich, K. „Horse Prion Protein NMR Structure and Comparisons with Related Variants of the Mouse Prion Protein.“ *J Mol Biol* 400 (2), 2010: 121-128.
- Perez-Pineiro, R., Bjorndahl, T.C., Berjanskii, M.V., Hau, D., Li, L., Huang, A., Lee, R., Gibbs, E., Ladner, C., Dong, Y.W., Abera, A., Cashman, N.R., Wishart, D.S. „The prion protein binds thiamine.“ *Febs J* 278, 2011: 4002-4014.
- Pert, C.B., Pert, A., Chang J.-K., Fong, B.T.W. „[D- Ala²]-Met-Enkephalinamide: A potent long lasting synthetic pentapeptide analgesic.“ *Science* 194 , 1976: 330-332.
- Pflanz, H., Vana, K., Mitteregger, G., Pace, C., Messow, D., Sedlacek, C., Nikles, D., Kretzschmar, H.A., Weiss, S.F. „Microinjection of lentiviral vectors expressing small interfering RNAs directed against laminin receptor precursor mRNA prolongs the pre-clinical phase in scrapie-infected mice.“ *J Gen Virol* 90, 2009: 269-274.
- Phan, J., Zdanov, A., Evdokimov, A.G., Tropea, J.E., Peters, H.P.K., Kapust, R.B., Li, M., Wlodawer, A., Waugh, D.S. „Structural basis for the substrate specificity of tobacco etch virus protease.“ *J Biol Chem* 277, 2002: 50564-50572.
- Pocchiari, M., Schmittinger, S., Masullo, C. „Amphotericin B delays the incubation period of scrapie in intracerebrally inoculated hamsters.“ *J Gen Virol* 68, 1987: 219-223.
- Priola, S.A., Raines, A., Caughey, W.S. „Porphyrin and phthalocyanine antiscrapie compounds.“ *Science* 287, 2000: 1503 – 1506.
- Prusiner, S.B. „Prions.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 1998: 13363-13383.
- „Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.“ *Science* 216 (4542), 1982: 136-144.
- „Molecular biology of prion diseases.“ *Science* 252, 1991: 1515-1522.
- Prusiner, S.B., Scott, M.R., DeArmond, S.J., Cohen, F.E. „ Prion protein biology.“ *Cell* 93, 1998: 337–348.
- Pushie, M.J., Rauk, A., Jirik, F.R., Voge, H.J. „Can copper binding to the prion protein generate a misfolded form of the protein?“ *BioMetals* 22, 2009: 159-175.
- Qian, Z., Gilbert, M.E., Colicos, M.A., Kandel, E.R., Kuhl, D. „Tissue-plasminogen activator is induced as an immediate-early gene during seizure, kindling and long-term potentiation.“ *Nature* 361, 1993: 453–457.
- Qin, K., Yang, Y., Mastrangelo, P., Westaway, D. „Mapping Cu(II) binding sites in prion proteins by diethyl pyrocarbonate modification and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometric footprinting.“ *J Biol Chem* 277 (3), 2002: 1981-1990.
- Quattrocchi, C.C., Wannenes, F., Persico, A.M., Ciafre, S.A., D’Arcangelo, G., Farace, M.G., Keller, F. „Reelin is a serine protease of the extracellular matrix.“ *J Biol Chem* 277, 2002: 303–309.

- Redecke, L., Binder, S., Elmallah, M.I., Broadbent, R., Tilkorn, C., Schulz, B., May, P., Goos, A., Eich, A., Rubhausen, M., Betzel, C. „UV light induced conversion and aggregation of prion proteins.“ *Free Radic Biol Med* 46, 2009: 1353-1361.
- Redecke, L., von Bergen, M., Clos, J., Konarev, P.V., Svergun, D.I., Fittschen, U.E., Broekart, J.A., Bruns, O., Georgieva, D., Mandelkow, E., Genov, N., Betzel, C. „Structural characterization of beta-sheeted oligomers formed on the pathway of oxidative prion protein aggregation *in vitro*.“ *J Struct Biol* 157, 2006: 308-320.
- Rehders, D., Claasen, B., Redecke, L., Buschke, A., Reibe, C., Jehmlich, N., von Bergen, M., Betzel, C., Meyer, B. „Peptide NMHRYPNQ of the Cellular Prion Protein (PrP^C) Inhibits Aggregation and Is a Potential Key for Understanding Prion-Prion Interactions.“ *J Mol Biol* 392, 2009: 198–207.
- Requena, J.R., Dimitrova, M.N., Legname, G., Teijeira, S., Prusiner, S.B., Levine, R.I. „Oxidation of methionine residues in the prion protein by hydrogen peroxide.“ *Arch Biochem Biophys* 432, 2004: 188-195.
- Requena, J.R., Groth, D., Legname, G., Stadtman, E.R., Prusiner, S.B., Levine, R.L. „Copper-Catalyzed Oxidation of the Recombinant SHa(29-231) Prion Protein.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (13), 2001: 7170-7175.
- Requena, J.R., Wille, H. „The structure of the infectious prion protein.“ *Prion* 8, 2014: 60–66.
- Resenberger, U.K., Harmeier, A., Woerner, A.C., Goodman, J.L., Müller, V., Krishnan, R., Vabulas, R.M., Kretzschmar, H.A., Lindquist, S., Hartl, F.U., Multhaup, G., Winklhofer, K.F., Tatzelt, J. „The cellular prion protein mediates neurotoxic signalling of β -sheet-rich conformers independent of prion replication.“ *EMBO J* 30 (10), 2011: 2057-2070.
- Reynaud, E. „Protein Misfolding and Degenerative Diseases.“ *Nature Educ* 3 (9), 2010: 28-30.
- Riesner, D. „Biochemistry and structure of PrP^C and PrP^{Sc}.“ *British Med Bull* 66 (1), 2003: 21-33.
- Roemer, D., Beuscher, H.H., Hill, R.C., Hess, J., Bauer, W., Cardinaux, F., Closse, A., Hauser, D., Huguenin, R. „A synthetic enkephalin analogue with prolonged parenteral and oral analgesic activity.“ *Nature* 268, 1977: 547-549.
- Rudd, P.M., Endo, T., Colominas, C., Groth, D., Wheeler, S.F., Harvey, D.J., Wormald, M.R., Serban, H., Prusiner, S.B., Kobata, A., Dwek, R.A. „Glycosylation differences between the normal and pathogenic prion protein isoforms.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1999: 13044–13049.
- Ryou, C., Prusiner, S.B., Legname, G. „Cooperative binding of dominant-negative prion protein to kringle domains.“ *J Mol Biol* 329, 2003: 323–333.
- Safar, J., Wille, H., Itri, V., Groth, D., Serban, H., Torchia, M., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. „Eight prion strains have PrP^{Sc} molecules with different conformations.“ *Nat Med* 4, 1998: 1157–1165.
- Sarkar, S., Rubinsztein, D.C. „Small molecule enhancers of autophagy for neurodegenerative diseases.“ *Mol Biosyst* 4, 2008: 895-901.
- Sasaki, K., Gaikwad, J., Hashiguchi, S., Kubota, T., Sugimura, K., Kremer, W., Kalbitzer, H.R., Akasaka, K. „Reversible monomer-oligomer transition in human prion protein.“ *Prion* 2, 2008: 118-122 .

- Schägger, H., Cramer, W.A., von Jagow, G. „Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis.“ *Anal Biochem* 217, 1994: 220–230.
- Schägger, H., von Jagow, G. „Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form.“ *Anal Biochem* 199, 1991: 223–231.
- Schätzl, H.M., Da Costa, M., Taylor, L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. „Prion protein gene variation among primates.“ *J Mol Biol* 245, 1995: 362–374.
- Schneider, B., Pietri, M., Pradines, E., Loubet, D., Launay, J.M., Kellermann, O., Mouillet-Richard, S. „Understanding the neurospecificity of Prion protein signaling.“ *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 2011: 169-186.
- Schönherr, R., Klinge, M., Rudolph, J.M., Fita, K., Rehders, D., Lübber, F., Schneegans, S., Majoul, I.V., Duszenko, M., Betzel, C., Brandariz-Núñez, A., Martínez-Costas, J., Duden, R., Redecke, L. „Real-time investigation of dynamic protein crystallization in living cells.“ *Struct Dyn* 2, 2015: 041712.
- Sedmak, J.J., Grossberg, S.E. „A Rapid, Sensitive, and Versatile Assay for Protein Using Coomassie Brilliant Blue G250.“ *Anal Biochem* 79, 1977: 544-552.
- Selkoe, D.J. „Folding proteins in fatal ways.“ *Nature* 426, 2003: 900-904.
- Shapiro, A.L., Viñuela, E., Maizel, J.V. Jr. „Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.“ *Biochem Biophys Res Commun* 28 (5), 1967: 815-820.
- Shimohigashi, Y., Stammer, C.H. „Dehydro-enkephalins III. Synthesis and biological activity of [deltaAla²,Leu⁵]-enkephalin.“ *Int J Peptide Prot Res* 19, 1982: 54-62.
- Silveira, J.R., Raymond, G.J., Hughson, A.G., Race, R.E., Sim, V.L., Hayes, S. F., Caughey, B. „The most infectious prion protein particles.“ *Nature* 437, 2005: 257–261.
- Simoneau S, Rezaei, H., Saleh, N., Kaiser-Schulz, G., Lefebvre-Roque, M., Vidal, C., Fournier, J.G., et al. „In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers.“ *PLoS Pathog* 3, 2007: e125.
- Smirnovas, V., Baron, G.S., Offerdahl, D.K., Raymond, G.J., Caughey, B., Surewicz, W.K. „Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange.“ *Nature Struct Mol Biol* 18 (4), 2011: 504-506.
- Smirnovas, V., Kim, J.I., Lu, X., Atarashi, R., Caughey, B., Surewicz, W.K. „Distinct structures of scrapie prion protein (PrP^{Sc})-seeded versus spontaneous recombinant prion protein fibrils revealed by hydrogen/deuterium exchange.“ *J Biol Chem* 284, 2009: 24233-24241.
- Smith, P.G., Bradley, R. „Bovine spongiform encephalopathy (BSE) and its epidemiology.“ *British Med Bull* 66 (1), 2003: 185-198.
- Sonati, T., Reimann, R.R., Falsig, J., Baral, P.K., O'Connor, T., Hornemann, S., Yaganoglu, S., Li, B., Herrmann, U.S., Wieland, B., Swayampakula, M., Rahman, M.H., Das, D., Kav, N., Riek, R., Liberski, P.P., James, M.N., Aguzzi, A. „The toxicity of anti-prion antibodies is mediated by the flexible tail of the prion protein.“ *Nature* 501, 2013: 102-106.
- Spielhauer, C., Schätzl, H.M. „PrP^C directly interacts with involved in signaling pathways.“ *J Biol Chem* 276 (48), 2001: 44604-44612.

- Spudich, A., Frigg, R., Kilic, E., Kilic, U., Oesch, B., et al. „Aggravation of ischemic brain injury by prion protein deficiency: Role of ERK-1/-2 and STAT-1.“ *Neurobiol Dis* 20, 2005: 442-449.
- Stadtman, E.R. „Protein oxidation and aging.“ *Science* (257), 1992: 1220–1224.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Hsiao, K., Prusiner, S.B. „Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid.“ *Cell* 51, 1987: 229–240.
- Stahl, N., Borchelt, D.R., Prusiner, S.B. „Differential release of cellular and scrapie prion proteins from cellular membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C.“ *Biochem* 29, 1990: 5405-5412.
- Stahl, N., Prusiner, S.B. „Prions and prion proteins.“ *FASEB J* 5, 1991: 2799–2807.
- Steele, A.D., Emsley, J.G., Ozdinler, P.H., Lindquist, S., Macklis, J.D. „Prion protein (PrP^C) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2006: 3416-3421.
- Sulkowski, E. „Spontaneous conversion of PrP^C to PrP^{Sc}.“ *FEBS Lett* 307, 1992: 129–130.
- Svergun, D.I. „Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing.“ *Biophys J* 76 (6), 1999: 2879-86.
- . „Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria.“ *J Appl Cryst* 25 (4), 1992: 495-503.
- Taraboulos, A., Scott, M., Semenov, A., Avraham, D., Laszlo, L., Prusiner, S.B. „Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform.“ *J Cell Biol* 129, 1995: 121-132.
- Tattum, M.H., Cohen-Krausz, S., Thumanu, K., Wharton, C.W., Khalili-Shirazi, A., Jackson, G.S., Orlova, E.V., Collinge, J., Clarke, A.R., Thumanu, K., et al. „Elongated oligomers assemble into mammalian PrP amyloid fibrils.“ *J Mol Biol* 357, 2006: 975–985.
- Thakur, A.B., Rao, C.M. „UV-Light Exposed Prion Protein Fails to Form Amyloid Fibrils.“ *PLoS ONE* 3, 2008: e2688.
- Tilly, G., Chapuis, J., Vilette, D., Laude, H., Vilotte, J.L. „Efficient and specific down-regulation of prion protein expression by RNAi.“ *Biochem Biophys Res Commun* 305, 2003: 548-551.
- Tobler, I., Gaus, S.E., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., et al. „Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein.“ *Nature* 380, 1996: 639-642.
- Trevitt, C.R., Collinge, J. „A systematic review of prion therapeutics in experimental models.“ *Brain* 129, 2006: 2241-2265.
- Trevitt, C.R., Hosszu, L.L.P., Batchelor, M., Panico, S., Terry, C., Nicol, A.J., Risse, E., Taylor, W.A., Sandberg, M.K., Al-Doujaily, H., Linehan, J.M., Saibil, H.R., Scott, D.J., Collinge, J., Waltho, J.P., Clarke, A.R. „N-terminal Domain of Prion Protein Directs Its Oligomeric Association.“ *J Biol Chem* 289, 2014: 25497-25508.
- Tsirka, S.E., Gualandris, A., Amaral, D.G., Strickland, S. „Excito-toxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator.“ *Nature* 377, 1995: 340–344.
- Tsirka, S.E., Rogove, A.D., Strickland, S. „Neuronal cell death and tPA.“ *Nature* 384, 1996: 123–124.
- Tsuboi, Y., Doh-Ura, K., Yamada, T. „Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: clinical trial against prion diseases.“ *Neuropathol* 29, 2009: 632-636.

- Tugyi, R., Mezö, G., Fellingner, E., Andreu, D., Hudecz, F. „The effect of cyclization on the enzymatic degradation of herpes simplex virus glycoprotein D derived epitope peptide.“ *J Peptide Sci* 11, 2005: 642- 649.
- Turk, E., Teplow, D.B., Hood, L.E., Prusiner, S.B. „Purification and properties of the cellular and scrapie hamster prion proteins.“ *Eur J Biochem* 176, 1988: 21–30.
- Udenfriend, S., Kodukula, K. „How glycosylphosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made.“ *Annu Rev Biochem* 64, 1995: 563-591.
- Vana, K., Zuber, C., Pflanz, H., Kolodziejczak, D., Zemora, G., Bergmann, A.K., Weiss, S. „LRP/LR as an alternative promising target in therapy of prion diseases, Alzheimer’s disease and cancer.“ *Infect Disord Drug Targets* 9, 2009: 69-80.
- Vázquez-Fernández, E., Alonso, J., Pastrana, M.A., Ramos, A., Stitz, L., Vidal, E., Dynin, I., Petsch, B., Silva, C.J., Requena, J.R. „Structural organization of mammalian prions as probed by limited proteolysis.“ *PLoS One* 7, 2012: e50111.
- Vendrely, C., Valadie, H., Bednarova, L., Cardin, L., Padeloup, M., Cappadoro, J., Bednar, J., Rinaudo, M., Jamin, M. „Assembly of the full-length recombinant mouse prion protein I. Formation of soluble oligomers.“ *Biochim Biophys Acta* 1724 (3), 2005: 355-366.
- Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E., Dyson, H.J. „Copper binding to the prion protein: Structural implications of four identical cooperative binding sites.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1999: 2042-2047.
- Viles, J.H., Klewpatinond, M., Nadal, R.C. „Copper and the structural biology of the prion protein.“ *Biochem Soc Trans* 36, 2008: 1288–1292.
- Vilette, D. „Cell models of prion infection.“ *Vet Res* 39, 2008: 10.
- Wagner, J., Ryazanov, S., Leonov, A., Levin, J., Shi, S., Schmidt, F., Prix, C., Pan-Montojo, F., Bertsch, U., Mitteregger-Kretzschmar, G., Geissen, M., Eiden, M., Leidel, F., Hirschberger, T., Deeg, A.A., Krauth, J.J., Zinth, W., Tavan, P., et al. „Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson’s disease.“ *Acta Neuropathol* 125, 2013: 795–813.
- Walter, E.D., Stevens, D.J., Visconte, M.P., Millhause, G.L. „The Prion Protein is a Combined Zinc and Copper Binding Protein: Zn²⁺ Alters the Distribution of Cu²⁺ Coordination Modes.“ *J Am Chem Soc* 129, 2007: 15440-15441.
- Watarai, M., Kim, S., Erdenebaatar, J., Makino, S., Horiuchi, M., et al. „Cellular prion protein promotes Brucella infection into macrophages.“ *J Exp Med* 198, 2003: 5-17.
- Wells, G.A.H., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., Bradley, R. „A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle.“ *Vet Rec* 121, 1987: 419-420.
- Wen, Y., Li, J., Xiong, M., Peng, Y., Yao, W., Hong, J., Lin, D. „Solution structure and dynamics of the I214V mutant of the rabbit prion protein.“ *PLoS ONE* 5, 2010: e13273.
- Wernimont, A., Edwards, A. „In situ proteolysis to generate crystals for structure determination: an update.“ *PLoS One* 4, 2009: e5094.
- Westergard, L., Christensen, H.M., Harris, D.A. „The cellular prion protein (PrP^C): Its physiological function and role in disease.“ *Biochim Biophys Acta* 1772, 2007: 629-644.
- White, A.R., Enever, P., Tayebi, M., Mushens, R., Linehan, J., Brandner, S., Anstee, D., Collinge, J., Hawke, S. „Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease.“ *Nature* 422, 2003: 80-83.

- Wilesmith, J.W., Ryan, J.M.B., Atkinson, M.J. „Bovine spongiform encephalopathy: Epidemiological studies on the origin.“ *Vet Rec* 128, 1991: 199-203.
- Wilesmith, J.W., Wells, G.A.H., Cranwell, M.P., Ryan, J.M.B. „Bovine spongiform encephalopathy: Epidemiological studies.“ *Vet Rec* 123, 1988: 638-644.
- Wille, H., Bian, W., McDonald, M., Kendall, A., Colby, D.W., Bloch, L., Ollesch, J., Borovinskiy, A.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., et al. „Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 2009: 16990-6995.
- Wille, H., Michelitsch, M.D., Guenebaut, V., Supattapone, S., Serban, A., Cohen, F.E., Agard, D.A., Prusiner, S.B. „Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 2002: 3563–3568.
- Williams, E.S., Young, S. „Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy.“ *J Wildlife Diseases* 16, 1980: 89-98.
- Winklhofer, K.F., Tatzelt, J. „Cationic lipopolyamines induce degradation of PrP Sc in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells.“ *J Biol Chem* 381, 2000: 463–469.
- Wittig, I., Braun, H.P., Schägger, H. „Blue native PAGE.“ *Nat Protoc* 1 (1), 2006: 418–428.
- Wittig, I., Schägger, H. „Advantages and limitations of clear-native PAGE.“ *Proteomics* 5 (17), 2005: 4338–4346.
- Wobruschek, P. „Use of total reflection X-ray fluorescence analysis in the life sciences.“ *Biol Trace Elem Res* 43-45, 1994: 65-71.
- Wopfner, F., Weidenhöfer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T.F., Werner, T., Schätzl, H.M. „Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein.“ *J Mol Biol* 289, 1999: 1163–1178.
- Wu, D., Zhang, W., Luo, Q., Luo, K., Huang, L., Wang, W., Huang, T. „Copper(II) promotes the formation of soluble neurotoxic PrP oligomers in acidic environment.“ *J Cell Biochem* 111, 2010: 627–633.
- Wüthrich, K., Riek, R. „Three-Dimensional Structures of Prion Proteins.“ *Adv Prot Chem* 57, 2001: 55-82.
- www.qiagen.com. „The QIAexpressionist - A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins.“ 03 2001: Fifth Edition.
- Xanthopoulos, K., Paspaltsis, I., Apostolidou, V., Petrakis, S., Siao, C.J., Kalpatsanidis, A., Grigoriadis, N., Tsaftaris, A., Tsirka, S.E., Sklaviadis, T. „Tissue plasminogen activator in brain tissues infected with transmissible spongiform encephalopathies.“ *Neurobiol Disease* 20, 2005: 519–527.
- Xi, Y.G., Ingrassio, L., Ladogana, A., Masullo, C., Pocchiari, M. „Amphotericin B treatment dissociates *in vivo* replication of the scrapie agent from PrP accumulation.“ *Nature* 356, 1992: 598- 601.
- Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E.G., Bugge, T.H., Strickland, D.K., Lawrence, D.A. „Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood–brain barrier via the LDL receptor-related protein.“ *J Clin Invest* 112, 2003: 1533–1540.
- Yepes, M., Sandkvist, M., Wong, M.K., Coleman, T.A., Smith, E., Cohan, S.L., Lawrence, D.A. „Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis.“ *Blood* 96, 2000: 569–576.

- Younan, N.D., Nadal, R.C., Davies, P., Brown, D.R., Viles, J.H. „Methionine Oxidation Perturbs the Structural Core of the Prion Protein and Suggests a Generic Misfolding Pathway.“ *J Biol Chem* 287, 2012: 28263-28275.
- Young, A.T. „Rayleigh scattering.“ *Appl Opt* 20, 1981: 522–535.
- Yuan, J., Xiao, X., McGeehan, J., Dong, Z., Cali, I., Fujioka, H., Kong, Q., Kneale, G., Gambetti, P., Zou, W.Q. „Insoluble aggregates and protease-resistant conformers of prion protein in uninfected human brains.“ *J Biol Chem* 281, 2006: 34848–34858.
- Yun, S.W., Gerlach, M., Riederer, P., Klein, M.A. „Oxidative stress in the brain at early preclinical stages of mouse scrapie.“ *Exp Neurol* 201, 2006: 90–98.
- Zahn, R., Liu, A., Lührs, T., Riek, R., von Schroetter, C., López García, F., Billeter, M., Calzolari, L., Wider, G., Wüthrich, K. „NMR solution structure of the human prion protein.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (1), 2000: 145-150.
- Zhang, C.C., Steele, A.D., Lindquist, S., Lodish, H.F. „Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2006: 2184-2189.
- Zomosa-Signoret, V., Arnaud, J.D., Fontes, P., Alvarez-Martinez, M.T., Liautard, J.P. „Physiological role of the cellular prion protein.“ *Vet Res* 39 (4), 2008: 9.

7. Anhang

7.1. Auflistung der verwendeten Gefahrenstoffe

Die verwendeten Chemikalien sind mit ihrer CAS-Nummer, der GHS-Einstufung, den jeweiligen H- (*Hazard Statements*) und P-Sätzen (*Precautionary Statements*) in Tabelle 34 aufgeführt [GESTIS-Stoffdatenbank, 2015; Sigma-Aldrich-Datenbank, 2015].

Tabelle 34: Verwendete Chemikalien

Substanz	CAS-Nr.	GHS Gefahr	Gefahrenhinweise H-Sätze	Vorsorgehinweise P-Sätze
Acetonitril	75-05-8	GHS02 GHS07	225-302+312+332-319	210-280-305+351+338-403+235
Acrylamid	79-06-1	GHS06 GHS08	301-312+332-315-317-319-340-350-361f-372	201-280-301+310-302+352-304+340-305+351+338-308+310-308+313
Agar-Agar	9002-18-0	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Agarose	9012-36-6	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Ameisensäure	64-18-6	GHS02 GHS05	226-290-314	210-280-301+330+331-305+351+338-308+310-310
Ammoniumhydrogencarbonat	1066-33-7	GHS07	302-412	273
Ammoniumpersulfat	7727-54-0	GHS03 GHS07 GHS08	272-302-315-317-319-334-335	220-261-280-302+352-304+341-305+351+338-342+311
Ammoniumsulfat	7783-20-2	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Ampicillin Natriumsalz	69-52-3	GHS08	317-334	261-280-305+351+338-342+311
Arabinose	5328-37-0	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Bisacrylamid	110-26-9	GHS07	302	-
BisTris	6976-37-0	GHS07	315-319-335	261-305+351+338
Bovines Serumalbumin	90604-29-8	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid	7240-90-6	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Bromphenolblau-Natriumsalz	34725-61-6	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Calciumacetat	62-54-4	GHS07	315-319-335	261-305+351+338

Substanz	CAS-Nr.	GHS Gefahr	Gefahrenhinweise H-Sätze	Vorsorgehinweise P-Sätze
Calciumchlorid	10043-52-4	GHS07	319	305+351+338
Chloramphenicol	56-75-7	GHS08	350-361d	201-202-281-308+313-405-501
Coomassie Brilliant Blue G-250	6104-58-1	Kein gefährlicher Stoff nach GHS.		
Coomassie Protein Assay Reagent		GHS02 GHS05 GHS07 GHS08	226-290-302+312+332-314-370	260-280-305+351+338-310
Di-Kaliumhydrogenphosphat	7758-11-4	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Dimethylsulfoxid	67-68-5	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Di-Natriumhydrogenphosphat	7558-79-4	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Dithiothreitol	3483-12-3	GHS07	302-315-319-335	261-305+351+338
EDTA	60-00-4	GHS07	319	305+351+338
Essigsäure	64-19-7	GHS02 GHS05	226-314	280-301+330+331-307+310-305+351+338-310
Ethanol	64-17-5	GHS02	225	210
Ethidiumbromid	1239-45-8	GHS06 GHS08	302-315-319--330-331-335-341	261-281-302+352-304+340-305+351+338-309+310-311
Formaldehyd (37 %)	50-00-0	GHS05 GHS06 GHS08	301+311+331-314-317-335-341-350-370	201-260-280-301+310-303+361+353-304+340-305+351+338-308+311-330-403+233
Gentamicin-Lösung	1405-41-0	GHS08	317-334	261-280-342+311
Glucose	50-99-7	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Glutaraldehyd-Lösung (25 %)	111-30-8	GHS05 GHS07 GHS08 GHS09	302+332-314-317-334-335-410	261-273-280-305+351+338-310
Glutathion red.	70-18-8	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Glutathion oxid.	103239-24-3	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		

Substanz	CAS-Nr.	GHS Gefahr	Gefahrenhinweise H-Sätze	Vorsorgehinweise P-Sätze
Glycerin	56-81-5	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Glycin	56-40-6	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Guanidinium- Hydrochlorid	50-01-1	GHS07	302-315-319	305+351+338-302+352
Harnstoff	57-13-6	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Hefeextrakt	8013-01-2	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Imidazol	288-32-4	GHS05 GHS07 GHS08	302-314-360D	201-280-305+351+338- 310
Iodacetamid	144-48-9	GHS06 GHS08	301-317-334-413	261-280-301+310- 342+311
Isopropanol	67-63-0	GHS02 GHS07	225-319-336	210-233-261- 305+351+338
Isopropyl- β -D-thio- galactopyranosid	367-93-1	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Kaliumacetat	127-08-2	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Kaliumdihydrogen- phosphat	7778-77-0	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Kanamycinsulfat	70560-51- 9	GHS08	360	201-308+313
Kupfer	7440-50-8	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Luminol	521-31-3	GHS07	315-319-335	261-305+351+338
Magnesiumchlorid	7786-30-3	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Magnesiumsulfat	7487-88-9	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Milchpulver	68514-61- 4	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
2-(N-Morpholino) ethansulfonsäure	4432-31-9	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Natriumacetat	127-09-3	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Natriumazid	26628-22- 8	GHS06 GHS09	300+310-410, EUH032	273-280-301+310-330- 302+352-310-309+310- 391-501
Natriumcarbonat	497-19-8	GHS07	319	260-305+351+338
Natriumchlorid	7647-14-5	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		

Substanz	CAS-Nr.	GHS Gefahr	Gefahrenhinweise H-Sätze	Vorsorgehinweise P-Sätze
Natriumcitrat	6132-04-3	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Natrium- dodecylsulfat	151-21-3	GHS02 GHS05 GHS07	228-302+332-311- 315-318-319-335- 412	210-261-273-280- 302+352-304+340- 305+351+338-309+310
Natriumhydroxid	1310-73-2	GHS05	290-314	280-301+330+331- 303+361+353- 304+340- 305+351+338- 308+310-310
Natriumthiosulfat	7772-98-7	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Ni-NTA-Agarose	990-00-1	GHS02 GHS07 GHS08	226-317-350i- 360D-373-412	201-273-280-308+313- 333+313-370+378
Nickelsulfat	10101-97- 0	GHS07 GHS08 GHS09	302+332-315-317- 334-341-350i- 360D-372-410	201-261-273-280-284- 304+340-302+352- 308+313-312
OptiPrep™	92339-11- 2	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
<i>p</i> - Aminobenzamidin- Zelite		GHS07	319-335	261-305+351+338
Paraffinöl	8012-95-1	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
<i>para</i> -Hydroxy- coumarinsäure	501-98-4	GHS07	315-319-335	261-305+351+338
Phenylmethan- sulfonylfluorid	329-98-6	GHS05 GHS06	301-314	280-301+310+330- 303+361+353-310- 304+340-305+351+338
Polyethylenglycol 300	25322-68- 3	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Salzsäure	7647-01-0	GHS05 GHS07	290-314-335	234-260-261-280- 303+361+353- 304+340-305+351+338 -309+311-310-501
Serva Blau R		GHS02	225	210
Silbernitrat	7761-88-8	GHS03 GHS05 GHS07 GHS09	272-302-314-410	210-220-221-273-280- 301+330+331- 305+351+338- 308+310-310-501
TEMED	110-18-9	GHS02 GHS05 GHS07	225-302-314-332	210-233-280- 301+330+331-310- 305+351+338-309+310
Tetracyclin	60-54-8	GHS07	302	-

Substanz	CAS-Nr.	GHS Gefahr	Gefahrenhinweise H-Sätze	Vorsorgehinweise P-Sätze
Tricin	5704-04-1	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Tris-Base	77-86-1	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Tris-HCl	1185-53-1	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Trypanblau	72-57-1	GHS08	350	201-308+313
Trypsin	9002-07-7	GHS07 GHS08	315-319-334-335	-
Trypton/Pepton	91079-40-2	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Tween-20	9005-64-5	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		
Wasserstoffperoxid (30 %)	7722-84-1	GHS05 GHS07	271-302-314-318-332-335-412	280-301+312-330-305+351+338-310
Zink	7440-66-6	Kein gefährlicher Stoff nach GHS		

Die verwendeten kommerziellen Kristallisationslösungen sind mit ihrem Hersteller, der Gefahrenbezeichnung, den jeweiligen R- (*risk*) und S-Sätzen (*safety*) in Tabelle 35 aufgeführt.

Tabelle 35: Verwendete kommerzielle Kristallisationslösungen

Name	Hersteller	Gefahrenzeichen	Risikosätze	Sicherheitssätze
AmSO4 Suite	Qiagen	T+, N	R10, R25, R26, R45, R46, R60, R61, R48/23/25, R51/53	S45, S53, S61, S36/37.
Classic Suite	Qiagen	T, N	R10, R45, R46, R60, R61, R23/25, R36/37/38, R48/20/22, R51/53	S20, S26, S45, S53, S36/37/39
ComPAS Suite	Qiagen	T	R10, R45, R23/24/25, R36/38, R39/23/24/25, R51/53	S13, S26, S45, S53, S61, S36/37/39
Cryos Suite	Qiagen	T, N	R10, R45, R46, R60, R61, R23/25, R36/37/38, R48/20/22, R51/53	S20, S26, S45, S53, S61, S36/37/39
JCSG+ Suite	Qiagen	T, N	R10, R21, R41, R45, R23/25, R37/38, R51/53	S13, S20, S26, S45, S53, S36/37/39

Name	Hersteller	Gefahrenzeichen	Risikosätze	Sicherheitssätze
Morpheus	Molecular Dimensions	T, N	R10, R45, R46, R60, R61, R63, R23/25, R36/37/38, R48/20/22, R51/53	S20, S26, S45, S53, S61, S36/37/39
PACT premier	Molecular Dimensions	T	R23/25, R52/53	S20, S36, S45, S61

7.1.1. GHS- und Risikosymbole, H- und P-Sätze sowie R- und S-Sätze



Abbildung 51: GHS-Piktogramme der verwendeten Chemikalien (Quelle: <http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/pictograms.html>).

GHS Gefahrenhinweise (H-Sätze)

H225	Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar
H226	Flüssigkeit und Dampf entzündbar
H228	Entzündbarer Feststoff
H271	Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel
H272	Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel
H290	Kann gegenüber Metallen korrosiv sein
H300	Lebensgefahr bei Verschlucken
H301	Giftig bei Verschlucken
H302	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken
H311	Giftig bei Hautkontakt
H312	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt
H314	Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden
H315	Verursacht Hautreizungen
H317	Kann allergische Hautreaktionen verursachen
H318	Verursacht schwere Augenschäden
H319	Verursacht schwere Augenreizung
H330	Lebensgefahr bei Einatmen
H331	Giftig bei Einatmen
H332	Gesundheitsschädlich bei Einatmen
H334	Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen
H335	Kann die Atemwege reizen
H336	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen

H340	Kann genetische Defekte verursachen
H341	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen
H350	Kann Krebs erzeugen
H350i	Kann Krebs bei Einatmen erzeugen
H360	Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen
H360D	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
H361d	Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen
H361f	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen
H370	Schädigt die Organe
H372	Schädigt Hoden, peripheres Nervensystem bei längerer oder wiederholter Exposition durch Verschlucken
H373	Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition
H300+310	Lebensgefahr bei Verschlucken oder Hautkontakt
H301+311+331	Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen
H302+312+332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen
H302+332	Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen
H312+332	Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen
H400	Sehr giftig für Wasserorganismen
H410	Sehr giftig für Wasserorganismen mit langfristiger Wirkung
H412	Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung
H413	Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung
EUH32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase

GHS Vorsorgehinweise (P-Sätze)

P201	Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen
P202	Vor Gebrauch alle Sicherheitshinweise lesen und verstehen
P210	Von Hitze, heißen Oberflächen, Funken, offenen Flammen sowie anderen Zündquellenarten fernhalten - Nicht rauchen
P220	Von Kleidung, brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren
P221	Mischen mit brennbaren Stoffen, Schwermetallverbindungen, Säuren und Laugen unbedingt verhindern
P233	Behälter dicht verschlossen halten
P234	Nur im Originalbehälter aufbewahren
P260	Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen
P261	Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden
P270	Bei Gebrauch nicht essen, trinken oder rauchen
P273	Freisetzung in die Umwelt vermeiden
P280	Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen
P281	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden
P284	Atemschutz tragen
P310	Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
P312	Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen

P330	Mund ausspülen
P391	Verschüttete Mengen aufnehmen
P301+310	Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
P301+312	Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
P301+330+331	Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen
P302+352	Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen
P303+361+353	Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen
P304+340	Bei Einatmen: Die Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert
P304+341	Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert
P305+351+338	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen
P307+310	Bei Exposition: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen. (Keine offizielle P-Satzkombination)
P308+310:	Bei Exposition oder falls betroffen: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
P308+311	Bei Exposition oder falls betroffen: Giftinformationszentrum, Arzt oder ... anrufen
P308+313	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen
P309+310	Bei Exposition oder Unwohlsein: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
P309+311	Bei Exposition oder Unwohlsein: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
P333+313	Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.
P342+311	Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
P370+378	Bei Brand: Trockenen Sand, Lehm, Natriumhydrogencarbonat zum Löschen verwenden
P405	Unter Verschluss aufbewahren
P403+233	Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren
P403+235	Kühl an einem gut belüfteten Ort aufbewahren
P501	Entsorgung des Inhalts/des Behälters gemäß den örtlichen/regionalen/nationalen/internationalen Vorschriften.

Gefahrensymbole

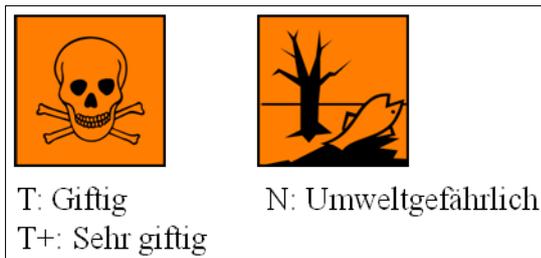


Abbildung 52: Gefahrensymbole, Kennbuchstabe und entsprechende Gefahrenbezeichnung der verwendeten Gefahrenstoffe (Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Gefahrensymbol>).

Risikosätze (R-Sätze)

R 10	Entzündlich
R 21	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut
R 25	Giftig beim Verschlucken
R 26	Sehr giftig beim Einatmen
R 41	Gefahr ernster Augenschäden
R 45	Kann Krebs erzeugen
R 46	Kann vererbare Schäden verursachen
R 60	Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
R 61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
R 63	Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen
R 23/25	Giftig beim Einatmen und Verschlucken
R 23/24/25	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut
R 36/38	Reizt die Augen und die Haut
R 36/37/38	Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut
R 37/38	Reizt die Atmungsorgane und die Haut
R 39/23/24/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 48/20/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken
R 48/23/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und durch Verschlucken
R 51/53	Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
R 52/53	Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben

Sicherheitssätze (S-Sätze)

S 13	Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten
S 20	Bei der Arbeit nicht essen und trinken
S 26	Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
S 36	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen

S 45	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
S 53	Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen – Nur für den berufsmäßigen Verwender –
S 61	Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/ Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen
S 36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
S 36/37/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen

7.1.2. Auflistung der verwendeten KMR-Stoffe

In Tabelle 36 sind die verwendeten KMR-Stoffe aufgelistet [GESTIS-Stoffdatenbank, 2015].

Tabelle 36: Verwendete KMR-Stoffe

CAS-Nummer	Substanz	Verfahren und eingesetzte Menge	Kategorie
79-06-1	Acrylamid	SDS-PAGE	K: 1B M: 1B
7786-81-4	Nickel(II)sulfat	Lösung (100mM) zur Regeneration der Ni-NTA-Agarose-Matrix	K: 1A R _E : 1B

8. Danksagung

Diese Seite der Arbeit ist all denjenigen gewidmet, die zur Entstehung dieser Doktorarbeit beigetragen haben und ich möchte ihnen an dieser Stelle danken.

Bei Dr. Lars Redecke möchte ich mich sehr herzlich für die Aufnahme in die Nachwuchsgruppe SIAS, die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung der Arbeit, die vielen hilfreichen Tipps bei der Vorbereitung, Durchführung und Auswertung von Experimenten sowie das Korrekturlesen der Arbeit bedanken. Eine stete Diskussionsbereitschaft und die zahlreichen fachlichen Ratschläge haben sehr zum Abschluss der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Ebenfalls herzlich danken möchte ich Prof. Dr. Christian Betzel für die Möglichkeit in seinen Laboren zu arbeiten, die Unterstützung und Begutachtung meiner Arbeit.

Mein herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. Bernd Meyer für die Anfertigung des Zweitgutachtens und den Vorsitz in der Prüfungskommission meiner Disputation.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Markus Fischer für die Begutachtung meiner Disputation.

Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die Unterstützung bei der SPR-Spektroskopie ebenso wie Prof. Dr. Inari Kursula.

Mein Dank geht an Prof. Dr. Melitta Schachner Camartin und Dr. Ralf Kleene für die Bereitstellung der inhibitorischen Peptide.

Ich danke Dr. Alexey Kikhney für die Unterstützung beim Erlernen der SAXS-Daten-Analyse sowie der Arbeitsgruppe von Prof. Hartmut Schlüter für massenspektrometrische Untersuchungen ebenso wie Dr. Maria Trusch.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Berta Puig-Martorell für ihre Hilfe bei der Durchführung der Dichtegradienten-Ultrazentrifugation bedanken.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an alle BTA-Schülerinnen und Schüler, Studentinnen und Studenten, die ich während meiner Arbeit betreuen durfte und die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen Kolleginnen und Kollegen im Labor ein großes Dankeschön für eine aufregende und erheiternde Zusammenarbeit, die ich nicht vergessen werde.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. Samudrala Gourinath für die Gastfreundschaft und Unterstützung während des Aufenthaltes in seinen Laboren.

Vielen Dank an die Graduiertenschule SDI für die zahlreichen Angebote, durch die ich viel lernen konnte.

An dieser Stelle möchte ich Prof. Dr. Michael A. Rübhausen für die Bereitstellung des Läsersystems danken. Dr. Stephan Binder, Arne Goos, Benjamin Lebsanft und Alina Wetzel danke ich für die gute Zusammenarbeit auf dem Gebiet der UV-induzierten Umwandlung und die tolle Zeit während der Messungen.

Ganz besonders möchte ich Dr. Raphael Eberle (Laborehemann), Dr. Julia Drebes, Dr. Dirk Rehders, Svetlana Kapis, Theresa Nuguid, Kalli und der Kleenen für angeregte Diskussionen über den ganz normalen Wahnsinn im Labor, den Arbeitsalltag und das laborfreie Leben sowie für die tolle Zeit außerhalb des Labors bedanken.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die fortwährende Unterstützung und die aufmunternden Worte. Mein besonderer Dank gilt meinem Mann für seine immerwährende Unterstützung, seiner stetigen Motivation und Geduld während dieser Zeit. Außerdem danke ich meiner Tochter Stella dafür, dass sie so ein unproblematisches, liebes Baby/Kleinkind war/ist und mir dadurch die Möglichkeit gegeben hat diese Arbeit fertigzustellen.

9. Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

10. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben.

Ferner versichere ich, dass ich weder Promotionsversuche an anderen Universitäten unternommen habe noch diese Dissertation in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Hamburg, 19.06.2015

(Anne Sommer)