

**NMR-spektroskopische Untersuchungen des
nicht-nativen Zustands der C-terminalen
Domäne des Prionenproteins
aus Mensch und Maus**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim
Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Christian Gerum
aus Hanau

Frankfurt 2009

(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Dieter Steinhilber

Gutachter: Prof. Dr. Harald Schwalbe und Prof. Dr. Volker Dötsch

Datum der Disputation: 20.05.2010

Das Glück des Forschers besteht nicht darin, eine Wahrheit zu besitzen, sondern die Wahrheit zu erringen. [...]

Denn ein rechtlicher Anspruch auf Glück, Erfolg und Wohlergehen im Leben ist Niemandem von uns in die Wiege gelegt worden. Darum müssen wir eine jede freundliche Fügung des Schicksals, eine jede froh verlebte Stunde als ein unverdientes, ja als ein verpflichtendes Geschenk entgegen nehmen.

- Max Planck -

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
Vorwort.....	XVI
1. Einleitung.....	1
1.1. PROTEINFALTUNG UND NICHT-NATIVE ZUSTÄNDE VON PROTEINEN	1
1.2. GRUNDLAGEN DER KERNSPINRESONANZSPEKTROSKOPIE (NMR)	5
1.2.1. Überblick.....	5
1.2.2. Verwendete NMR-Parameter	5
1.2.2.1. Sekundäre chemische Verschiebungen.....	6
1.2.2.2. Heteronukleare Relaxation	8
1.3. GRUNDLAGEN DES CIRCULARDICHROISMUS	11
1.4. GRUNDLAGEN DER FLUORESZENZSPEKTROSKOPIE	15
1.5. PRIONEN	18
1.5.1. Historisches oder eine kurze Geschichte des Prions.....	18
1.5.2. Aktueller Stand der Forschung.....	21
1.5.2.1. Das zelluläre Prionenprotein (PrP ^C)	21
1.5.2.2. Die „protein-only“-Hypothese und Konversionsmodelle	24
1.5.2.3. Strukturmodelle von PrP ^{Sc}	26
1.6. MOTIVATION UND ZIELE.....	28
2. Experimenteller Teil.....	31
2.1. PLASMIDISOLIERUNG	31
2.1.1. Transformation von TOP10F'-Zellen	31
2.1.2. Isolierung der Plasmide pJC40 _{TEVh} PrP(121–230) und pRSET A mPrP(121–232).....	32
2.1.3. Restriktionsverdau.....	32
2.1.4. Herstellung der mPrP-Mutanten.....	33
2.2. PROTEINEXPRESSION.....	34
2.2.1. Transformation von BL21(DE3)pLysS- und BL21Star TM (DE3)pLysS-Zellen	34
2.2.2. Expression in Normalmedium	35
2.2.3. Expression in isopenangereichertem Medium.....	36
2.3. AUFRÄUFIGUNG DER VERSCHIEDENEN PRIONENPROTEINE	36
2.3.1. Zellaufschluss.....	36
2.3.2. Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC).....	37
2.3.3. Abspaltung des His-tags mittels TEV-Protease	38
2.3.4. Abspaltung des His-tags mittels Thrombin-Protease	38
2.3.5. Gelfiltration.....	39
2.3.6. S-Methylierung der Cysteine	39
2.4. NMR-SPEKTROSKOPIE.....	40
2.4.1. Herstellung der NMR-Proben	40
2.4.2. Aufnahme von zwei- und dreidimensionalen NMR-Spektren	40
2.4.3. Messung von chemischen Verschiebungen.....	41
2.4.4. Messung und Berechnung von Relaxationsraten.....	43

2.4.5. Mathematische Beschreibung der R_2 - und $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten.....	44
2.4.6. Messung und Berechnung von 1H - ^{15}N -NOEs	45
2.5. MESSUNG VON AGGREGATIONSKINETIKEN MITTELS FLUORESCENZSPEKTROSKOPIE.....	46
2.6. CD-SPEKTROSKOPIE	48
2.7. ANALYTIK.....	48
2.7.1. Agarose-Gelelektrophorese.....	48
2.7.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	49
2.7.3. Proteinbestimmung mittels UV-Spektroskopie	49
3. Ergebnisse und Diskussion.....	51
3.1. AUFREINIGUNG DER VERSCHIEDENEN PRIONENPROTEIN-KONSTRUKTE	51
3.2. RESONANZZUORDNUNG DES PROTEINRÜCKGRATS	54
3.3. UNTERSUCHUNG AM HARNSTOFFENTFALTETEN ZUSTAND VON hPrP ^{ox} UND hPrP ^{red}	58
3.3.1. Chemische Verschiebungen.....	58
3.3.2. Relaxationsraten.....	60
3.3.3. ThT-Fluoreszenzassay.....	63
3.3.4. Interpretation der gemessenen Daten	65
3.4. VERGLEICH VON hPrP UND mPrP.....	66
3.4.1. HSQC- und Sequenz-Vergleich	66
3.4.2. Chemische Verschiebungen.....	69
3.4.3. Relaxationsraten.....	72
3.4.4. ThT-Fluoreszenzassay.....	75
3.5. AGGREGATIONSKINETIKEN AN <i>mut</i> -mPrP ^{ox}	76
4. Zusammenfassung.....	79
5. Anhang	82
5.1. MATERIAL.....	82
5.1.1. Bakterienstämme	82
5.1.2. Enzyme	83
5.1.3. Chemikalien.....	83
5.1.4. Kits	85
5.1.5. Längen- und Molekulargewichtstandards	85
5.1.6. Geräte und sonstige Materialien	85
5.2. PRIMÄRSEQUENZEN	87
5.2.1. ^{His} hPrP(121–230) und hPrP(121–230).....	87
5.2.2. ^{His} wt-mPrP(121–232) und wt-mPrP(121–232).....	87
5.3. PLASMIDE	87
5.4. PRIMER-SEQUENZEN	88
5.5. PUFFER UND LÖSUNGEN	89
5.5.1. Agarose Gelelektrophorese	89
5.5.2. Puffer für Restriktionsverdau und PCR.....	89
5.5.3. SDS-PAGE nach Laemmli.....	90
5.5.4. Puffer zur Aufreinigung über IMAC.....	91
5.5.5. Puffer zur Aufreinigung über Gelfiltration.....	91
5.5.6. Puffer für ThT-Fluoreszenzassay	92
5.5.7. Antibiotika-Stammlösungen.....	92
5.5.8. Minimalmedien.....	92
5.6. SOFTWARE	93
5.7. NMR-AKQUISITIONS- UND PROZESSIERUNGSPARAMETER.....	94
6. Literaturangaben.....	98

Danksagung	116
Publikationsliste	117
Lebenslauf	118

Abbildungsverzeichnis

1.1	Zentrales Dogma der Molekularbiologie	2
1.2	Konformationelle Zustände und Faltungswege von Proteinen	3
1.3	Zwei- und dreidimensionale Faltungstrichter	4
1.4	[¹ H, ¹⁵ N]-HSQC-Spektrum von nativem und denaturiertem hPrP(121–230)	7
1.5	Zeitskala für molekulare Bewegungen und verschiedene NMR-Techniken.....	8
1.6	Vektordarstellung zur Beschreibung von ORD und CD	12
1.7	CD-Spektren von Modellpeptiden	14
1.8	Jablonski-Diagramm eines Fluorophors	15
1.9	Historische Daten bei der Erforschung von TSEs.....	19
1.10	Fallzahlen der BSE-, CJD- und vCJD-Neuerkrankungen in Großbritannien.....	20
1.11	Strukturelle Merkmale und biochemische Eigenschaften des PrP ^C	23
1.12	Modelle für die Konversion von PrP ^C zu PrP ^{Sc}	25
1.13	Strukturmodelle von PrP ^{Sc}	27
2.1	Plasmidkarte der Vektoren pJC40 _{TEV} und pRSET A	31
2.2	PCR-Zyklus	34
2.3	Plasmidkarte des Vektors pLysS.....	35
2.4	Magnetisierungstransfer für die verwendeten 3D-NMR-Experimente	41
2.5	Bestimmung von R ₁ -, R ₂ - und R _{1ρ} -Relaxationsraten	43
2.6	Chemische Struktur von Thioflavin T	47
3.1	SDS-Gel über den Aufreinigungserfolg des Prionenproteins	51
3.2	Chromatogramm der immobilisierten Metallchelate-Affinitätsäule	52
3.3	Chromatogramm der Gelfiltrationssäule.....	53
3.4	Auszug aus der sequentiellen Resonanzzuordnung	55
3.5	[¹ H, ¹⁵ N]-HSQC-Spektrum von hPrP ^{ox} und hPrP ^{red}	56
3.6	CD-Spektren von hPrP ^{ox} unter verschiedenen Bedingungen	57
3.7	Zusammenfassung der chemischen Verschiebungsparameter für hPrP ^{ox} und hPrP ^{red}	59
3.8	R ₂ - und R _{1ρ} -Relaxationsraten für hPrP ^{ox} und hPrP ^{red}	61
3.9	Heteronukleare Relaxationsraten für hPrP ^{ox} und hPrP ^{red}	62
3.10	ThT-Aggregationskinetiken für hPrP ^{ox} und hPrP ^{red}	63
3.11	t _{1/2} in Abhängigkeit der hPrP ^{ox} -Konzentration.....	64
3.12	[¹ H, ¹⁵ N]-HSQC-Spektrum von mPrP ^{ox} und mPrP ^{red}	67
3.13	PrP-Aminosäurevergleich von verschiedenen Säugetieren.....	68
3.14	Zusammenfassung der chemischen Verschiebungsparameter für mPrP ^{ox} und mPrP ^{red}	71
3.15	R ₂ - und R _{1ρ} -Relaxationsraten für mPrP ^{ox} und mPrP ^{red} und Vergleich zu hPrP ^{ox/red}	73

3.16	Heteronukleare Relaxationsraten für mPrP ^{ox} und mPrP ^{red}	74
3.17	ThT-Aggregationskinetiken für mPrP ^{ox} und mPrP ^{red} und Vergleich zu hPrP ^{ox}	75
3.18	Aufgereinigte Proteinmenge der <i>mut</i> -mPrP ^{ox} -Konstrukte.....	76
3.19	ThT-Aggregationskinetiken der <i>mut</i> -mPrP ^{ox} -Konstrukte	77

Tabellenverzeichnis

2.1	Ansatz für den Restriktionsverdau von hPrP und mPrP.....	33
2.2	Ansatz für die ortsspezifische Mutagenese von mPrP mittels PCR.....	33
5.1	Verwendete Primer für die ortsspezifische Mutagenese	88
5.2	Akquisitions- und Prozessierungsparameter für die Resonanzzuordnung an hPrP ^{ox}	94
5.3	Akquisitions- und Prozessierungsparameter für die Resonanzzuordnung an hPrP ^{red}	95
5.4	Akquisitions- und Prozessierungsparameter für die Resonanzzuordnung an mPrP ^{ox}	96
5.5	Akquisitions- und Prozessierungsparameter für die Resonanzzuordnung an mPrP ^{red}	97

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
²⁸⁰ Abs.	Absorption bei 280 nm
a	Adenin
AABUF	average area buried upon folding
Abb.	Abbildung
Ala, A	Alanin
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
Arg, R	Arginin
Asn, N	Asparagin
Asp, D	Aspartat
A.U.	arbitrary units
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
BSE	bovine spongiforme Encephalopathie
bzw.	beziehungsweise
c	Cytosin
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CARA	computer aided resonance assignment
CC	Geladener Cluster
CD	Circulardichroismus
CHO	Glykosylierungsstelle
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
Cm	Chloramphenicol
Co ²⁺	Cobaltion
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
Cu ²⁺	Kupferion
Cys, C	Cystein
D ₂ O	deutერიertes Wasser

Da	Dalton
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
dt.	deutsch
DTT	Dithiothreitol
EB	Elutionspuffer
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPR	Elektronenspinresonanz
et al	und andere
F	Fluoreszenz
f.	folgende
FeCl ₃	Eisen(III)chlorid
FID	free induction decay
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Guanin
GB	Großbritannien
GdmCl	Guanidiniumhydrochlorid
Gl.	Gleichung
Gln, Q	Glutamin
Glu, E	Glutamat
Gly, G	Glycin
GPI	Glykosyl-phosphatidyl-inositol
GSS	Gerstmann-Sträubler-Scheinker-Syndrom
H ₂ O	Wasser
HC	hydrophobe Domäne
His, H	Histidin
hPrP	humanes Prionenprotein
hPrP ^{ox}	oxidiertes humanes Prionenprotein
hPrP ^{red}	reduziertes humanes Prionenprotein
HSQC	heteronuclear single quantum coherence

IC	interne Konversion
Ile, I	Isoleucin
IMAC	Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
In	Inositol
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
ISC	Intersystem Crossing
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOAc	Kaliumacetat
LB	Luria Broth
Leu, L	Leucin
LMW	low molecular weight
Lys, K	Lysin
MCS	multiple cloning site
Met, M	Methionin
MD	Molekulardynamik
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
Mn ²⁺	Manganion
MNBS	Methyl-4-Nitrobenzolsulfonat
MoO ₄ ²⁻	Molybdat
mPrP	murines Prionenprotein
mPrP ^{ox}	oxidiertes murines Prionenprotein
mPrP ^{red}	reduziertes murines Prionenprotein
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
<i>mut</i>	mutiert
MWCO	molecular weight cut-off
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NCJDSU	The National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat

NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
Ni	Nickel
Ni ²⁺	Nickelion
NMR	Kernmagnetresonanz
NOE	Kern-Overhauser-Effekt
n. s.	nicht spezifiziert
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OIE	The World Organisation for Animal Health
OR	Octarepeat-Region
ORD	optische Rotationsdispersion
P	Phosphat
p. a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	Privatdozent
Ph	Phosphoreszenz
Phe, F	Phenylalanin
PK	Proteinase K
ppm	parts per million
Pro, P	Prolin
Prof.	Professor
PrP	Prionenprotein
PrP ^C	zelluläres Prionenprotein
PrP ^{Int}	teilweise entfaltetes Intermediat des Prionenproteins
PrP ^{Sc}	pathogene Form des Prionenproteins
red.	reduziert
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser, S	Serin
SH	Sulfhydryl
ShaPrP	Hamster-Prionenprotein

S–S	Disulfidbrücke
SSP	secondary structure propensity
t	Thymin
TEV	27 kDa-Domäne des Nuclear Inclusion A Proteins
Thr, T	Threonin
ThT	Thioflavin T
TMSP	Trimethylsilylpropionat
Trp, W	Tryptophan
TSE	transmissible spongiforme Encephalopathie
Tyr, Y	Tyrosin
UV	Ultraviolett
Val, V	Valin
v. Chr.	vor Christus
vCJD	neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
VR	Schwingungsrelaxation
<i>wt</i> , WT	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
Zn ²⁺	Zinkion

Vorwort

Diese Dissertation basiert auf der Arbeit, die in der Gruppe von Prof. Dr. Harald Schwalbe am Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie und am Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main im Zeitraum zwischen Juni 2005 und Dezember 2009 durchgeführt wurde.

In ihr werden Experimente beschrieben, die strukturelle, dynamische und kinetische Eigenschaften der nicht-nativen Zustände der C-terminalen Domänen von humanem und murinem Prionenprotein sowie weiteren Mutanten des murinen Prionenproteins untersuchen und diese Ergebnisse miteinander vergleichen. Die Dissertation ist dabei in vier Hauptkapitel eingeteilt:

Im einleitenden Kapitel 1 (beginnend auf Seite 1) wird zunächst ein Überblick über das Phänomen der Proteinfaltung und über nicht-native Proteinzustände gegeben. Es folgt daraufhin eine Beschreibung der verschiedenen hier verwendeten Methoden (NMR-, CD- und Fluoreszenz-Spektroskopie). Das Kapitel wird beendet mit einem Überblick über das Prionenprotein sowohl in geschichtlicher als auch in aktueller Hinsicht.

Kapitel 2 (beginnend auf Seite 31) fasst die in dieser Arbeit verwendeten Methoden und Experimente zusammen.

In Kapitel 3 (beginnend auf Seite 51) werden die Resultate aus den verschiedenen durchgeführten Experimenten beschrieben und auf dem aktuellen Stand der Forschung diskutiert.

Kapitel 4 (beginnend auf Seite 79) gibt abschließend die Hauptergebnisse dieser Arbeit wieder.

Im Anhang (beginnend auf Seite 82) sind zusätzliche Informationen aufgelistet, die ein flüssiges Lesen der vorherigen Kapitel negativ beeinflussen würden. Die Auflistung der zitierten Publikationen beginnt auf Seite 98. Abschnitte mit einer Danksagung (Seite 116), einer Publikationsliste (Seite 117) und einem Lebenslauf des Autors (Seite 118 f.) beschließen die Dissertation.

1. Einleitung

1.1. Proteinfaltung und nicht-native Zustände von Proteinen

Bei allen Lebensprozessen spielen Proteine eine Hauptrolle, da sie die in den Genen enthaltene Information in zelluläre Abläufe und Strukturen übersetzen. Sie regulieren wichtige Funktionen wie die Genexpression oder katalysieren wichtige Schritte im Stoffwechsel, dienen als Transporter für kleinere Moleküle oder wirken als Rezeptoren oder Botenstoffe bei der Signaltransduktion mit. Als Strukturproteine bilden sie das Gerüst jeder einzelnen Zelle oder stabilisieren den gesamten Organismus. Des Weiteren unterstützen Proteine auch die Muskelkontraktion oder die Fortbewegung von Zellen.

Proteine sind heteropolymere Moleküle, die aus 20 verschiedenen monomeren Einheiten, den Aminosäuren, bestehen. Diese Einheiten sind über die Peptidbindung in der Art miteinander verbunden, dass die Hauptkette des Polymers, das Polypeptidrückgrat, universell und nicht von der Art der verwendeten Aminosäure abhängig ist, wohingegen die Art der verwendeten Aminosäure die spezifische Seitengruppe des jeweiligen Kettenmonomers definiert.

Proteine werden durch ihre Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur charakterisiert: Die Primärstruktur ist als die lineare Abfolge der Aminosäuren entlang der Polypeptidkette festgelegt. Dadurch, dass das Polypeptidrückgrat regulär und sequenzunabhängig aufgebaut ist, wird dem Protein die Möglichkeit gegeben, reguläre konformationelle Elemente wie z. B. α -Helices und β -Faltblätter, aufzubauen. Diese Elemente werden im allgemeinen in dem Begriff der Sekundärstruktur zusammengefasst. Um jedoch die biochemische Funktion wahrnehmen zu können, muss die überwiegende Mehrheit aller Proteine eine komplexe dreidimensionale Struktur annehmen (Tertiärstruktur), die durch den Prozess der Proteinfaltung erreicht werden kann. Weiterhin kann auch die Assemblierung mehrerer Tertiärstrukturen zu einem Proteinkomplex, der Quartärstruktur, für die korrekte Arbeitsweise des einzelnen Proteins notwendig sein. Eine große Herausforderung in der molekularen Biologie ist es, herauszufinden, wie eine Polypeptidkette ihre dreidimensionale und funktionale – also native – Struktur findet. Die Kenntnis über diese „zweite Translation“ des genetischen Codes würde



Abb. 1.1: Übersetzungsweg des genetischen Codes, ausgehend von der Information auf der DNA über Transkription, Translation und Proteinfaltung hin zur nativen Konformation des Proteins.

den Informationsfluss komplettieren, der in dem zentralen Dogma der Molekularbiologie festgelegt ist (Abb. 1.1).

Die Arbeit von Anfinsen und seiner Gruppe über die Rückfaltung der denaturierten und reduzierten Ribonuklease in das vollständig aktive Enzym markierte den Beginn der Ära der modernen Proteinfaltung. Aus seinen Ergebnissen schloss Anfinsen, dass die gesamte Information, die zum Erreichen der nativen Konformation eines Proteins in einer definierten Umgebung notwendig ist, durch die Aminosäuresequenz – also die Primärstruktur – gegeben ist (Anfinsen 1973). Die thermodynamische Kontrolle der Proteinfaltung ist eine Folge des Anfinsen-Postulats, was bedeutet, dass die native Struktur dann erreicht ist, wenn die Freie Enthalpie ΔG ein Minimum eingenommen hat. Diese Aussage wurde von Levinthal hinsichtlich der kurzen Faltungszeiten, die sich – sowohl *in vitro* als auch *in vivo* – im Bereich von Sekunden und Minuten abspielen, diskutiert (Levinthal 1968). Das hinter diesem Levinthal'schen Paradoxon stehende kombinatorische Problem ist, dass die Anzahl der möglichen Faltungen eines Proteins mit der Länge der Aminosäurekette exponentiell ansteigt. Auch wenn jeder Aminosäurerest nur zwei Zustände annehmen könnte, gäbe es bei einer Proteinelänge von n Aminosäuren schon 2^n mögliche Faltungsvarianten. Bei Annahme, dass eine Änderung der Konformation 10^{-13} s benötigt, bräuchte ein Protein mit 150 Aminosäuren im schlechtesten Fall

$$2^{150} \cdot 10^{-13} \text{ s} = 1,4 \cdot 10^{32} \text{ s} = 4,6 \cdot 10^{24} \text{ y}$$

also über 10^{24} Jahre, um die optimale Konformation zu finden. Im Vergleich dazu beträgt das Alter der Erde $4,55 \cdot 10^9$ Jahre. Da Proteine jedoch meist nur eine Halbwertszeit von wenigen Stunden bis Tagen haben und die native Form normalerweise schnell eingenommen wird, muss es Mechanismen geben, die bei der Faltung helfen.

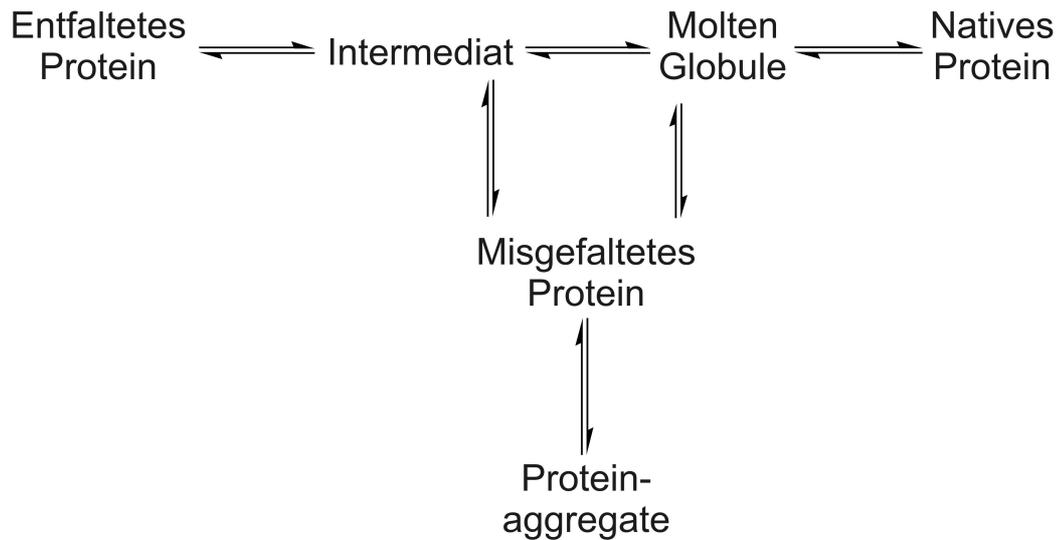


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines Faltungsweges mit einer Seitenreaktion, die zu fehlgefalteten Proteinkonformationen und zu Proteinaggregaten führt.

Ausgehend von einer Vielzahl an experimentellen Studien wurde zunächst ein sequentielles Modell zur Proteinfaltung aufgestellt (Abb. 1.2). Korrekt gefaltete Proteine und durch Nebenreaktionen hervorgerufene falsch gefaltete Proteinkonformationen konkurrieren in diesem Modell miteinander.

Aus theoretischen Studien konnte daraufhin ein neues Modell der Proteinfaltung aufgezeigt werden, das auf der Betrachtung von Energieoberflächen der Polypeptidkette basiert (Wolynes et al 1995). Diese „neue Sichtweise“ beschreibt den Faltungsprozess mit Hilfe von Energielandschaften und Faltungstrichtern und berücksichtigt das thermodynamische und das kinetische Verhalten bei der Umwandlung eines Ensembles von ungefalteten Molekülen in den nativen Zustand.

Basierend auf dieser Sichtweise ist die Proteinfaltung nichts anderes als eine progressive Organisation von Ensembles aus teilweise gefalteten Strukturen, die auf verschiedenen Wegen den nativen Zustand erreichen können (Bryngelson et al 1995; Onuchic et al 2000; Onuchic et al 1995).

Eine hypothetisch angenommene Energielandschaft für die Faltung eines Proteins ist in Abb. 1.3A gezeigt. Lokale Energieminima symbolisieren hier transiente Zustände auf dem Weg zur nativen Struktur. Abb. 1.3B zeigt einen idealisierten dreidimensionalen Faltungstrichter, bei dem der Faltungsprozess sehr schnell über zwei Zustände (entfaltet – nativ) abläuft. Demgegenüber steht in Abb. 1.3C ein Faltungstrichter, der aufgrund von Energiebarrieren kinetische Fallen aufweist. In diesem Fall spielt sich der Faltungsprozess langsamer und über mehrere Zwischenstufen ab.

Sobald die Energiebarrieren groß genug sind, können die Proteine diese Konformation nicht mehr verändern und können – je nach Art des jeweiligen Zustands – aggregieren. Mit Hilfe des Modells der Energielandschaften und Faltungstrichter lassen sich also auf sehr einfache Art und Weise verschiedene Szenarien der Proteinfaltung, Fehlfaltung und Aggregation beschreiben. Beispiele für das Vorhandensein von teilweise gefalteten Intermediaten und parallelen Faltungswegen konnten bereits an verschiedenen Proteinen wie Lysozym aus Hühnereiweiß (Radford et al 1992), Cytochrom c_{551} (Gianni et al 2003) und α -Lactalbumin (Schlepckow et al 2008) nachgewiesen werden.

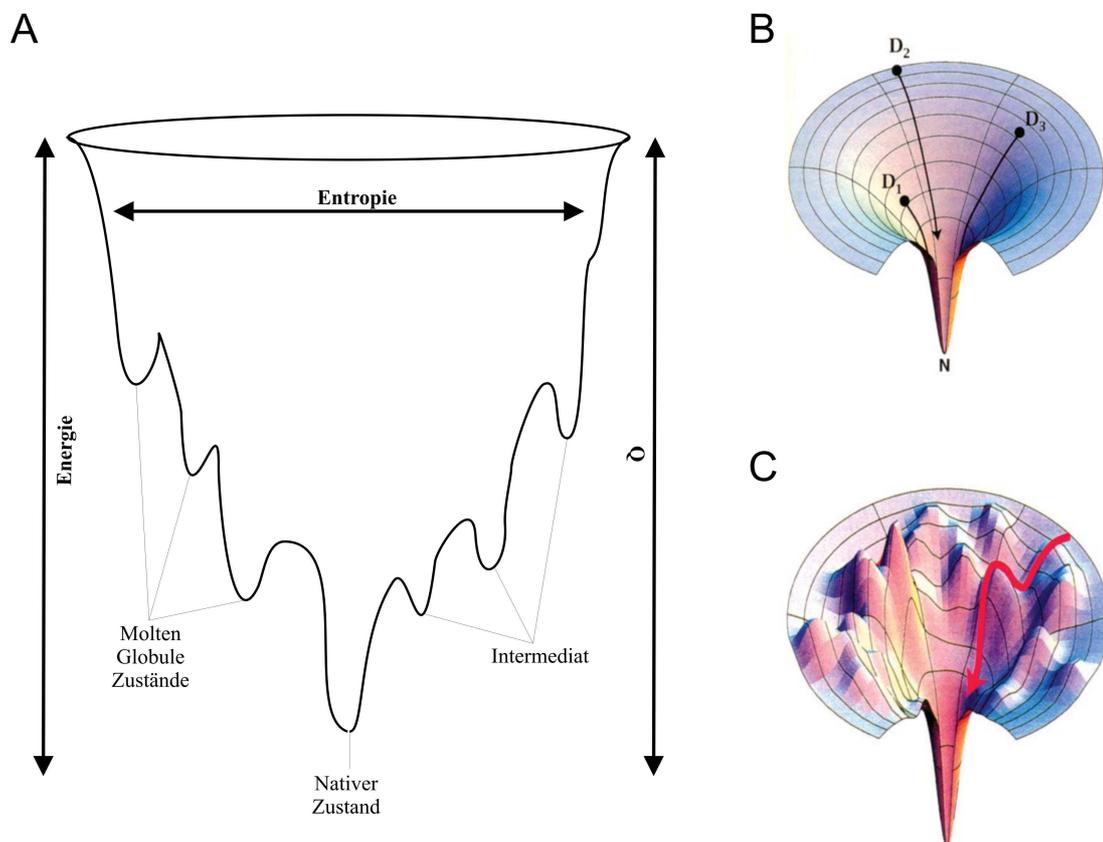


Abb. 1.3: (A) Schematische zweidimensionale Darstellung eines Faltungstrichters. Die Breite des Trichters stellt die Entropie dar, die Höhe die Energie. Q beschreibt den Anteil nativer Kontakte. Weiterhin sind dreidimensionale Darstellungen von Faltungstrichtern gezeigt, zum einen in einem Zwei-Zustands-Prozess (B) zum anderen mit lokalen Minima (C), die die Ausbildung verschiedener Intermediate erzwingen. D_1 - D_3 : denaturierte Zustände; N: nativer Zustand. Verändert nach (Dill & Chan 1997; Yon 2002).

1.2. Grundlagen der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

1.2.1. Überblick

Die magnetische Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) ist eine wichtige Methode, mit der man Strukturen, Dynamiken und Interaktionen von Biomolekülen untersuchen kann. Ein großer Vorteil der NMR-Spektroskopie besteht darin, dass sich die in Lösung befindenden Moleküle auf atomarer Ebene betrachten lassen. Da die NMR-Spektroskopie jedoch zu den relativ unsensitiven Messmethoden zu zählen ist, wurden für Messungen lange Zeit Konzentrationen im mM-Bereich benötigt. Durch die Entwicklung von Cryo-Probenköpfen und Magneten mit höherer Feldstärke sind heutzutage auch Experimente im mittleren und hohen μM -Bereich möglich. Eine Limitierung der NMR-Spektroskopie in Flüssigkeiten stellt jedoch die Größe des zu beobachtenden Moleküls dar. Größere Moleküle führen zu signifikanten Zuordnungsproblemen durch die Überlappung von Signalen. Außerdem bewirkt die Vergrößerung eines Moleküls eine geringere Beweglichkeit in der Lösung, was wiederum zu einer Zunahme der Relaxationsprozesse führt. Dies wiederum äußert sich in einer Verbreiterung der NMR-Signale und somit zu Problemen bei der Auflösung.

Die Voraussetzung bei der Untersuchung von Biomolekülen auf atomarer Ebene ist die Zuordnung von Resonanzen zu entsprechenden Atomkernen. Dies setzt die Markierung der Moleküle mit NMR-aktiven Isotopen voraus. Moderne Zuordnungsexperimente basieren auf der Markierung von ^{13}C - und ^{15}N -Kernen und auf dem selektiven Transfer von Magnetisierung zwischen ^1H -, ^{13}C - und ^{15}N -Kernen.

1.2.2. Verwendete NMR-Parameter

Für die Charakterisierung von Proteinen und anderen Biomolekülen können eine Vielzahl von NMR-Parametern herangezogen werden. Die in dieser Arbeit bei der Untersuchung des Prionenproteins verwendeten Parameter – chemische Verschiebungen und Relaxationsraten – werden im folgenden Abschnitt näher betrachtet.

1.2.2.1. Sekundäre chemische Verschiebungen

Anknüpfend an die Zuordnung der Rückgrat-Resonanzen einer vorgegeben Polypeptidkette können chemische Verschiebungen (δ) gemessen werden, über die – wenn sie richtig referenziert sind – strukturelle Informationen des Proteins auf der Ebene der einzelnen Aminosäuren erhalten werden können. Da nämlich chemische Verschiebungen von der exakten chemischen Umgebung des jeweiligen Kerns abhängig sind, werden jene nicht nur durch die vorgegebene Primärsequenz, sondern auch durch das Vorhandensein von Sekundärstrukturen und Tertiärkontakten beeinflusst (Spera & Bax 1991; Wishart et al 1991). In α -helikalen Strukturen sind die $^{13}\text{C}_\alpha$ - und die ^{13}CO -chemischen Verschiebungen tieffeld verschoben, während sie in β -Faltblattstrukturen hochfeld verschoben sind. Für $^{13}\text{C}_\beta$ - und $^1\text{H}_\alpha$ - chemische Verschiebungen gilt dies umgekehrt (Wishart & Sykes 1994a; Zhang et al 2003). Mit sekundären chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta$) bezeichnet man nun die Differenz aus den experimentell gemessenen und korrekt referenzierten chemischen Verschiebungen (δ_{exp}) und den *random coil* chemischen Verschiebungen (δ_{rc}) aus entsprechenden Referenztabellen.

$$\Delta\delta = \delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{rc}} \quad \text{Gl. (1.1)}$$

Solche *random coil* chemischen Verschiebungen wurden sowohl für *random coil* Bereiche in Proteinen (Wishart & Sykes 1994b; Wishart et al 1992) als auch für unstrukturierte Peptide (Schwarzinger et al 2000) bestimmt. Weiterhin konnten auch Effekte von benachbarten Aminosäureresten auf die *random coil* chemischen Verschiebungen beschrieben werden (Schwarzinger et al 2001; Wishart et al 1995). Allgemein lässt sich festhalten, dass NMR-Spektren von nicht-nativen Proteinzuständen eine wesentlich kleinere Signaldispersion zeigen wie entsprechende Spektren von gefalteten Proteinen. Abb. 1.4 verdeutlicht dies am Beispiel der $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren des gefalteten und des durch Harnstoff denaturierten humanen Prionenproteins.

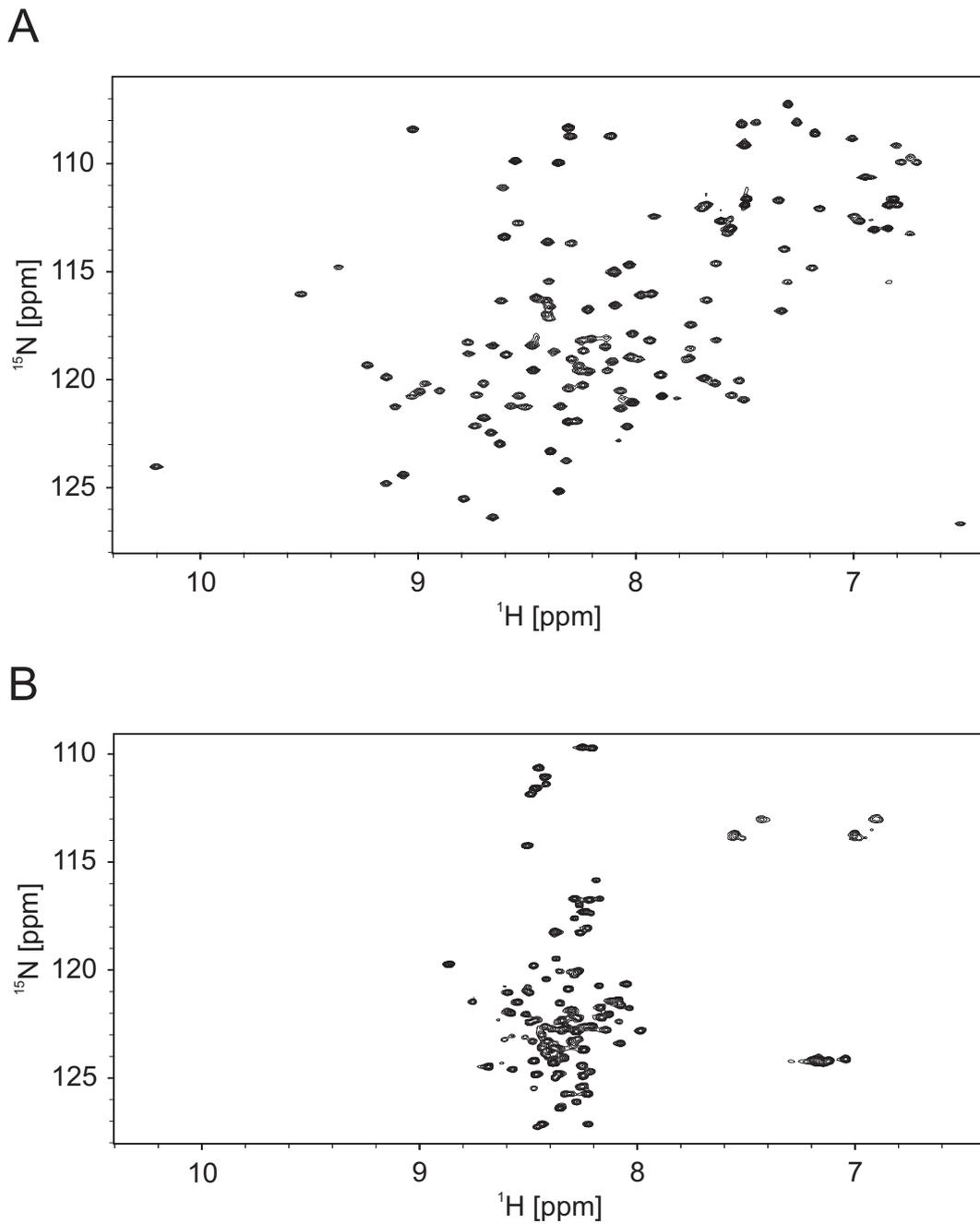


Abb. 1.4: (A) [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum des humanen Prionenproteins hPrP(121–230) in 10 mM NaOAc, pH 4,5. Diese Bedingungen entsprechen denen, die zur Bestimmung der Proteinstruktur herangezogen wurden (Zahn et al 2000) (B) [^1H , ^{15}N]-HSQC-Spektrum des humanen Prionenproteins hPrP(121–230) in 8 M Harnstoff, pH 2,0. Deutlich ist der Unterschied in der Signaldispersion zwischen gefaltetem und denaturiertem Protein zu erkennen.

1.2.2.2. Heteronukleare Relaxation

Bei vielen biologischen Prozessen, z. B. bei der Bindung eines Liganden, der Proteinfaltung oder Enzymkatalysen, spielen konformationelle Änderungen der beteiligten Proteine eine entscheidende Rolle. Daher dürfen Proteine keine komplett starre Struktur besitzen, sondern es muss Bereiche geben, die mehr oder weniger flexibel sind. Abb. 1.5 zeigt auf einer Zeitskala verschiedene molekulare Bewegungen in Proteinen sowie unterschiedliche NMR-Parameter, die für deren Untersuchung geeignet sind.

Die Relaxation von ^{15}N -Kernen kommt hauptsächlich durch dipolare Interaktionen mit dem an den ^{15}N -Kern gebundenen Proton und durch die Anisotropie der chemischen Verschiebung zustande, so dass Relaxationsraten für die räumliche Orientierung des Vektors, der den ^{15}N -Kern mit seinem Proton verbindet, herangezogen werden können. Somit stellt die Messung von ^{15}N -Relaxationsraten eine Möglichkeit dar, sowohl globale als auch lokale Bewegungsprozesse im Rückgrat einer Polypeptidkette zu identifizieren. Vorteilhaft ist zudem, dass die Messung der Relaxationsraten nicht durch skalare Kopplungen anderer Heterokerne beeinflusst wird. Zweidimensionale heteronukleare NMR-Techniken wurden entwickelt, um sowohl longitudinale (R_1) als auch transversale (R_2) Relaxationsraten

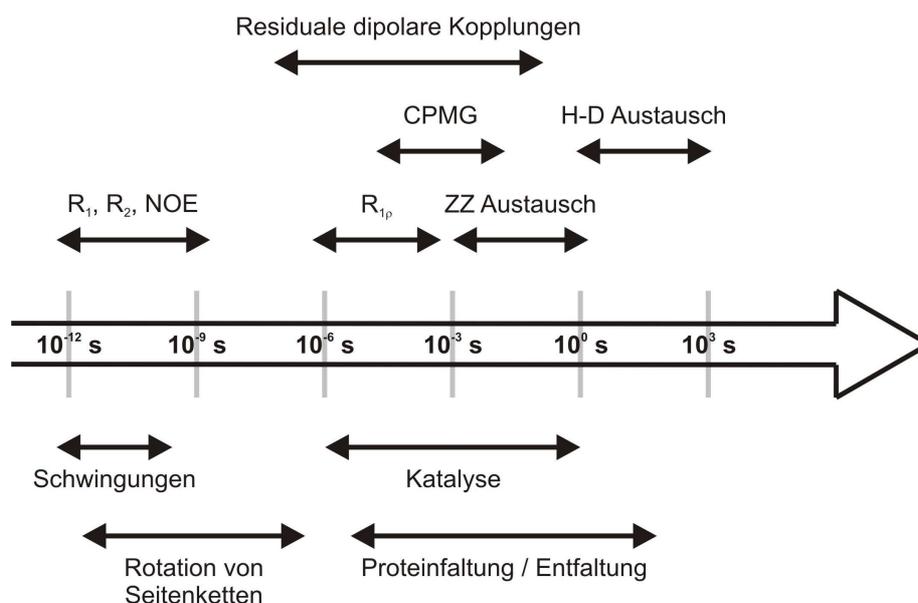


Abb. 1.5: Zeitskala für molekulare Bewegungen und verschiedene NMR-Techniken. Verändert nach (Boehr et al 2006).

messen zu können (Kay et al 1992; Peng & Wagner 1992). R_1 - und R_2 -Relaxationsraten sowie heteronukleare NOEs (^1H - ^{15}N -NOE) (Farrow et al 1994) lassen Aussagen sowohl über Bewegungen im Subnanosekundenbereich als auch über langsame konformationelle Änderungen im Millisekundenbereich zu (Wagner 1993). Diese NMR-Parameter sind nicht nur von lokalen Fluktuationen, sondern auch von der so genannten Rotations-Korrelationszeit τ_c eines Moleküls abhängig. Je größer ein Molekül ist, desto langsamer bewegt es sich. Gemäß des Stoke'schen Gesetzes hat ein Molekül mit effektivem hydrodynamischem Radius r_H die Korrelationszeit

$$\tau_c = \frac{4\pi\eta r_H^3}{3k_B T}. \quad \text{Gl. (1.2)}$$

Hierbei stellt η die Viskosität des Lösungsmittels dar, k_B die Boltzmann-Konstante und T die Temperatur. Mit zunehmender Molekülgröße nimmt also die Korrelationszeit zu. Infolgedessen nimmt die Effizienz des Mittelungsprozesses durch die Rotation ab, wodurch die Breite der Resonanzlinien wiederum zunimmt.

Die exakten mathematischen Formulierungen der R_1 - und R_2 -Raten sowie des ^1H - ^{15}N -NOEs über spektrale Dichtefunktionen sind in den Gleichungen 1.3 bis 1.5 wiedergegeben.

$$R_1 = \frac{d^2}{4} [J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + c^2 J(\omega_N) \quad \text{Gl. (1.3)}$$

$$R_2 = \frac{d^2}{8} [4J(0) + J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_N)] + \frac{c^2}{6} [4J(0) + 3J(\omega_N)] + R_{ex} \quad \text{Gl. (1.4)}$$

$$NOE = 1 + \left(\frac{d^2}{4R_1} \right) \left(\frac{\gamma_N}{\gamma_H} \right) [6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H + \omega_N)] \quad \text{Gl. (1.5)}$$

Hierbei bezeichnen ω_H und ω_N die jeweiligen Larmor-Frequenzen des ^1H - und des ^{15}N -Kerns, $J(\omega)$ ist die spektrale Dichtefunktion bei der Frequenz ω und R_{ex} beschreibt die Verteilung des konformationellen Austauschs. Weiterhin beschreibt die Konstante c die Anisotropie der chemischen Verschiebung und die Konstante d dipolare Wechselwirkungen. Beide Konstanten sind definiert über

$$c = \frac{\omega_N \Delta\sigma_N}{\sqrt{3}} \quad \text{Gl. (1.6)}$$

und

$$d = \frac{\mu_0 h \gamma_N \gamma_H}{8 r_{NH}^3 \pi^2}. \quad \text{Gl. (1.7)}$$

$\Delta\sigma_N$ ist hierbei die Anisotropie der chemischen Verschiebung des Stickstoffs, μ_0 ist die Vakuumdurchlässigkeit, h das Planck'sche Wirkungsquantum, γ_i das gyromagnetische Verhältnis des Kerns i und r_{NH} der Abstand zwischen den Kernen N und H.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Relaxationsraten im rotierenden Koordinatensystem, $R_{1\rho}$, (Jones 1966) dazu verwendet werden können, um chemischen Austausch mit Ratenkonstanten im Mikrosekundenbereich zu bestimmen (Farrar & Becker 1971). Zu chemischen Austauschprozessen gehören neben dem Austausch von Protonen mit dem Lösungsmittel auch konformationeller Austausch, Reorientierung von Seitenketten und andere Arten interner Bewegungen.

1.3. Grundlagen des Circular dichroismus

Linear polarisiertes Licht ist dadurch gekennzeichnet, dass sich sein elektrischer Vektor in Form einer Cosinus-Schwingung ausbreitet. Es ist möglich, sich einen linear polarisierten Lichtstrahl aus zwei Komponenten zusammengesetzt zu denken. Bei diesen Komponenten handelt es sich um zwei E-Feld-Vektoren, \vec{E}_L und \vec{E}_R , die mit gleicher Frequenz und gleichem Betrag gegenläufig zirkular um die Ausbreitungsrichtung rotieren (Abb. 1.6).

Der Circular dichroismus (CD) und die optische Rotationsdispersion (ORD) – beides Varianten der Absorptionsspektroskopie – nutzen nun die Chiralität von Molekülen aus, denn Voraussetzung für beide Spektroskopiearten ist das Vorliegen von optischer Aktivität der Probe, d. h. von unterschiedlicher Wechselwirkung mit links und rechts zirkular polarisiertem Licht.

Breiten sich nämlich die beiden Lichtstrahlen, die zu den zwei E-Feld-Vektoren \vec{E}_L und \vec{E}_R gehören, mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch das untersuchte Medium aus, so wird der Summenvektor seine Richtung nicht beibehalten, sondern es resultiert eine Drehung der Polarisationssebene um den Winkel α (Abb. 1.6), der umso größer wird, je länger die durchlaufene Strecke ist. Bei der ORD misst man eben diesen Drehwinkel α .

Misst man nun die Abhängigkeit des Drehwinkels α von der Wellenlänge im Bereich einer elektronischen Absorptionsbande, dann breiten sich die links und rechts zirkular polarisierten Komponenten nicht nur verschieden schnell aus, sondern sie werden zusätzlich auch verschieden stark absorbiert, d. h. die Extinktionskoeffizienten ε_L und ε_R für links und rechts zirkular polarisiertes Licht unterscheiden sich (Abb. 1.6). Dieses Verhalten nennt man Circular dichroismus; am einfachsten wird es beschrieben durch die Differenz der Extinktionskoeffizienten $\Delta\varepsilon$:

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R \quad \text{Gl. (1.8)}$$

$\Delta\varepsilon$ kann positiv oder negativ sein, d. h. der links oder der rechts zirkular polarisierte Strahl kann stärker absorbiert werden.

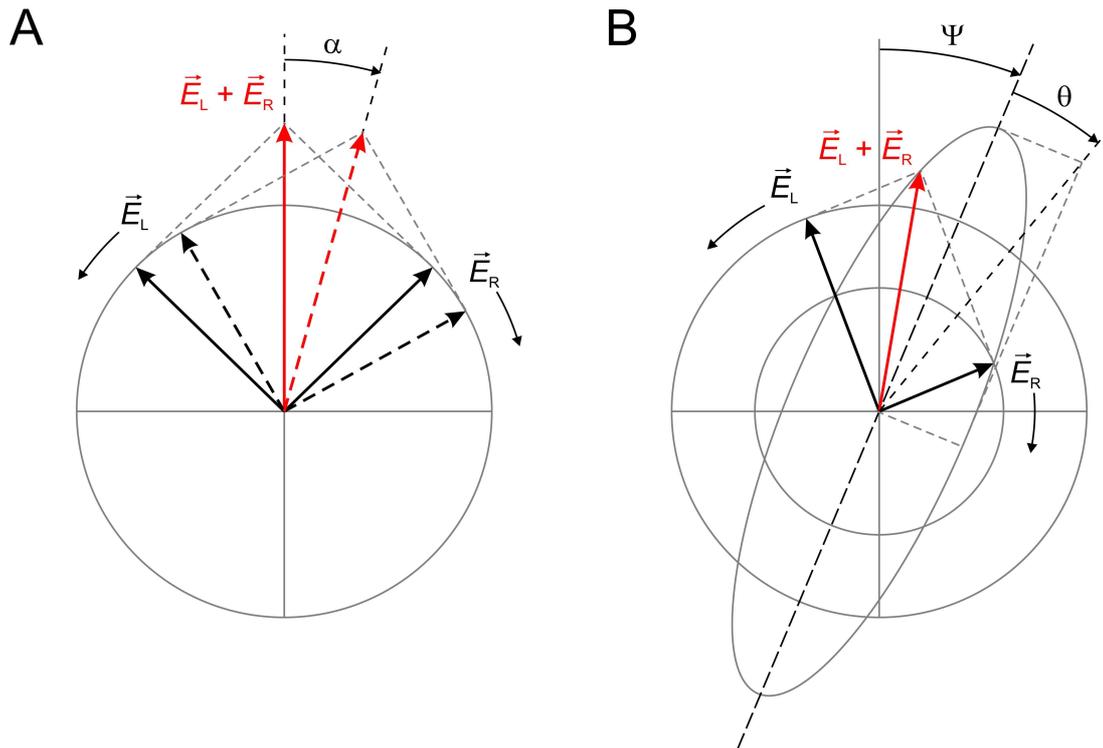


Abb. 1.6: (A) Linear polarisiertes Licht kann als Überlagerung zweier gegenläufig zirkular polarisierter Lichtstrahlen mit gleicher Amplitude und Phase dargestellt werden. Unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeiten der beiden zirkular polarisierten Lichtstrahlen \vec{E}_L und \vec{E}_R führen zu einer Drehung der Polarisationsebene um den Winkel α (ORD). (B) Unterschiedliche Absorption der beiden zirkular polarisierten Lichtstrahlen führt zu elliptisch polarisiertem Licht (CD), woraus die Elliptizität θ bestimmt werden kann. Ψ bezeichnet hierbei den Drehwinkel der Ellipsenachse des polarisierten Lichts.

In der praktischen CD-Spektroskopie wird die so genannte Elliptizität θ_λ gemessen:

$$\tan \theta_\lambda = \frac{I_R - I_L}{I_R + I_L} \quad \text{Gl. (1.9)}$$

$I_{R,L}$ ist die Intensität des rechts bzw. links zirkular polarisierten Lichts nach dem Absorptionsvorgang. Da die Lichtintensitäten mit den Extinktionskoeffizienten über das Lambert-Beer-Gesetz über die Konzentration c und die Schichtdicke d miteinander verknüpft sind, ergibt sich daraus näherungsweise für kleine θ :

$$\theta_\lambda = \ln 10 \cdot \frac{180^\circ}{4\pi} \cdot (\varepsilon_L - \varepsilon_R) \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. (1.10)}$$

Im Gegensatz zur ORD-Spektroskopie findet bei der Untersuchung von Biomolekülen die CD-Spektroskopie eine größere Anwendung, da CD-Banden im allgemeinen leichter zuzuordnen sind, denn jeder optisch aktive elektronische Übergang liefert ein CD-Signal mit einem bestimmten Vorzeichen. Weiterhin sind CD-Banden schmaler, was zu einer besseren Auflösung führt.

Für die Untersuchung eines Proteins mittels CD-Spektroskopie ist zunächst einmal von Bedeutung, welche Chromophore optische Aktivität besitzen. Dies kann zuallererst jedes absorbierende Molekül sein, das keine Symmetrieebene oder kein Symmetriezentrum besitzt, das also von sich aus optisch aktiv ist. Bis auf Glycin gilt dies für alle in der Natur vorkommenden Aminosäuren, da ihre α -Kohlenstoffatome jeweils vier verschiedene Substituenten tragen.

Optische Aktivität tritt jedoch auch dann auf, wenn sich das Chromophor in einer asymmetrischen Mikroumgebung befindet, was zu einer induzierten optischen Aktivität führt. So können z. B. durch die Proteinfaltung asymmetrische elektrische Felder auf die π -Elektronen des Phenylrings in Tyrosin einwirken, was zu einer starken optischen Aktivität führen kann, wohingegen die π -Elektronen für sich allein genommen nur eine schwach ausgeprägte optische Aktivität besitzen.

Zusätzlich zu der intrinsischen optischen Aktivität von Proteinen und Polypeptiden – ausgehend von ihrem Aufbau aus Aminosäuren – leisten auch Kopplungen von Chromophoren, insbesondere die der Peptidbindungen, aufgrund der Ausbildung von Sekundärstrukturelementen (α -Helix, β -Faltblatt, *random coil*) einen Beitrag zu den CD-Spektren dieser Moleküle.

Die ($n \rightarrow \pi^*$)- und ($\pi \rightarrow \pi^*$)-Übergänge der Peptidgruppe liegen im UV-Bereich um 200 nm. Die π -Elektronen sind über die C-, N- und O-Atome delokalisiert. Das Maximum des ($n \rightarrow \pi^*$)-Übergangs liegt zwischen 210 und 230 nm, die genaue Frequenz des Übergangs ist sensitiv auf Wasserstoffbrückenbindungen. Der ($\pi \rightarrow \pi^*$)-Übergang hingegen liegt im Bereich zwischen 180 und 200 nm. Mit Hilfe von Modellpeptiden (Adler et al 1973) konnten charakteristische CD-Spektren für die einzelnen Sekundärstrukturelemente erhalten werden (Abb. 1.7).

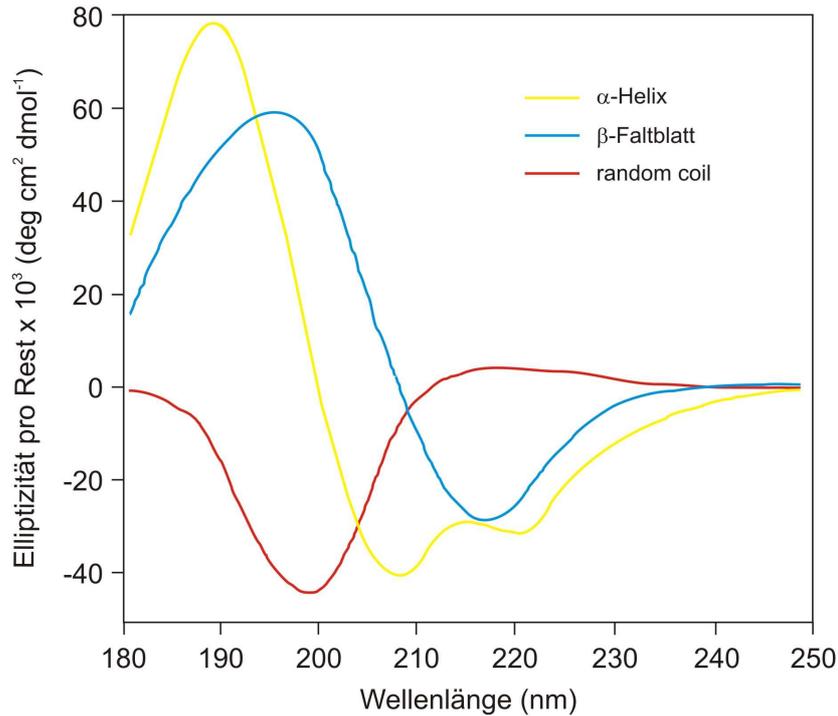


Abb. 1.7: Zirkulardichroismus für eine α -Helix (gelb), ein β -Faltblatt (blau) und die *random coil* Konformation (rot).

Für eine α -Helix zeigt sich, dass der ($\pi \rightarrow \pi^*$)-Übergang entartet ist, er besteht aus zwei Komponenten, die einem senkrecht bzw. parallel zur Helixachse liegenden Beitrag zuzuschreiben sind. Entsprechend zeigt das CD-Spektrum eines α -helikalen Proteins drei Extremstellen, nämlich ein Maximum bei 192 nm ($\pi \rightarrow \pi_{\perp}^*$) und zwei Minima bei 208 nm ($\pi \rightarrow \pi_{\parallel}^*$) und 222 nm ($n \rightarrow \pi^*$). Die CD-Spektren für eine β -Faltblattstruktur oder ein *random coil* Protein weisen hingegen nur zwei Extremstellen auf, im β -Faltblatt kommt es zu einem Maximum bei 195 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) und einem Minimum bei 215 nm ($n \rightarrow \pi^*$), bei einem *random coil* Protein zeigt sich ein Minimum bei 198 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) und ein Maximum bei etwa 214 nm ($n \rightarrow \pi^*$).

1.4. Grundlagen der Fluoreszenzspektroskopie

Alle Moleküle absorbieren Licht, jedoch können nur spezielle Molekülspezies – normalerweise stabile, konjugierte, polyaromatische Kohlenwasserstoffe oder Heterocyclen – auch Licht als Ergebnis der Absorption emittieren. Erfolgt die Emission aus elektronisch angeregten Singulettzuständen, nennt man dieses Phänomen Fluoreszenz.

Die Fluoreszenz liegt für gewöhnlich im ultravioletten bis sichtbaren, teilweise auch im nah-infraroten Spektralbereich. Die Anregung findet vom elektronischen Grundzustand S_0 in den ersten angeregten Singulettzustand S_1 statt. Das Jablonski-Diagramm in Abb. 1.8 gibt die dabei möglichen Vorgänge wieder.

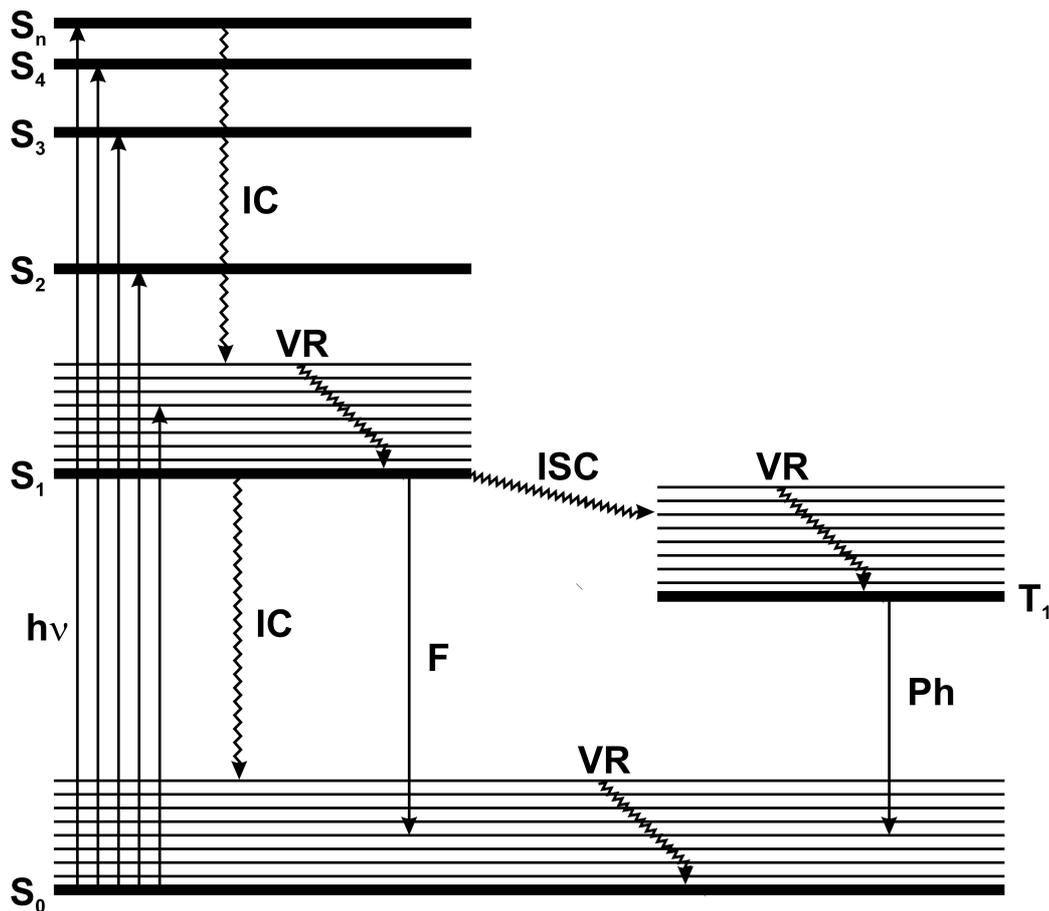


Abb. 1.8: Jablonski-Diagramm eines Fluorophors. Zur Vereinfachung wurden keine Rotationsenergieniveaus eingezeichnet. Die Energieniveaus des Fluorophors sind durch horizontale Linien dargestellt und in Gruppen zusammengefasst. Das niedrigste Band stellt den elektronischen Grundzustand S_0 dar, die niedrigsten Energien der angeregten Singulettzustände werden mit S_1 , S_2 , ..., S_n bezeichnet. T_1 ist die niedrigste Energie des Triplettzustands. F: Fluoreszenz; IC: interne Konversion; ISC: Intersystem Crossing; Ph: Phosphoreszenz; VR: Schwingungsrelaxation.

Im Zuge der Anregung absorbieren die Elektronen im energetischen Grundzustand ein Photon ($h\nu$) und werden in verschiedene höhere Schwingungsniveaus angeregter Singulettzustände gehoben (10^{-15} s). Die Elektronen, die sich in diesen höheren Schwingungsniveaus befinden, relaxieren daraufhin strahlungslos in das niedrigste Schwingungsniveau des jeweiligen angeregten Zustands. Diese angeregten Zustände relaxieren nun in Lösung sehr schnell (10^{-12} s) strahlungslos in die Boltzmann-Verteilung des niedrigsten Schwingungszustands des ersten elektronisch angeregten Singulettzustands S_1 (Kasha 1950).

Aus diesem Schwingungsniveau heraus kann das Elektron nun in den Grundzustand zurückkehren. Dabei ist zu beachten, dass das untere Niveau, in das das Elektron nun zurückkehrt nicht unbedingt der Grundzustand sein muss (Franck-Condon-Prinzip), sondern einer der angeregten Schwingungszustände sein kann, von dem aus das Elektron durch Schwingungsrelaxation wieder bis in den S_0 -Zustand gelangt. Die wichtigsten Vorgänge bei der Rückkehr des Elektrons in den niedrigeren Zustand sind:

- 1) Externe Konversion: Dabei erfährt das angeregte Molekül Stöße mit seiner Umgebung und gibt dabei Energie ab, bis es durch diese strahlungslose Desaktivierung im Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands angelangt ist.
- 2) Interne Konversion (10^{-12} s): Direkte vibronische Kopplung zwischen dem Grundzustand und dem angeregten Zustand aufgrund der Überlappung von Schwingungsniveaus und quantenmechanische Tunneleffekte aufgrund kleiner Energiedifferenzen führen zu strahlungslosen internen Konversionsprozessen.
- 3) Intersystem Crossing (10^{-9} s): Kommt es zu einer Überlappung der Energieniveaus der Singulettzustände mit denen der Triplettzustände kann aufgrund vibronischer Kopplung das Elektron in den Triplettzustand übergehen. Aus dem Triplettzustand heraus kann das Elektron nun unter Lichtemission in ein Schwingungsniveau des Singulett-Grundzustands übergehen (Phosphoreszenz). Da es sich dabei aber um einen verbotenen Übergang handelt, besitzt der Triplettzustand eine lange Lebensdauer und die Dauer der Phosphoreszenz ist entsprechend lang (zwischen 10^{-2} und 10^2 s).

- 4) Fluoreszenz (10^{-8} s): Hierbei relaxiert das Molekül unter Lichtemission aus dem angeregten Singulettzustand in den Singulett-Grundzustand. Die Wellenlänge des ausgestrahlten Lichts – und damit dessen Energie – ist dabei abhängig von der Energiedifferenz des Grundzustands und des angeregten Zustands. Die Fluoreszenzenergie lässt sich berechnen durch:

$$E_{\text{fluor}} = E_{\text{abs}} - E_{\text{vib}} - E_{\text{Lömi}} \quad \text{Gl. (1.11)}$$

wobei E_{fluor} die Energie der emittierten Strahlung, E_{abs} die Energie der absorbierten Strahlung während der Anregung, E_{vib} die Energie der Schwingungsrelaxation und $E_{\text{Lömi}}$ die Energie für die Reorientierung der Lösungsmittelmoleküle ist.

Da die Emission erst stattfindet, nachdem das Molekül einen Teil der Anregungsenergie an die Umgebung abgegeben hat (gegeben durch die Terme E_{vib} und $E_{\text{Lömi}}$), erfolgt die Fluoreszenz bei einer kleineren Frequenz – also einer höheren Wellenlänge – als die Absorption.

1.5. Prionen

1.5.1. Historisches oder eine kurze Geschichte des Prions

Transmissible spongiforme Encephalopathien (TSE) bezeichnen eine Gruppe verschiedener neurodegenerativer Krankheiten. Bereits im 18. Jahrhundert wurde diese Form der Krankheit in Westeuropa bei Schafen festgestellt und später mit dem Ausdruck „scrapie“ (dt. Traberkrankheit) charakterisiert (Abb. 1.9), doch es gibt Anzeichen, dass diese Krankheit schon in früherer Zeit existierte und auch bekannt war (Wickner 2005). Die Übertragung der Krankheit von einem Schaf zu einem anderen mittels Inokulation konnte in den Dreißigerjahren des 20. Jahrhunderts durchgeführt werden (Cuille & Chelle 1936). Als TSE-Erkrankungen wie die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (CJD) (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921) oder das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS) (Gerstmann et al 1936) beim Menschen entdeckt wurden, glaubte man hingegen nicht, dass diese Krankheiten übertragbar seien. Die Beschreibung von Kuru – einer Krankheit, die bei einem Ureinwohnerstamm in Neu Guinea ausgebrochen war (Zigas & Gajdusek 1957) – und die Beobachtung, dass mehrere histopathologische Ähnlichkeiten zwischen Scrapie und Kuru bestanden (Hadlow 1959), führten jedoch zu der erfolgreichen Übertragung von Kuru (Gajdusek et al 1966) und später von CJD vom Menschen auf den Schimpansen und andere Primaten (Gajdusek & Gibbs 1971). Von diesem Punkt an war klar, dass TSE-Erkrankungen bei Tieren und beim Menschen zu der gleichen Krankheitsgruppe gehörten und dass das auslösende Agens – obwohl noch unbekannt – ähnliche und ungewöhnliche Eigenschaften z. B. bei der Inaktivierung besaß. Zwei Nobelpreise später – der erste ging 1976 an Dr. Daniel Carleton Gajdusek für seine Arbeit zur Beschreibung von Kuru in Neu Guinea, der zweite 1997 an Dr. Stanley Ben Prusiner für seine „protein-only“ Hypothese (Prusiner 1982) – wurde als auslösendes Agens für diese Art der Erkrankung ein einzelnes Protein, das Prionenprotein (PrP), verantwortlich gemacht.

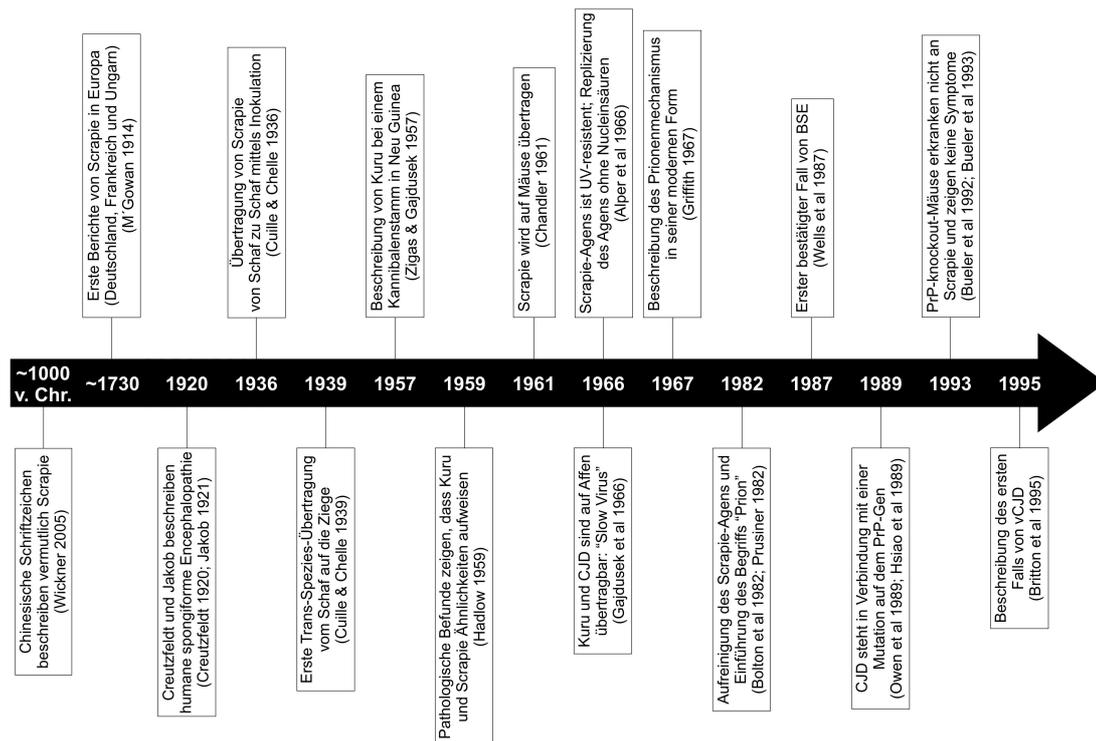


Abb. 1.9: Zeitstrahl mit wichtigen Ereignissen bei der Erforschung von transmissiblen spongiformen Enzephalopathien.

Internationale Aufmerksamkeit erlangten TSE-Erkrankungen und Prionen im Zuge der am Ende des 20. Jahrhunderts in Großbritannien auftretenden BSE-Epidemie. Diese auch als „Rinderwahnsinn“ bezeichnete Krankheit wurde in England erstmals Mitte der 1980er Jahre bei zehn Rindern festgestellt. Daraufhin stiegen die Fallzahlen bis 1992 auf über 36000 an, um dann wieder zu sinken (Abb. 1.10). Insgesamt starben innerhalb von 20 Jahren mehr als 180000 Rinder, vorwiegend Milchkühe, an der bovinen spongiformen Enzephalopathie (BSE). Insgesamt infizierten sich etwa eine Million Rinder (Anderson et al 1996), die daraufhin getötet wurden. Eine mögliche Ursache für das gehäufte Auftreten der Epidemie wurde in der Zufütterung von Tiermehl gesehen, dem Schlachtabfälle von Schafen, Rindern, Schweinen und Hühnern zur Herstellung eines proteinreicheren Futtermittels zugegeben worden waren. Seit den 1970er Jahren wurden zudem die Schlachtabfälle nur noch unzureichend erhitzt, um den Fettgehalt des zu verfütternden Tiermehls zu erhöhen (Wilesmith et al 1991). Diese Änderung in der Herstellung des Tiermehls wird als eine Ursache dafür gesehen, dass Scrapie-Erreger, die diesen Aufbereitungsprozess überstanden, vom Schaf auf Rinder übertragen werden konnten. Seit dem 01. August 1996 gilt in ganz Großbritannien ein völliges Verbot

der Tiermehlfütterung bei allen Tierarten. Trotzdem traten auch lange nach 1996 immer wieder BSE-Fälle bei Rindern auf, die nach dem Fütterungsverbot geboren wurden. Infolge der neuen Bestimmungen zur Tiermehlfütterung nahmen die BSE-Fälle Mitte der 1990er Jahre wieder dramatisch ab.

1996 wurde in Großbritannien eine neue Variante der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (vCJD) beschrieben, von der man heute glaubt, dass es sich dabei um die humane Form von BSE handelt (Will et al 1996). Diese ist keine familiäre Krankheit, die mit Mutationen assoziiert ist, auch wenn in den meisten Fällen ein Met/Met-Genotyp am PrP-Codon 129 vorliegt. vCJD kann von der sporadischen CJD, die die übliche Form der humanen TSE-Erkrankungen darstellt, unter anderem dadurch unterschieden werden, dass die Krankheit bereits in jungen Jahren (< 40 Jahre) ausbricht und dass die für CJD typischen Veränderungen im Elektroencephalogramm ausbleiben (Will et al 2000). Vor allem das untypisch junge Alter der Patienten und deren ausgeprägte Pathologie deuteten an, dass es sich bei vCJD um eine neue klinische TSE-Erkrankung handelte, und das Auftauchen dieser Krankheit ausgerechnet in

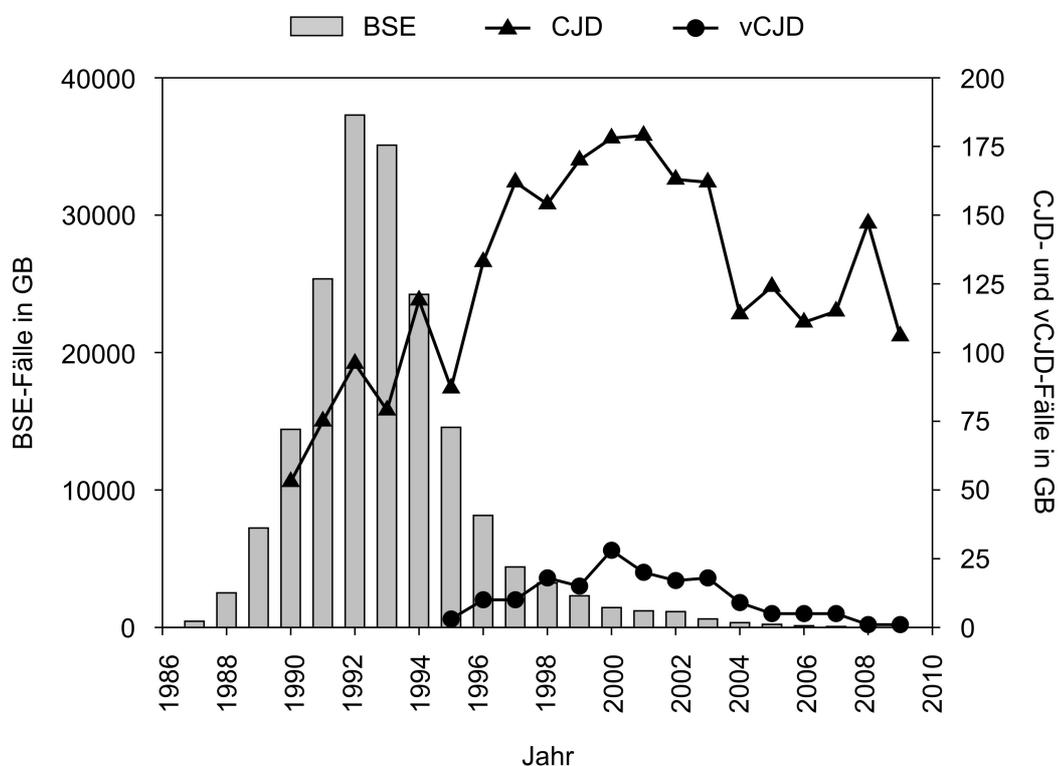


Abb. 1.10: Vergleich der jährlichen Neuerkrankungen an BSE bei Rindern (Quelle: The World Organisation for Animal Health [OIE]) sowie CJD und vCJD bei Menschen (Quelle: The National Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Unit [NCJDSU]) jeweils für Großbritannien (GB).

Großbritannien legte den Schluss nahe, dass es eine Verbindung zwischen vCJD und BSE geben müsse. Verschiedene Untersuchungen bestätigten daraufhin, dass die bei Menschen auftretende vCJD-Erkrankung ein Abkömmling von BSE ist (Bruce et al 1997; Hill et al 1997; Lasmézas et al 1996; Lasmézas et al 2001). Da die meisten vCJD-Patienten keinen Kontakt zu Rindern auf Farmen oder in Schlachthäusern hatten, wurde angenommen, dass die Infektion durch den Konsum von BSE-kontaminierten Fleischprodukten stattgefunden haben musste. Bis 2009 wurde von insgesamt 165 vCJD-Fällen in Großbritannien berichtet (Abb. 1.10) und es scheint, dass bereits im Jahr 2000 der Höhepunkt der Krankheitswelle erreicht wurde. Da aber vermutlich weit mehr Menschen dem infektiösen BSE-Erreger ausgesetzt waren, jedoch auch im Vergleich zu den anderen TSE-Patienten – insgesamt 1036 im selben Zeitraum – nur eine verschwindend kleine Gruppe tatsächlich vCJD ausbildete, spricht dies dafür, dass Menschen teilweise resistent gegenüber dem BSE-Erreger reagieren und/oder dass die Dosis der BSE-Infektion bei den meisten Menschen zu gering gewesen ist.

1.5.2. Aktueller Stand der Forschung

1.5.2.1. Das zelluläre Prionenprotein (PrP^C)

Das zelluläre Prionenprotein (PrP^C) ist ein an zwei Asparaginresten, Asn₁₈₁ und Asn₁₉₇, glykosyliertes Protein der extrazellulären Matrix. Entsprechend ist es über einen Glykosyl-phosphatidyl-inositol (GPI)-Anteil in der Plasmamembran verankert. Die Strukturen des prozessierten PrP^C aus Mensch, Maus, Rind und Goldhamster sind ähnlich aufgebaut: Der N-terminale Teil des Proteins (Aminosäurereste 23–120) bildet einen hochflexiblen Polypeptidschwanz aus, wohingegen sich im C-terminalen Teil (Aminosäurereste 121–230) Sekundärstrukturen befinden. Insgesamt bilden sich drei α -Helices und ein zweisträngiges antiparalleles β -Faltblatt aus (Abb. 1.11) (Riek et al 1997). Die zweite β -Struktur und die dritte α -Helix sind über einen großen Loop miteinander verbunden. Der C-Terminus ist durch eine Disulfidbrücke zwischen Cys₁₇₉ und Cys₂₁₄ verbunden, der Helix 2 und Helix 3 miteinander verknüpft (Riek et al 1996).

Auch wenn der N-terminale Teil des PrP^C unstrukturiert erscheint, enthält er zwei klare, konservierte Regionen. Die erste besteht aus einem Segment mit fünf Wiederholungen, bestehend aus einer oktameren Aminosäuresequenz (Abb. 1.11) (Riek et al 1997). Von dieser Region wird angenommen, dass sie eine wichtige Rolle bei der Bindung von Kupfer aber auch bei der Krankheitsentstehung spielt (Brookes 1999). Der zweite Aminosäurebereich besteht aus einer hochkonservierten, hydrophoben Domäne, der eine hydrophile, geladene Region vorausgeht (Abb. 1.11). Bei Säugetieren ist das PrP^C ein hochkonserviertes Protein und analoge Proteine existieren auch in Schildkröten (Simonin et al 2000) und möglicherweise auch in Amphibien (Strumbo et al 2001). Das breite, mannigfaltige und wachstumsregulierte Expressionsmuster von PrP^C in der Skelettmuskulatur, den Nieren, dem Herz, den sekundären Lymphorganen und dem Zentralnervensystem lassen eine konservierte und breite Funktion des Proteins erahnen (Aguzzi & Polymenidou 2004; Manson et al 1992). Innerhalb des Zentralnervensystems können hohe PrP^C-Konzentrationen in den synaptischen Membranen von Neuronen festgestellt werden. PrP^C kann jedoch auch in Astrocyten exprimiert werden (Moser et al 1995). Obwohl das *Prnp*-Gen, das das Prionenprotein codiert, bereits 1986 identifiziert werden konnte (Basler et al 1986) und *Prnp* Knock-out-Mäuse seit 1992 existieren (Büeler et al 1992), konnte die Funktion des PrP^C noch nicht vollständig geklärt werden. Viele verschiedene Funktionen werden dem PrP^C zugesprochen, unter anderem bei der Immunregulation, bei Signaltransduktionsprozessen, bei der Bindung von Kupfer, bei der synaptischen Weiterleitung, bei der Einleitung der Apoptose und bei vielem mehr (Aguzzi & Polymenidou 2004).

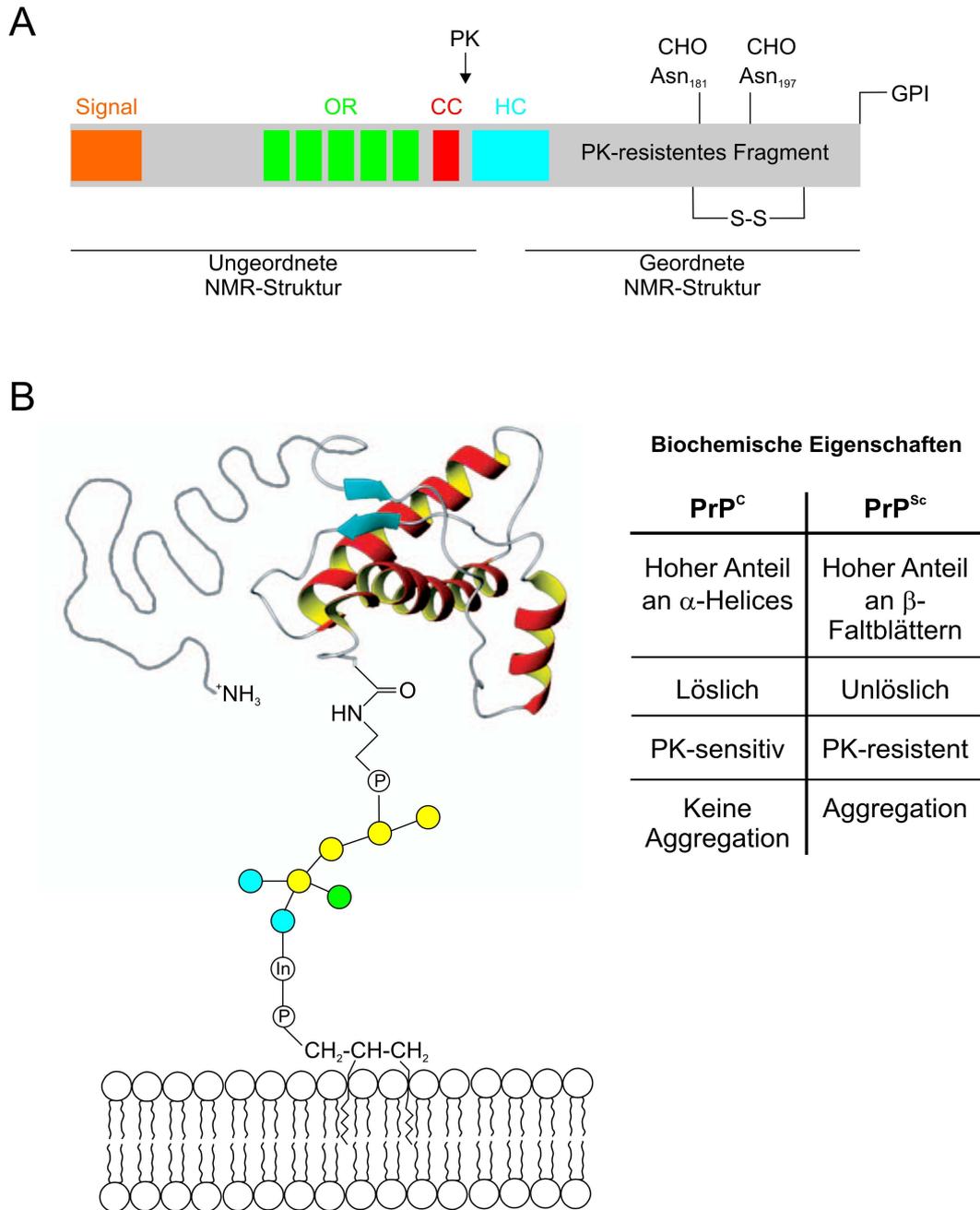


Abb. 1.11: Strukturelle Merkmale und biochemische Eigenschaften des zellulären Prionenproteins. (A) Modell der Primärstruktur des PrP^C mit posttranslationalen Modifikationen. Ein sekretorisches Signalpeptid (Signal) befindet sich am N-Terminus. Der Proteinase K (PK)-resistente Teil von PrP^{Sc} ist angegeben, die Position der PK-Spaltstelle ist durch einen Pfeil angezeigt. OR (grün): Octarepeat-Region; CC (rot): Geladener Cluster; HC (blau): hydrophobe Domäne; S-S: Disulfidbrücke; CHO: Glykosylierungsstellen; GPI: Glykosyl-phosphatidyl-inositol-Anker. (B) Tertiärstruktur des PrP^C, eingebettet in eine Lipid-Doppelmembran. α -Helices sind in rot, das antiparallele β -Faltblatt in blau wiedergegeben. Gezeigt ist weiterhin der unstrukturierte N-terminale Teil (grau) und der GPI-Anker. Zuckerreste sind durch die farbigen Kreise wiedergegeben. Gelb: Mannose; Blau: N-Acetylgalactosamin; Grün: Glucosamin; In: Inositol; P: Phosphat. Die biochemischen Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc} sind tabellarisch angegeben. Verändert nach (Aguzzi et al 2008).

1.5.2.2. Die „protein-only“-Hypothese und Konversionsmodelle

Zurzeit ist die „protein-only“-Hypothese das am meisten akzeptierte Modell für die Erklärung von TSE-Erkrankungen, auch wenn einige Daten und Meinungen nicht mit Absolutheit zu dieser Hypothese passen (Aguzzi & Heikenwalder 2003). Diese Hypothese – in den Grundzügen aufgestellt von Griffith (Griffith 1967), detailliert beschrieben von Prusiner (Oesch et al 1988; Oesch et al 1985; Prusiner 1982; 1989) und verfeinert von Weissmann (Weissmann 1991) – beruht darauf, dass das infektiöse Agens für TSE-Erkrankungen (PrP^{Sc}) eine posttranslational modifizierte Konformation des zellulären Prionenproteins PrP^{C} ist (Cohen et al 1994). Durch vergleichende CD- und IR-spektroskopische Strukturanalysen konnte gezeigt werden, dass PrP^{C} einen α -helikalen Anteil von 40% besitzt (Pan et al 1993), wohingegen PrP^{Sc} ca. 43% β -Faltblatt- und 30% α -Helix-Strukturen aufweist (Safar et al 1993). Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden zwei mögliche Theorien darüber aufgestellt, die den Mechanismus der PrP^{Sc} -induzierten Konversion von PrP^{C} in PrP^{Sc} beschreiben. Dabei handelt es sich erstens um das heterodimere Modell (Gajdusek 1988; Prusiner & Dearmond 1990) und zweitens um das Nukleationspolymerisationsmodell (Come et al 1993).

Dem heterodimeren Modell (Abb. 1.12A) liegt zugrunde, dass das PrP^{Sc} nach der Infektion eine katalytische Kaskade auslöst und als Substrat dabei PrP^{C} oder ein teilweise entfaltetes Intermediat (PrP^{Int}), das durch stochastische Fluktuationen in den PrP^{C} -Konformationen entstehen könnte, verwendet und durch eine konformationelle Änderung dieses in ein neues Protein mit hohem β -Faltblattanteil umwandelt. Das neu geformte PrP^{Sc} wiederum kann daraufhin ein weiteres PrP^{C} -Molekül in die krankhafte Form umwandeln. Die konformationelle Änderung ist bei diesem Modell kinetisch kontrolliert: Eine hohe Aktivierungsenergie verhindert dabei eine spontane Konversion. Die Entstehung eines PrP^{Sc} -Dimers könnte die Aktivierungsenergie herabsetzen und die Bildung von neuem PrP^{Sc} aus dem PrP^{C} - PrP^{Sc} -Heterodimer beschleunigen, was zu einer beschleunigten Rekrutierung von weiteren PrP^{C} -Molekülen führen würde. Sporadische Fälle von CJD könnten durch eine extrem seltene Konversion entstehen; die Häufigkeit für diesen Prozess liegt etwa bei einem Fall pro einer Million Menschen und pro Jahr (Kahana et al 1974). Familiäre Formen von Prionenerkrankungen sind dagegen eng mit Mutationen auf dem *Prnp*-Gen assoziiert (Hsiao & Prusiner 1990). Es wird vermutet, dass diese

Mutationen eine spontane Konversion von PrP^{C} zu PrP^{Sc} mit einer erhöhten Häufigkeit erlauben, so dass die Krankheit innerhalb der Lebensspanne des Individuums auftreten kann. Diese Wahrscheinlichkeitserhöhung könnte wiederum mit einer verringerten Aktivierungsenergie für den Umwandlungsprozess des mutierten PrP im Vergleich zum Wildtyp-PrP erklärt werden.

Demgegenüber steht das Nukleationspolymerisationsmodell (Abb. 1.12B), das die Konformationsänderung als thermodynamisch kontrolliert annimmt. Die Umwandlung von PrP^{C} und PrP^{Sc} ist demnach reversibel, doch wird im Gleichgewichtszustand die PrP^{C} -Konformation stark begünstigt. PrP^{Sc} ist nur dann stabil, wenn es an bereits bestehende kristall-ähnliche PrP^{Sc} -Nukleationskeime oder -Aggregate angebinden werden kann. Das Vorhandensein eines Nukleationskeimes wiederum beschleunigt die Addition von weiteren Monomeren. Entsprechend dieser Hypothese wäre der aggregierte Zustand eine intrinsische Eigenschaft der Infektiosität: Monomeres PrP^{Sc} wäre harmlos aber anfällig für den Einbau in ein sich vergrößerndes PrP^{Sc} -Aggregat.

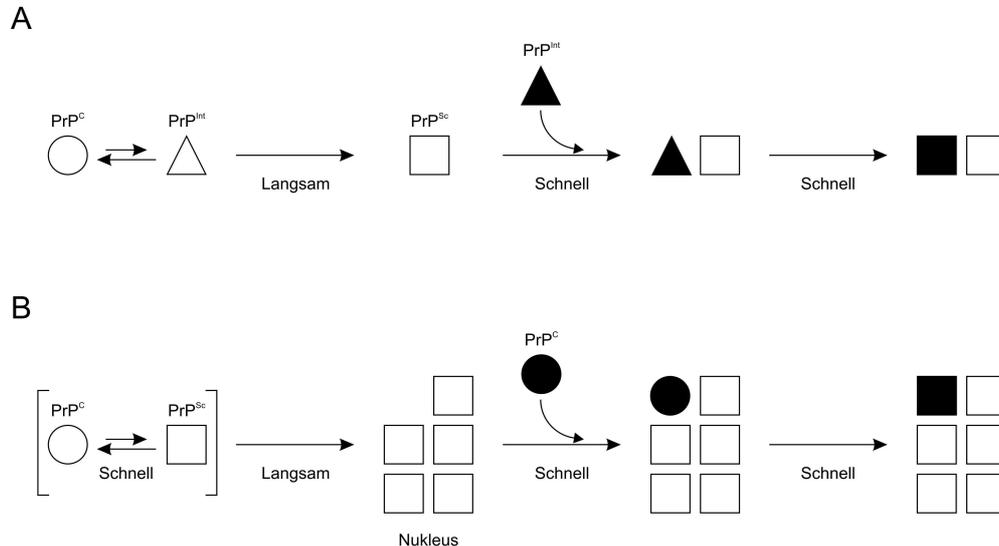


Abb. 1.12: Modelle für die Konversion von PrP^{C} zu PrP^{Sc} . (A) Im heterodimeren Modell ist die Umwandlung des PrP^{C} (Kreise) oder einer anderen möglichen Konformation, PrP^{Int} (Dreiecke), zu PrP^{Sc} (Quadrat) in Abwesenheit von PrP^{Sc} -Molekülen extrem langsam, jedoch irreversibel. PrP^{Sc} schafft es im weiteren Verlauf durch eine katalytische Reaktion weitere PrP^{Int} -Moleküle in die PrP^{Sc} -Konformation umzuwandeln. (B) Beim Nukleationspolymerisationsmodell ist die Umwandlung von der PrP^{C} - in die PrP^{Sc} -Form von Natur aus ein schneller Prozess. Jedoch ist bei Abwesenheit eines ausreichend großen PrP^{Sc} -Aggregates (Nukleus) die PrP^{C} -Konformation thermodynamisch bevorzugt. Erst bei der Anwesenheit eines Nukleus werden PrP^{C} -Moleküle rekrutiert und als PrP^{Sc} -Moleküle in die Struktur der Aggregate eingebaut.

1.5.2.3. Strukturmodelle von PrP^{Sc}

Hochaufgelöste strukturelle Details von PrP^{Sc}-Aggregaten liegen nicht vor, doch konnten mehrere Strukturmodelle von PrP^{Sc} erstellt werden (Abb. 1.13A).

Das β -Helix-Modell (Govaerts et al 2004) basiert unter anderem auf elektronenmikroskopischen Experimenten an Hamster-PrP^{Sc} (Wille et al 2002). Dieses Modell verortet die größten konformationellen Änderungen während des Konversionsprozesses in der Region zwischen den Aminosäureresten 90 und 112, die sich bis zu Aminosäure 138 ausdehnen. Die sich dadurch formende β -faltblattähnliche Kernregion bildet daraufhin eine linksgängige β -Helix zwischen den Resten 89 und 176, die in PrP-Trimeren angeordnet sind (Abb. 1.13C). Der C-terminale Anteil des Proteins mit den α -Helices 2 und 3 ist bei diesem Modell nicht betroffen. Die Trimere bilden eine sich wiederholende β -helikale Scheibe, aus der durch Polymerisation PrP^{Sc}-Fibrillen entstehen.

Demgegenüber steht das Spiralmodell, das auf der Basis von MD-Simulationen erstellt wurde (DeMarco & Daggett 2004). Kernstück des Spiralmodells sind vier β -Faltblätter (E1–E4), die von den Resten 116 bis 164 gebildet werden und eine protofibrilläre Konformation (34% β -Faltblattanteil) ausbilden. Dabei liegt E1 N-terminal zu dem ersten in PrP^C vorhandenen β -Strang, E2 und E3 sind Erweiterungen der beiden in PrP^C vorliegenden β -Stränge. Keine der ausgedehnten Faltblattstrukturen beeinträchtigt dabei die in PrP^C existierenden α -Helices, die damit ihre native Konformation beibehalten können. Auch hier bilden die PrP^{Sc}-Monomere trimere Strukturen (Abb. 1.13D), die sich zu einem in sich verdrehten Filament aufbauen.

Eine weitere Struktur wurde entwickelt, die aus experimentellen Daten aus ortsspezifischem Spinlabeling und EPR-Spektroskopie abgeleitet wurde (Cobb et al 2007). Dieses Strukturmodell unterscheidet sich von den beiden anderen in der Form, dass der β -faltblattähnliche Kern durch die Aminosäuren 169 bis 220 gebildet wird und dass keine α -helikalen Strukturen aus PrP^C zurückbleiben (Abb. 1.13E).

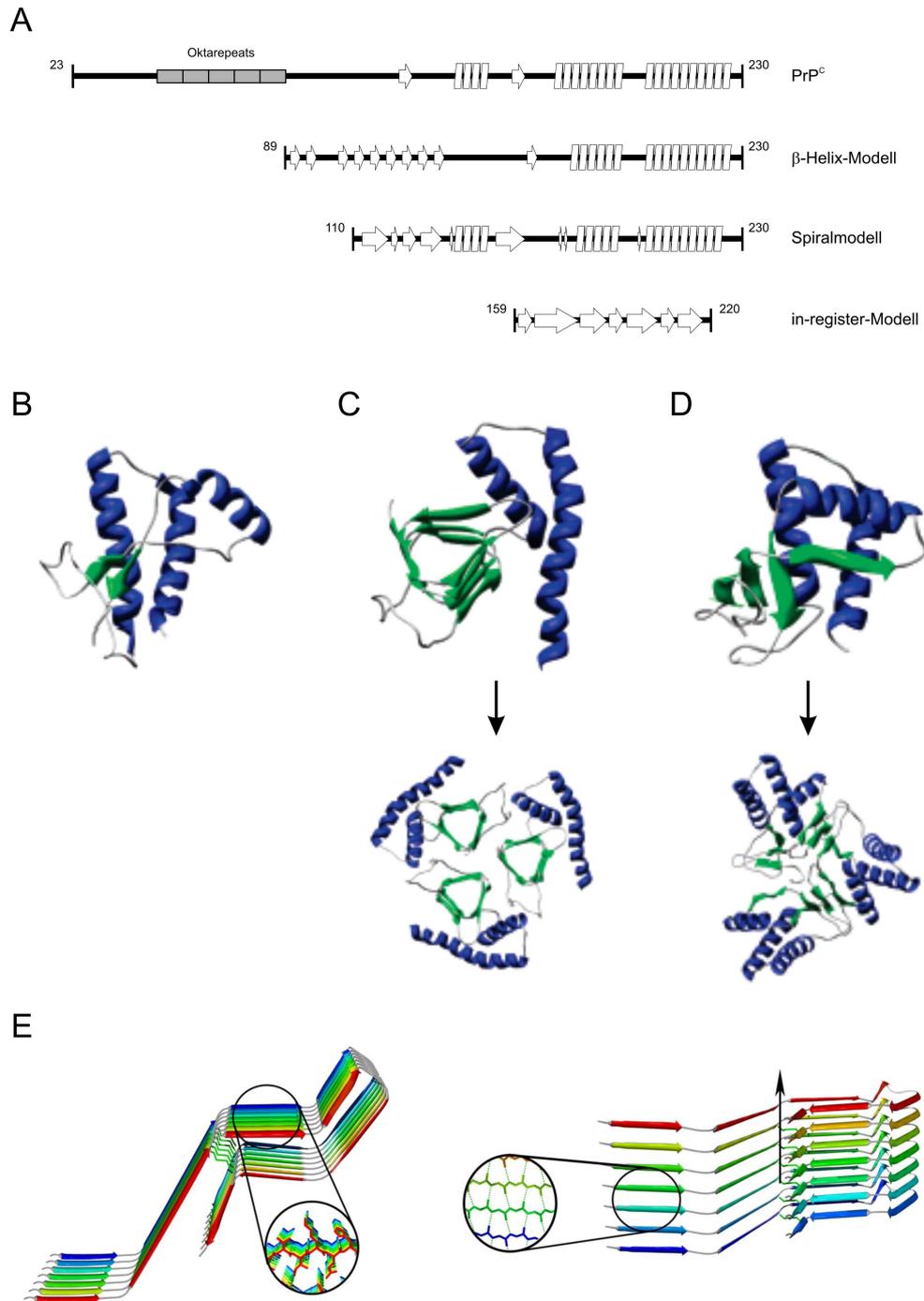


Abb. 1.13: (A) Vorausgesagte Sekundärstrukturelemente von PrP^{Sc} basierend auf den drei hier vorgestellten Modellen (β -Helix-Modell, Spiralmodell, in-register-Modell). Zum Vergleich ist die Sekundärstruktur des PrP^C angegeben. (B) NMR-Struktur des PrP^C. (C) Struktur des PrP^{Sc} nach dem β -Helix-Modell, als Monomer (oben) und als Trimer (unten). (D) Struktur des PrP^{Sc} nach dem Spiralmodell, als Monomer (oben) und als Trimer (unten). (E) Stapelmotiv von PrP^{Sc}-Monomeren in einer amyloiden Struktur nach dem in-register-Modell. Gezeigt ist die Verzahnung der Seitenketten (Vergrößerung links). Rechts dargestellt ist eine um 90° gedrehte Struktur, die das Netzwerk der intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen zeigt (Vergrößerung rechts). Der Pfeil zeigt die Längsachse der Fibrille an. Verändert nach (Cobb et al 2007; DeMarco et al 2006; Moore et al 2009).

1.6. Motivation und Ziele

Seit der Aufstellung der „protein-only“-Hypothese zielt eine zentrale Frage in der Prionenforschung auf den Mechanismus der Umwandlung des PrP^C in PrP^{Sc} ab. Da die beiden Isoformen PrP^C und PrP^{Sc} große Unterschiede in ihrer nativen Sekundärstruktur aufweisen, jedoch nur PrP^{Sc} amyloidbildend wirkt, scheint die PrP^C→PrP^{Sc}-Konversion über einen entfalteten Zustand wahrscheinlich zu sein. Somit kann die Untersuchung dieses dritten konformationellen Zustands – neben dem nativen und dem fibrillären Zustand – das Verständnis über dieses Phänomen und die damit zusammenhängende Entstehung diverser neurodegenerativer Erkrankungen fördern.

Die vorliegende Arbeit untersucht deshalb Konformation und Dynamik der in Harnstoff denaturierten Proteine hPrP(121–230) und mPrP(121–232). Diese in Denaturantien entfalteten Proteine dienen als Modell für den entfalteten Zustand des PrP^C, aus dem heraus sich Fibrillen gegebenenfalls bilden können. Ziel der Arbeit war damit die Untersuchung der beiden entfalteten Proteine hPrP(121–230) und mPrP(121–232); NMR-Spektroskopie wurde eingesetzt, um mittels atomarer Auflösung die gemittelte Konformation und die Dynamik zu bestimmen und mit Vorhersagen von *random coil* Modellen, wie sie im Arbeitskreis an Modellproteinen wie Ubiquitin und Lysozym entwickelt wurden, zu vergleichen.

Zusätzlich wird das Aggregationsverhalten von verschiedenen mit TSE-Erkrankungen beim Menschen assoziierten Mutationen betrachtet. Hierfür wurde eine fluoreszenzspektroskopische Analyse verwendet, mit der die Fibrillenbildung von verschiedenen *mut*-mPrP-Konstrukten in Echtzeit verfolgt werden konnte.

Zur Beantwortung der Fragestellung nach Konformation und Dynamik sollte zunächst das hPrP(121–230) sowohl unmarkiert als auch ¹⁵N- bzw. ¹³C,¹⁵N-isotopenmarkiert nach einer bereits etablierten Methode (Zahn et al 2000) heterolog exprimiert und in Mengen von einigen Milligramm aufgereinigt werden.

Das Protein sollte daraufhin in 8 M Harnstoff, pH 2,0 gegeben werden. Das Verhalten des in 8 M Harnstoff gegebenen Proteins sollte mittels CD- und NMR-spektroskopischer Untersuchungen ermittelt werden; hierbei sollte die Frage geklärt

werden, ob das hPrP(121–230) vollständig entfaltet war oder noch Reststrukturen aufwies.

Dazu wurde eine sequentielle Resonanzzuordnungen der $^{13}\text{C}_{\alpha}$ -, $^{13}\text{C}_{\beta}$ -, ^{13}CO -, $^1\text{H}_{\alpha}$ - und $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Resonanzen des in 8 M Harnstoff entfalteten Proteins hPrP(121–230) mittels NMR-spektroskopischer Methoden durchgeführt, was sich – im Gegensatz zu anderen Proteinen wie Ubiquitin (Peti et al 2001) oder Lysozym (Schwalbe et al 1997), die bereits in der Arbeitsgruppe auf diese Weise untersucht worden waren – aufgrund der häufigen Sequenzwiederholungen als besonders schwierig herausstellte. Die Resonanzzuordnung der nativen Konformation von hPrP(121–230), die bereits veröffentlicht wurde (Zahn et al 2000), konnte dabei nicht genutzt werden, da man keine Bedingungen identifizieren konnte, in denen gefaltete und ungefaltete Proteine im schnellen Gleichgewicht vorliegen und damit die Anwendung von Austauschspektroskopie nicht in Betracht kam.

Ausgehend von dieser Resonanzzuordnung sollte die Frage geklärt werden, ob und wo hPrP(121–230) im entfalteten Zustand residuale Strukturen ausbildet, die mit den amyloidauslösenden Mutationen in Verbindung gebracht werden könnten; dabei sollten sowohl Weitenbereich- als auch lokale Strukturen berücksichtigt werden. Ebenso sollte die Art der Struktur (α -helikal oder β -Faltblatt) ermittelt werden.

Dazu sollten mögliche residuale Strukturen mit Hilfe von Modellen für *random coil* Zustände, die sich auf NMR-Daten von chemischen Verschiebungen und heteronuklearen Relaxationsraten stützten, analysiert und diskutiert werden.

Zudem sollte der Einfluss der Disulfidbrücke auf Konformation und Dynamik von humanem Prionenprotein untersucht werden. Hierfür wurden zusätzlich eine sequentielle Resonanzzuordnung sowie die sich daran anschließende Analyse der chemischen Verschiebungen und der heteronuklearen Relaxationsraten an dem durch Methylierung der Cysteine reduzierten Protein hPrP(121–230) durchgeführt und mit den vorhergehenden Ergebnissen am oxidierten humanen Prionenprotein verglichen. Zusätzlich sollte der Einfluss der Disulfidbrücke auf das Aggregationsverhalten von oxidiertem und reduziertem hPrP(121–230) über eine fluoreszenzspektroskopische Analyse betrachtet werden.

Anschließend sollten strukturelle, dynamische und kinetische Charakteristika des hPrP(121–230) mit denen des murinen Prionenproteins mPrP(121–232) sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand verglichen werden, um die Frage zu klären, ob mPrP(121–232) ein geeignetes Modellsystem für das humane Prionenprotein darstellt.

Weiterhin sollten Punktmutationen, die mit TSE-Erkrankungen beim Menschen assoziiert sind, in mPrP(121–232) über molekularbiologische Methoden eingeführt und das Aggregationsverhalten der verschiedenen mutierten mPrP(121–232)-Konstrukte mit denen des *wt*-mPrP(121–232) verglichen werden.

2. Experimenteller Teil

2.1. Plasmidisolierung

2.1.1. Transformation von TOP10F'-Zellen

100 μL kompetente *E. coli* TOP10F'-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, anschließend wurden 5 μL Plasmid-DNA ($50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ pJC40_{TEV}hPrP(121–230) bzw. $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ pRSET A mPrP(121–232)) zugegeben.

Der Vektor pJC40_{TEV}hPrP(121–230) (Abb. 2.1A) kodiert den C-terminalen Teil des humanen Prionenproteins hPrP; der N-Terminus des translatierten Proteins ist zusätzlich mit einem His-tag fusioniert (Aminosäuresequenz: MGHHHHHHHSENLVYFQGHM). Außerdem trägt dieser Vektor das Gen für die Ampicillin-Resistenz.

Der Vektor pRSET A mPrP(121–232) (Abb. 2.1B) kodiert den C-terminalen Teil des murinen Prionenproteins mPrP; der N-Terminus des translatierten Proteins ist zusätzlich mit einem His-tag fusioniert (Aminosäuresequenz: MRGSHHHHHHGLVPRGS). Auch dieser Vektor trägt das Gen für die Ampicillin-Resistenz.

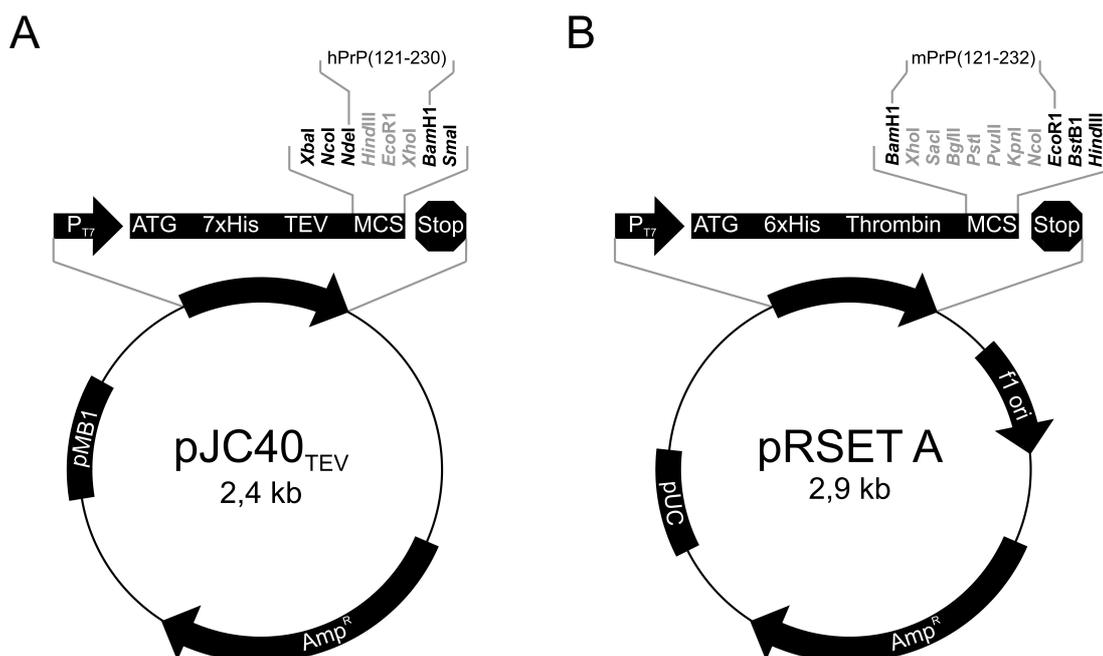


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der hier verwendeten Plasmide pJC40_{TEV} (A) und pRSET A (B).

Der Transformationsansatz wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert, um die DNA-Anlagerung an die Zellen zu fördern. Daraufhin wurden die Zellen für zwei Minuten einer Temperatur von 42°C ausgesetzt, was die Aufnahme der DNA in die Zellen erleichtert. Nach diesem Hitzeschock folgte eine Erholungsphase von zwei Minuten; anschließend wurden zu dem Ansatz 900 µL LB-Medium hinzupipettiert. Der Transformationsansatz wurde nun bei 37°C für 40 Minuten im Schüttler bei 190 rpm inkubiert.

100 µL der Zellsuspension wurden nach dieser Inkubationszeit auf einer Ampicillin-haltigen (100 µg mL⁻¹) LB-Agarplatte ausplattiert; die Zellen in den restlichen 900 µL des Transformationsansatzes wurden abzentrifugiert (5000 rpm, 1 min, 19°C), in 100 µL LB-Medium resuspendiert und ebenfalls auf eine Ampicillin-haltige LB-Agarplatte aufgetragen.

Beide Platten wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.1.2. Isolierung der Plasmide pJC40_{TEVhPrP(121–230)} und pRSET A mPrP(121–232)

6-mL-LB-Kulturen, die jeweils 100 µg mL⁻¹ Ampicillin enthielten, wurden mit Kolonien von den Agarplatten angeimpft und bei 37°C und 190 rpm vier Stunden inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin bei 13000 rpm abzentrifugiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA aus den Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [Birnboim & Doly, 1979] mit Hilfe eines QIAprep Miniprep Kits nach beiliegender Vorschrift. Die isolierte DNA wurde jeweils in 50 µL Elutionspuffer EB aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.1.3. Restriktionsverdau

Um den Erfolg der Plasmidisolierung zu verifizieren, wurde ein Kontrollverdau durchgeführt (Tabelle 2.1). Der Restriktionsansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert, daraufhin wurden Proben der restringierten und der unbehandelten Plasmid-DNA auf ein 1%iges Agarose-Gel (w/v) aufgetragen (s. Abschnitt 2.7.1.).

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des Restriktionsverdau für humanes PrP (links) und murines PrP (rechts). Die Konzentration der verwendeten Plasmidlösung betrug jeweils $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

hPrP(121–230)	Volumen	mPrP(121–232)	Volumen
pJC40 _{TEV} hPrP(121–230)	4 μL	pRSET A mPrP(121–232)	4 μL
NEB-Puffer 2	2 μL	NEB-Puffer 4	4 μL
BSA [$1 \text{ } \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$]	2 μL	<i>Eco</i> R1 [$20 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$]	0,5 μL
<i>Nde</i> I [$20 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$]	0,5 μL	<i>Nco</i> I [$10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$]	0,5 μL
<i>Bam</i> H1 [$20 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$]	0,5 μL	ddH ₂ O	11 μL
ddH ₂ O	11 μL	Σ	20 μL
Σ	20 μL		

2.1.4. Herstellung der mPrP-Mutanten

Ausgehend von dem Wildtyp-Plasmid *wt*-pRSET A mPrP(121–232) wurden durch ortsspezifische Mutagenese (Stratagene QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit) einzelne Punktmutationen in das Protein eingeführt, deren Expression mit den Krankheitssymptomen einer prionenspezifischen Krankheit assoziiert sind. In Tabelle 2.2 ist die allgemeine Zusammensetzung für den PCR-Ansatz angegeben.

Tabelle 2.2: Allgemeine Zusammensetzung des PCR-Ansatzes. Als Vorlagen-DNA (dsDNA) wurde das Plasmid pRSET A mPrP(121–232) verwendet. Die jeweilige Basenabfolge der verschiedenen Primer (revPrimer und forPrimer) ist im Anhang (Abschnitt 5.4.) angegeben.

	Volumen
10x Reaktionspuffer	5 μL
dsDNA [$10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$]	1 μL
revPrimer [$10 \text{ } \mu\text{M}$]	1,5 μL
forPrimer [$10 \text{ } \mu\text{M}$]	1,5 μL
dNTPmix	1 μL
ddH ₂ O	40 μL
Σ	50 μL

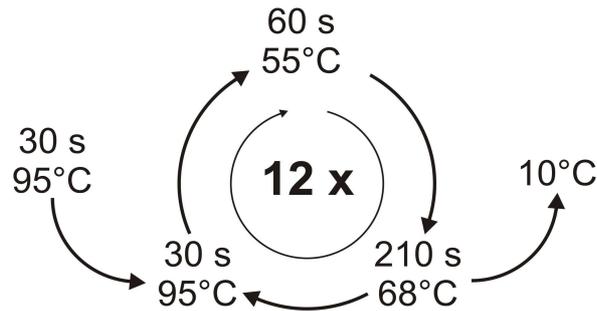


Abb. 2.2: Schematische Darstellung des zur Herstellung der verschiedenen *mut*-mPrP-Konstrukte verwendeten PCR-Zyklus. Als Initiationsschritt wird die eingesetzte DNA für 30 s bei 95°C inkubiert. Hierauf folgt ein sich insgesamt zwölfmal wiederholender Zyklus, bestehend aus drei Schritten, dem DNA-Schmelzen (30 s bei 95°C), der Primer-Anlagerung (60 s bei 55°C) und der Kettenverlängerung (210 s bei 68°C). Nach Abschluss des PCR-Zyklus wird der Ansatz bei 10°C bis zur Weiterverwendung gelagert.

Zu diesem 50 μL Ansatz wurde 1 μL Pfu Turbo Polymerase ($2,5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) hinzugegeben und eine PCR entsprechend Abb. 2.2 durchgeführt. Nach der PCR wurde der Ansatz mit 1 μL *DpnI* ($10 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Das *DpnI* verdaute die parentale DNA. 1 μL des Ansatzes wurde daraufhin in DH5 α -Zellen transformiert, auf ^{Amp}LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Erfolg der Mutagenese wurde über die Sequenzanalyse eines Klons verifiziert. Hierzu wurde ein einzeln wachsender Klon von der ^{Amp}LB-Agar-Platte gepickt und in ^{Amp}LB-Medium über Nacht unter Schütteln bei 37°C herangezogen. Das mPrP-Plasmid wurde isoliert und sequenziert.

2.2. Proteinexpression

2.2.1. Transformation von BL21(DE3)pLysS- und BL21StarTM(DE3)pLysS-Zellen

Entsprechend dem in Abschnitt 2.1.1. beschriebenen Protokoll wurden 100 μL kompetente BL21(DE3)pLysS- bzw. 100 μL kompetente BL21StarTM(DE3)pLysS-Zellen mit 5 μL Plasmid-DNA [pJC40_{TEV}hPrP(121–230), pRSET A *wt*-mPrP(121–232) bzw. pRSET A *mut*-mPrP(121–232)] transformiert und auf Ampicillin- und Chloramphenicol-haltigen LB-Agarplatten angezogen.

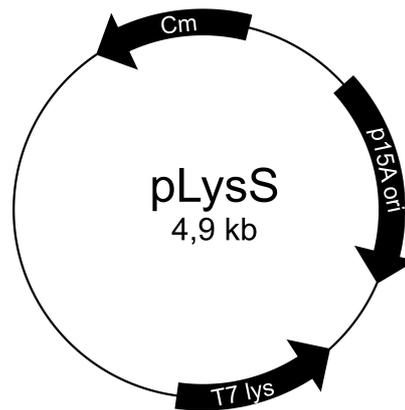


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Plasmids pLysS.

BL21(DE3)-Zellen tragen ein in ihr Genom integriertes Gen für die T7 RNA-Polymerase, die unter Kontrolle des *lacUV5*-Promotors steht; die Genexpression kann mit Hilfe von IPTG induziert werden.

Die hier verwendeten BL21(DE3)pLysS kompetenten Zellen besitzen darüber hinaus einen permanent eintransformierten Vektor (pLysS), der eine geringe Menge des T7 Lysozyms produziert; dieses Enzym unterdrückt die Expression der T7 RNA-Polymerase, solange die Zellen nicht mit IPTG induziert worden sind. Dies reduziert eine frühzeitige Überexpression. Außerdem ist auf diesem Vektor das Gen für die Chloramphenicol-Resistenz enthalten (Abb. 2.3).

BL21StarTM(DE3)pLysS-Zellen tragen darüber hinaus ein mutiertes *rne*-Gen (*rne131*), das für ein verkürztes RNase E Enzym kodiert. Diesem verkürzten Enzym fehlt die Fähigkeit mRNA abzubauen, wodurch deren Stabilität erhöht wird.

2.2.2. Expression in Normalmedium

Zur Expression des ^{His}_hPrP(121–230) bzw. des ^{His}_{wt}-mPrP(121–232) oder der ^{His}_{mut}-mPrP(121–232) in Normalmedium wurden BL21(DE3)pLysS-Zellen verwendet.

Zunächst wurden Ampicillin- und Chloramphenicol-haltige LB-Vorkulturen zu je 100 mL bei 37°C und 190 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,7 angezogen. Mit diesen Vorkulturen wurden daraufhin jeweils 2 L LB-Hauptkulturen (enthielten Ampicillin und Chloramphenicol) angeimpft; diese wurden ebenfalls bei 37°C und 190 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 - 0,9 inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der

Proteinexpression mit IPTG (Endkonzentration: 1 mM). Die induzierten Kulturen wurden weiterhin bei 37°C und 190 rpm inkubiert; drei bis vier Stunden nach der Induktion wurden die Zellen mittels Zentrifugation (JLA 8.1000, 6500 rpm, 10 min, 4°C) geerntet.

Das Zellpellet wurde bis zur Weiterverarbeitung bei –80°C eingefroren.

2.2.3. Expression in isotonenangereichertem Medium

Zur Expression des ^{His}hPrP(121–230) bzw. des ^{His}_{wt}-mPrP(121–232) in M9-Minimalmedium wurden ebenfalls BL21(DE3)pLysS-Zellen verwendet.

Zunächst wurden Ampicillin- und Chloramphenicol-haltige LB-Vorkulturen zu je 50 mL bei 37°C und 190 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 1,5 angezogen. Mit diesen Vorkulturen wurden daraufhin jeweils 2 L M9-Hauptkulturen angeimpft; diese wurden ebenfalls bei 37°C und 190 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 - 0,9 inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit IPTG (Endkonzentration: 1 mM). Die induzierten Kulturen wurden weiterhin bei 37°C und 190 rpm inkubiert; drei bis vier Stunden nach der Induktion wurden die Zellen mittels Zentrifugation (JLA 8.1000, 6500 rpm, 10 min, 4°C) geerntet.

Das Zellpellet wurde bis zur Weiterverarbeitung bei –80°C eingefroren.

2.3. Aufreinigung der verschiedenen Prionenproteine

2.3.1. Zellaufschluss

Das bei der Expression jeweils erhaltene Zellpellet wurde aufgetaut und mit ca. 40 mL Puffer G (6 M Guanidiniumhydrochlorid, 10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0, 10 mM reduziertes Gluthation, 5 mM Imidazol) versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte zunächst mechanisch mit Hilfe eines Homogenisators, danach mittels Ultraschall (achtmal eine Minute bei 60% power).

Debris wurde durch Zentrifugation (JLA 16.250, 15500 rpm, 40 min, 4°C) sedimentiert, der Überstand wurde filtriert und einer immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) unterzogen.

2.3.2. Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die verschiedenen Proteinkonstrukte wurden jeweils bei Raumtemperatur an einer FPLC-Anlage (BioRad) über eine Ni-NTA-Säule affinitätsgereinigt. Mit Hilfe einer angeschlossenen UV-Einheit konnte die Extinktion bei 280 nm verfolgt werden.

Das Ni-NTA-Material besitzt eine hohe Affinität für Polypeptide, die an ihrem N- oder C-Terminus einen so genannten Histidin-tag – bestehend aus sechs oder sieben aufeinanderfolgenden Histidinen – tragen [Hochuli et al., 1987]. Proteine ohne His-tag binden nicht an das Ni-NTA-Material und können somit durch Waschschriffe von dem Zielprotein entfernt werden.

Die Säule wurde zunächst mit fünf Säulenvolumina deionisiertem Wasser gewaschen und anschließend mit dem gleichen Volumen Puffer G äquilibriert. Daraufhin wurde das Säulenmaterial zu dem aus Abschnitt 2.3.1. erhaltenen Überstand gegeben und bei Raumtemperatur eine Stunde lang gerührt. Als nächstes wurde das Säulenmaterial, an dem nun die His-getaggten PrP-Moleküle gebunden hatten, wieder in die Säule gefüllt und bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie mit Puffer G gewaschen. Die Flussgeschwindigkeit betrug dabei 3 mL min^{-1} .

Anschließend wurde ein linearer Gradient von 0 bis 100% Puffer B (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0, 5 mM Imidazol) über ein zehnfaches Säulenvolumen bei einer Flussgeschwindigkeit von $0,7 \text{ mL min}^{-1}$ gefahren. Während dieses Gradienten kam es zur Rückfaltung des auf der Säule gebundenen Proteins. Nach Abschluss des Gradienten wurde die Säule nochmals mit zwei Säulenvolumina Puffer B gewaschen, um eine hundertprozentige Rückfaltung zu gewährleisten.

Anschließend wurde die Säule mit Puffer W (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0, 50 mM Imidazol) bis zum Erreichen einer konstanten Basislinie gewaschen. Mit Hilfe dieses Schrittes sollten unspezifisch an die Säule gebundene Moleküle von dem Zielprotein getrennt werden.

Die Elution des Prionenproteins erfolgte mit Hilfe von Puffer E (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0, 150 mM Imidazol). Dabei wurden Fraktionen von 8 mL gesammelt. Proben einzelner Fraktionen wurden mit 15%igen SDS-PAGE-Gelen analysiert; geeignete Fraktionen wurden vereinigt.

2.3.3. Abspaltung des His-tags mittels TEV-Protease

Für die Abspaltung des His-tags von dem hier exprimierten humanen Prionenprotein hPrP(121–230) wurde die TEV-Protease verwendet. TEV-Protease ist der Name der 27 kDa großen katalytischen Domäne des Nuclear Inclusion A Proteins, das von dem Tabakäzvirus kodiert wird. Da die Sequenzspezifität der TEV-Protease stringenter als die der Faktoren X_a, Thrombin oder Enterokinase ist, eignet sie sich als Reagenz zur Spaltung von Fusionsproteinen sehr gut. Außerdem ist die Überproduktion und Aufreinigung großer Ausbeuten sehr einfach.

Die TEV-Protease erkennt ein lineares Epitop der allgemeinen Form E-X_{aa}-X_{aa}-Y-X_{aa}-Q-(G/S) (X_{aa}: Aminosäure mit aliphatischer Seitenkette); die Spaltung erfolgt zwischen Q und G bzw. Q und S. Die Epitopsequenz bei dem hier verwendeten Proteinkonstrukt ^{His}hPrP(121–230) lautet ENLYFQG.

Zu den vereinigten Fraktionen wurde 1 mL TEV-Protease (1 mg mL⁻¹) gegeben.

Nach einer sechsständigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden nochmals 1 mL TEV-Protease zugegeben; die Lösung wurde weitere 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um den Erfolg der His-tag-Abspaltung zu verifizieren, wurden Proben mittels SDS-PAGE analysiert.

2.3.4. Abspaltung des His-tags mittels Thrombin-Protease

Für die Abspaltung des His-tags von dem hier exprimierten murinen Prionenprotein mPrP(121–232) und den verschiedenen Mutanten *mut*-mPrP(121–232) wurde Thrombin-Protease verwendet. Die Thrombin-Protease erkennt ein lineares Epitop der allgemeinen Form X₁-X₂-P-R/K-X₃-X₄ (X₁ und X₂: hydrophobe Aminosäure; X₃ und X₄: nicht-saure Aminosäure); die Spaltung erfolgt zwischen R/K und X₃. Die Epitopsequenz bei den hier verwendeten Proteinkonstrukten ^{His}mPrP(121–232) und ^{His}*mut*-mPrP(121–232) lautet LVPRGS.

Zu den vereinigten Fraktionen wurden 30 µL Thrombin-Protease (1 U µL⁻¹) gegeben. Die Lösung wurde für 24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Um den Erfolg der His-tag-Abspaltung zu verifizieren, wurden Proben nach verschiedenen Inkubationszeiten genommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

2.3.5. Gelfiltration

Zur Trennung der verschiedenen Prionenproteine von der TEV- bzw. Thrombin-Protease und von dem abgespaltenen His-tag wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Das Prionenprotein wurde umgepuffert in Puffer A (6 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 mM Tris/HCl, pH 7,2) und auf ein Volumen von 5 mL eingengt. Die Proteinlösung wurde auf eine Superdex75-Säule aufgetragen, die zuvor mit Puffer L (1 M Harnstoff, 50 mM NaOAc, 150 mM NaCl, pH 5,5) äquilibriert wurde. Die eigentliche Gelfiltration wurde ebenfalls mit Puffer L bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL min^{-1} durchgeführt, die UV-Absorption bei 280 nm wurde kontinuierlich aufgezeichnet und das Filtrat fraktioniert gesammelt. Fraktionen, die das jeweilige Prionenkonstrukt enthielten, wurden mittels SDS-PAGE-Analyse identifiziert und zu weiteren Untersuchungen verwendet.

2.3.6. S-Methylierung der Cysteine

Zur Reduktion der einzelnen Prionenprotein-Konstrukte wurden die Cysteingruppen des Proteins nach einer etablierten Methode methyliert (Heinrikson 1971). Hierzu wurde das Protein nach Abschluss der Gelfiltration (s. Abschnitt 2.3.5.) in eine Lösung bestehend aus 8 M Harnstoff und 25% Acetonitril (v/v), pH 8,5 überführt. β -Mercaptoethanol wurde im zwölffachen Überschuss über die freien SH-Gruppen des Proteins zugegeben und eine Stunde bei 50°C inkubiert. Nach dem Abkühlen der Lösung auf 37°C wurde im zweifachen Überschuss über die freien SH-Gruppen des Proteins und des β -Mercaptoethanols Methyl-4-Nitrobenzolsulfonat (MNBS) aus einer 0,6 M Lösung in Acetonitril zugesetzt. Der Methylierungsansatz wurde zwei Stunden bei 37°C inkubiert und daraufhin fünfmal gegen je 7 L deionisiertes Wasser, pH 2,0 dialysiert.

2.4. NMR-Spektroskopie

2.4.1. Herstellung der NMR-Proben

Für die verschiedenen hier durchgeführten NMR-Experimente wurden Proben mit ^{15}N - bzw. $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markierten Proteinen hergestellt. Das jeweilige Protein, das man entweder im oxidierten oder im reduzierten Zustand erhalten hatte, wurde zunächst in 8,8 M Harnstoff, pH 2,0 überführt und daraufhin auf 450 μL eingengt. Es wurden 1 mM Trimethylsilylpropionat (TMSP) und 10% D_2O zugefügt, so dass die Endkonzentration des Harnstoffs bei 8 M und die Proteinkonzentration zwischen 200 und 500 μM lagen. Die Proteinlösung wurde in ein NMR-Röhrchen überführt und mit Parafilm versiegelt.

2.4.2. Aufnahme von zwei- und dreidimensionalen NMR-Spektren

Zweidimensionale [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$]-HSQC-Spektren wurden an vollständig ^{15}N -markierten bzw. vollständig $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markierten Proben durchgeführt. Dreidimensionale NMR-Experimente wurden an vollständig $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ -markierten Proben durchgeführt. Experimente, die für die sequentielle Resonanzzuordnung der verschiedenen PrP-Konstrukte verwendet wurden, sind schematisch in Abb. 2.4 dargestellt. Die jeweiligen Akquisitions- und Prozessierungsparameter sind im Anhang in den Tabellen 5.2 bis 5.5 aufgeführt. Es wurden Standardpulsprogramme der Firma Bruker in der Version 3.5.b.15 verwendet; die Prozessierung der gewonnenen Daten erfolgte mit der Software TOPSPIN 2.0 und TOPSPIN 2.1.

Die sequentielle Resonanzzuordnung des Proteinrückgrates von hPrP^{ox} , hPrP^{red} , mPrP^{ox} und mPrP^{red} wurde auf der Basis der aufgenommenen dreidimensionalen NMR-Spektren mit dem Programm CARA durchgeführt (Keller 2004).

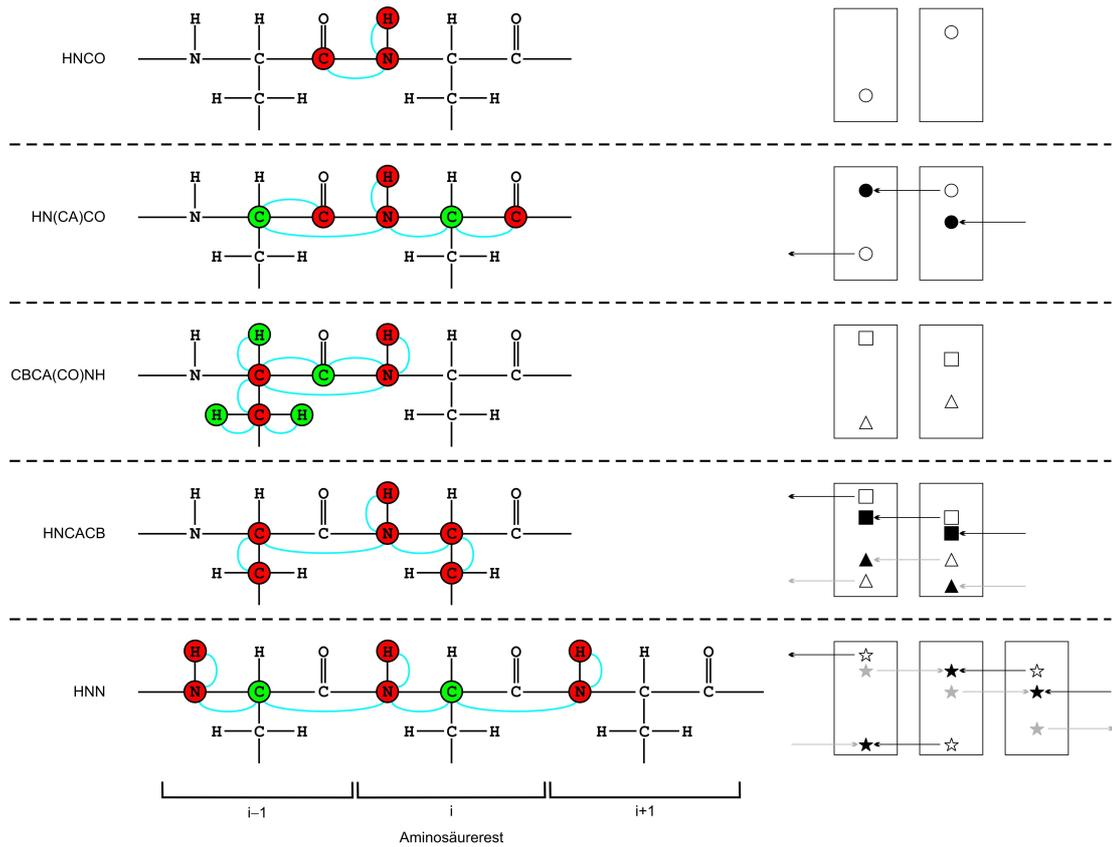


Abb. 2.4: Magnetisierungstransfer für das HNCO- (Grzesiek & Bax 1992), HN(CA)CO- (Clubb et al 1992), CBCA(CO)NH- (Grzesiek & Bax 1992), HNCACB- (Wittekind & Mueller 1993) und HNN-Experiment (Bhavesh et al 2001; Panchal et al 2001). Rot gekennzeichnet sind Atome, deren chemische Verschiebung gemessen wird, grün gekennzeichnet sind dagegen Atome, die zwar am Magnetisierungstransfer beteiligt sind, aber im endgültigen Spektrum nicht beobachtet werden. Die blauen Linien zeigen den Magnetisierungstransfer an. Weiterhin angegeben sind die Peakmuster für die einzelnen 3D-Experimente. Weiße Symbole stehen dabei für Resonanzen der vorhergehenden Aminosäure $i-1$, schwarze Symbole für die eigene Aminosäure i , graue Symbole für die nachfolgende Aminosäure $i+1$. Kreise symbolisieren CO-, Vierecke C α -, Dreiecke C β - und Sterne N-Resonanzen. Die Pfeile zeigen den sequentiellen Walk durch die verschiedenen Strips an.

2.4.3. Messung von chemischen Verschiebungen

Aus den verschiedenen zwei- und dreidimensionalen NMR-Spektren konnten die chemischen Verschiebungen der $^1\text{H}^{\text{N}}$ -, ^{15}N -, $^{13}\text{C}_{\alpha}$ -, $^{13}\text{C}_{\beta}$ -, ^{13}CO - und $^1\text{H}_{\alpha}$ -Resonanzen mit Hilfe des Programms Sparky ermittelt werden. Abweichungen der chemischen Verschiebungen von den jeweiligen *random coil* Werten – so genannte sekundäre chemische Verschiebungen – hängen von der konformationellen Präferenz des Proteinrückgrates ab. Da die chemischen Verschiebungen aber auch von

benachbarten Aminosäureresten beeinflusst werden, wurden die *random coil* chemischen Verschiebungen mit einem sequenzabhängigen Algorithmus, der im Programm NMRView implementiert ist, korrigiert (Schwarzinger et al 2001; Wishart et al 1995). Die sekundären chemischen Verschiebungen wurden daraufhin durch Subtraktion der gemessenen chemischen Verschiebungen von den sequenzkorrigierten *random coil* Werten für alle zugeordneten Resonanzen bestimmt.

Um die Bildungswahrscheinlichkeit von Residualstrukturen besser quantifizieren und vergleichen zu können, wurde die so genannte SSP-Analyse durchgeführt (Marsh et al 2006). Dabei werden die chemischen Verschiebungen verschiedener Kerne in einem Diagramm kombiniert, das dann den zu erwartenden Anteil an α - oder β -Struktur anzeigt. Der Beitrag der verschiedenen verwendeten chemischen Verschiebungen wird dabei gewichtet nach deren Sensitivität für α - und β -Strukturen. Gleichung 2.1 zeigt die SSP-Berechnung für eine Aminosäure i .

$$SSP_i = \frac{\sum_{j=i-2}^{i+2} \sum_X \left\{ \begin{array}{l} \frac{|\Delta\delta X_{j,obs}|}{\sigma_{j\alpha}} \text{ wenn } (\Delta\delta X_{j,obs}) (\Delta\delta X_{j,\alpha}) > 0 \\ - \frac{|\Delta\delta X_{j,obs}|}{\sigma_{j\beta}} \text{ wenn } (\Delta\delta X_{j,obs}) (\Delta\delta X_{j,\beta}) > 0 \end{array} \right.}{\sum_{j=i-2}^{i+2} \sum_X \left\{ \begin{array}{l} \frac{|\Delta\delta X_{j,\alpha}|}{\sigma_{j\alpha}} \text{ wenn } (\Delta\delta X_{j,obs}) (\Delta\delta X_{j,\alpha}) > 0 \\ + \frac{|\Delta\delta X_{j,\beta}|}{\sigma_{j\beta}} \text{ wenn } (\Delta\delta X_{j,obs}) (\Delta\delta X_{j,\beta}) > 0 \end{array} \right.} \quad \text{Gl. (2.1)}$$

Dabei entspricht $\Delta\delta X_{j,obs}$ der beobachteten sekundär chemischen Verschiebung, $\Delta\delta X_{j,\alpha}/\beta$ der gemittelten sekundär chemischen Verschiebung einer vollständigen Sekundärstruktur (α -Helix oder β -Faltblatt) und $\sigma_{j\alpha}/\beta$ den Standardabweichungen von $\delta X_{j,\alpha}/\beta$. Die Summierung über X gilt für alle verwendeten chemischen Verschiebungen, in diesem Fall für C_α und C_β . Zudem wird über ein Fenster von fünf Aminosäuren gemittelt.

Ein SSP_i -Wert von 1 entspricht einer vollständig geformten α -Struktur, ein SSP_i -Wert von -1 entspricht einer vollständig geformten β -Struktur. Ein SSP_i -Wert von 0,5 zeigt dagegen an, dass 50% der Konformere im entfalteten Zustand in einer α -helikalen Struktur an Position i vorliegen.

2.4.4. Messung und Berechnung von Relaxationsraten

Die verschiedenen Relaxationsexperimente zur Messung von longitudinalen (R_1), transversalen (R_2) und rotating-frame longitudinalen ($R_{1\rho}$) Relaxationsraten sowie von ^1H - ^{15}N -NOEs wurden an vollständig ^{15}N -markierten Proben der Protein-Konstrukte hPrP^{ox}, hPrP^{red}, mPrP^{ox} und mPrP^{red} durchgeführt. R_1 -, R_2 - und $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten wurden jeweils bestimmt durch die Aufnahme von acht 2D-Spektren mit Relaxationsdelays von 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500 und 2000 ms für R_1 , 34, 68, 102, 136, 170, 238, 272 und 374 ms für R_2 bzw. 20, 60, 100, 160, 200, 250, 300 und 360 ms für $R_{1\rho}$. Die Wartezeit zwischen zwei FIDs betrug in allen Fällen 2 s. Die Intensitäten der einzelnen Peaks wurden in allen 2D-Spektren mit dem Programm Sparky ermittelt und als Funktion des jeweiligen Relaxationsdelays aufgetragen. In allen Fällen konnten die Relaxationsraten mit einer monoexponentiell fallenden Funktion der allgemeinen Form

$$y = a \cdot e^{-bx} \quad \text{Gl. (2.2)}$$

mit dem Programm SigmaPlot 10.0 gefittet werden (Abb. 2.5).

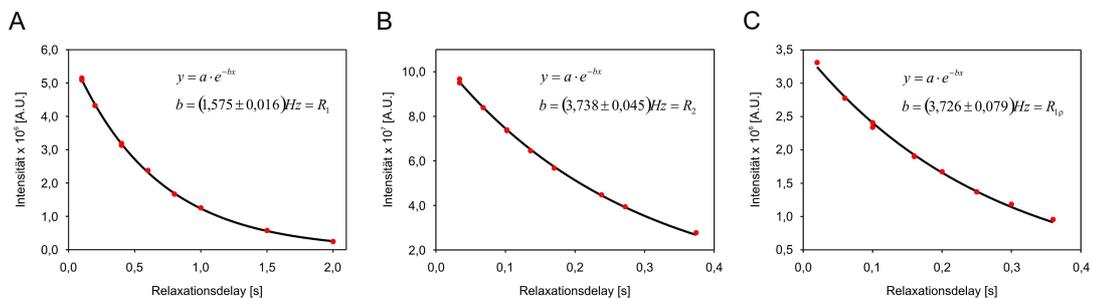


Abb. 2.5: Bestimmung der R_1 - (A), R_2 - (B) und $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten (C) am Beispiel der Aminosäure D_{144} des hPrP^{ox} durch Fitting der aufgenommenen delay-abhängigen Intensitäten (rote Punkte) mit einer monoexponentiell fallenden Funktion der allgemeinen Form $y = a \cdot e^{-bx}$ (schwarze Linie). Der Wert b , gleichbedeutend mit dem jeweiligen Relaxationswert, ist zusammen mit der entsprechenden Standardabweichung angegeben.

2.4.5. Mathematische Beschreibung der R_2 - und $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten

R_2 - und $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten werden durch das folgende mathematische Modell beschrieben (Collins et al 2005; Klein-Seetharaman et al 2002):

Relaxationsraten für unverzweigte, denaturierte Polypeptide (hier: hPrP^{red} bzw. mPrP^{red}) lassen sich durch die Gleichungen 2.3 und 2.4 beschreiben.

$$R_{red}^{rc}(i) = R_{int}^{red} \sum_{j=1}^N e^{-\frac{|i-j|}{\lambda_0^{red}}} \quad \text{Gl. (2.3)}$$

$$R^{clust}(i) = R_{Cluster} \sum_{j=1}^{N_{Cluster}} e^{-0,5 \left(\frac{|i - \chi_{Cluster}|}{\lambda_{Cluster}} \right)^2} \quad \text{Gl. (2.4)}$$

N bezeichnet die Anzahl der Aminosäurereste, R_{int}^{red} ist ein Maß für die intrinsische Relaxationsrate und wird durch die Viskosität und Temperatur der Lösung bestimmt. λ_0^{red} ist die Persistenzlänge der Polypeptidkette. Mit den entsprechenden Werten, eingesetzt in Gleichung 2.3, lässt sich die Relaxationsraten-Basislinie für eine unverzweigte, denaturierte Polypeptidkette berechnen.

Abweichungen im *random coil* Verhalten aufgrund von hydrophoben Clustern lassen sich durch Gleichung 2.4 beschreiben. $R_{Cluster}$, $\chi_{Cluster}$ und $\lambda_{Cluster}$ sind Variablen und ein Maß für die Amplitude, Position bzw. Persistenzlänge des jeweiligen hydrophoben Clusters. $N_{Cluster}$ steht für die Anzahl der hydrophoben Cluster.

Das mathematische Gesamtmodell zur Beschreibung der Relaxationsraten für hPrP^{red} und mPrP^{red} besteht dementsprechend aus der Addition der einzelnen Komponenten für die Basislinie (Gleichung 2.3) und den hydrophoben Clustern (Gleichung 2.4).

$$R_{Gesamt}^{red}(i) = R_{red}^{rc}(i) + R^{Clust}(i) \quad \text{Gl. (2.5)}$$

Da Cysteine, die innerhalb einer Polypeptidkette bei der Ausbildung einer Disulfidbrücke involviert sind, eine zusätzliche intramolekulare Bindung besitzen, wird für verzweigte, denaturierte Polypeptide (hier: hPrP^{ox} bzw. mPrP^{ox}) zur mathematischen Beschreibung der Relaxationsraten-Basislinie Gleichung 2.6 verwendet.

$$R_{ox}^{rc}(i) = R_{int}^{ox} \sum_{j=1}^N e^{-\frac{dm_{ij}}{\lambda_0^{ox}}} \quad \text{Gl. (2.6)}$$

$$R^{dsb}(i) = R_{Cys} \sum_{j=1}^{N_{Cys}} e^{-\frac{|i-Cys_j|}{\lambda_{dsb}}} \quad \text{Gl. (2.7)}$$

Die dort verwendete topologische Distanzmatrix dm_{ij} bezeichnet dabei eine $N \times N$ -Matrix und enthält die Information über den kürzesten Weg zwischen den Aminosäureresten i und j in Bezug auf die Anzahl der kovalenten Bindungen. Dabei werden die Peptidbindung und die Disulfidbindung gleichwertig als kovalente Bindung behandelt.

Gleichung 2.7 beschreibt die Veränderung, die durch das Vorhandensein einer Disulfidbrücke und einer daraus resultierenden höheren Steifigkeit hervorgerufen wird. N_{Cys} ist die Anzahl der in Disulfidbrücken involvierten Cysteine, R_{Cys} und λ_{dsb} sind ein Maß für Amplitude und Persistenzlänge der Disulfidbrücke. Cys_j bezeichnet die Position des jeweiligen Cysteinrestes innerhalb der Polypeptidkette. Das mathematische Gesamtmodell zur Beschreibung der Relaxationsraten für hPrP^{ox} und mPrP^{ox} besteht dementsprechend aus der Addition der einzelnen Komponenten für die Basislinie (Gleichung 2.6), den hydrophoben Clustern (Gleichung 2.4) und dem Disulfidanteil (Gleichung 2.7).

$$R_{Gesamt}^{ox}(i) = R_{ox}^{rc}(i) + R^{Clust}(i) + R^{dsb}(i) \quad \text{Gl. (2.8)}$$

2.4.6. Messung und Berechnung von ¹H-¹⁵N-NOEs

Der heteronukleare NOE kann über eine Intensitätsänderung des NMR-Signals des Heteronukleus X – in diesem Falle ¹⁵N – bestimmt werden, wenn die Gleichgewichtsmagnetisierung der Protonen in der Umgebung durch Sättigung gestört wird. Um den ¹H-¹⁵N-NOE (${}^H_N \text{NOE}$) zu messen, muss ein Experimentenpaar aufgenommen werden, zum einen mit Sättigung (NOE) zum anderen ohne Sättigung (noNOE) der Protonen, die am ¹H-¹⁵N-Kern gebunden sind. Der ¹H-¹⁵N-NOE einer Resonanz lässt sich gemäß Gleichung 2.9 über die gemessenen Kreuzpeak-

Intensitäten jeweils in Gegenwart (I_{NOE}) oder Abwesenheit (I_{noNOE}) der Protonensättigung bestimmen.

$${}^H_N NOE = \frac{I_{NOE}}{I_{noNOE}} \quad \text{Gl. (2.9)}$$

Der Fehler im H_N - ${}^{15}N$ -NOE-Wert wurde durch Bestimmung der Standardabweichung von ${}^H_N NOE$, $\sigma_{{}^H_N NOE}$, gemäß Gleichung 2.10 bestimmt:

$$\sigma_{{}^H_N NOE} = {}^H_N NOE \sqrt{\left(\frac{\sigma_{I_{NOE}}}{I_{NOE}}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_{I_{noNOE}}}{I_{noNOE}}\right)^2} \quad \text{Gl. (2.10)}$$

Hierbei stehen $\sigma_{I_{NOE}}$ bzw. $\sigma_{I_{noNOE}}$ jeweils für die Standardabweichungen des Rauschens im gesättigten bzw. ungesättigten Spektrum (Farrow et al 1994).

2.5. Messung von Aggregationskinetiken mittels Fluoreszenzspektroskopie

Der Einfluss der Disulfidbrücke sowie die Auswirkungen verschiedener Punktmutationen auf das Aggregationsverhalten des murinen Prionenproteins wurden fluoreszenzspektroskopisch mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin T (ThT) betrachtet. Hierzu wurden die verschiedenen Proteinkonstrukte zunächst nach der Gelfiltration (s. Abschnitt 2.3.5.) dreimal gegen je 7 L deionisiertes Wasser, pH 2.0 dialysiert. Abhängig von der vorhandenen Proteinmenge wurden mehrere Proben einer jeweiligen Maus-Mutante mit verschiedenen Proteinkonzentrationen in 1 mL deionisiertem Wasser, pH 2.0 aufgenommen. Zur Auslösung der Aggregation wurde die jeweilige Probe mit 1 mL Puffer F (1 M Harnstoff, 1 M Guanidiniumhydrochlorid, 50 μ M ThT, pH 2,0) gemischt. Die Aggregation wurde in einem Fluoreszenzspektrometer der Firma Jasco bei einer Anregungswellenlänge von 450 nm und einer Emissionswellenlänge von 482 nm verfolgt. Die Spaltbreiten für Anregung und Emission lagen bei jeweils 5 nm. Jede Sekunde wurde ein Datenpunkt aufgenommen.

Zur Auswertung wurden die Datenpunkte für jede Aggregationskinetik über ein Fenster von 20 Sekunden gemittelt. Die einzelnen Kurven konnten daraufhin mit einer monoexponentiell ansteigenden Funktion der allgemeinen Form

$$y = y_0 + a \cdot (1 - e^{-bx}) \quad \text{Gl. (2.11)}$$

beschrieben werden.

Über die zwischen 0 und 1 normierten Kinetiken ließen sich schließlich die Zeitpunkte, an der die halbmaximalen Fluoreszenzintensitäten $t_{1/2}$ erreicht wurden mit $y = 0,5$ und $x = t_{1/2}$ berechnen durch

$$t_{1/2} = -\frac{\ln\left(\frac{a - 0,5 - y_0}{a}\right)}{b}. \quad \text{Gl. (2.12)}$$

Der hier für den Nachweis von fibrillären Strukturen des Prionproteins verwendete kationische Benzothiazol-Farbstoff Thioflavin T (Abb. 2.6) ist dafür bekannt, eine Bindung mit amyloiden Strukturen einzugehen (Ban et al 2003; Naiki et al 1989; Uversky et al 2001; Uversky et al 2002). Durch die Bindung an Fibrillen erhöht sich die Fluoreszenzintensität von ThT bei einer Wellenlänge von 482 nm nach einer Anregung bei 450 nm (Levine 1993). Der Mechanismus hinter diesem Phänomen und die genaue Superstruktur, an die ThT bindet, sind nicht bekannt. Es wird aber angenommen, dass der Farbstoff in wässriger Lösung Micellen ausbilden kann und dass die Bindung dieser Micellen an die Fibrillen die Fluoreszenzänderung auslöst (Khurana et al 2005). Eine weitere Theorie besagt, dass monomeres ThT an oder in Kanälen, die durch die β -Faltblattstrukturen der Fibrillen gebildet werden, gebunden werden kann (Krebs et al 2005).

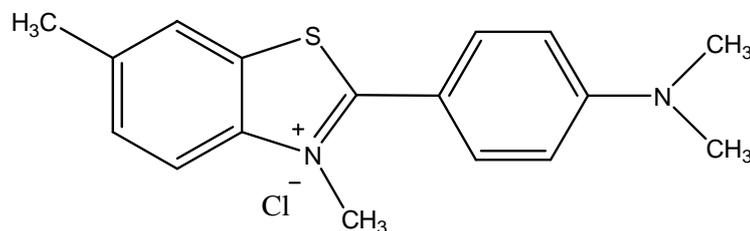


Abb. 2.6: Chemische Struktur des kationischen Benzothiazol-Farbstoffs Thioflavin T.

2.6. CD-Spektroskopie

CD-Wellenlängenspektren wurden an einem Jasco J-810 Spektralpolarimeter aufgenommen. Die Messungen wurden in einer 1 mm langen Quartzküvette durchgeführt, die Proteinkonzentration lag jeweils bei 30 μM . Die verwendeten Pufferbedingungen sind in den jeweiligen Abbildungen angegeben.

Bei Proteinen ist es üblich, die molare Elliptizität bezogen auf die Anzahl der Peptidbindungen anzugeben. Die molare Elliptizität $[\theta]$ (in $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) errechnet sich aus

$$[\theta] = \frac{\theta M_0}{10c_0 d n_r} . \quad \text{Gl. (2.13)}$$

Hierbei bezeichnet θ die gemessene Elliptizität in mdeg, M_0 ist das Molekulargewicht des Proteins in g mol^{-1} , c_0 ist die Proteinkonzentration in mg mL^{-1} , d ist die optische Weglänge in cm und n_r bezeichnet die Anzahl der Aminosäurereste.

2.7. Analytik

2.7.1. Agarose-Gelelektrophorese

Zu analytischen Zwecken wurden DNA-Fragmente elektrophoretisch mit Hilfe von 1%igen Agarose-Gelen (w/v) aufgetrennt [Sambrook & Russell, 2001]. Die Proben wurden in Orange-G-Auftragspuffer aufgenommen. Bei der Elektrophorese in TAE-Puffer wurde für eine Stunde eine Spannung von 100 mV angelegt, anschließend wurde das Gel für 30 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt. Zu Dokumentationszwecken wurde das Gel auf einem UV-Durchlichttisch mit Hilfe einer Digitalkamera mit UV-Filter aufgenommen.

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

Eine elektrophoretische Auftrennung von Proteinen ging mit der Verwendung von denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen nach einer Methode von U. K. Laemmli [Laemmli, 1970] einher.

SDS ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen so effektiv, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel erhält man über bestimmte Bereiche eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungsstrecken der SDS-Polypeptid-Micellen. Mit Hilfe von Standards lassen sich die Molekulargewichte der Proteine ermitteln.

Es wurden 5%ige Sammelgele und 15%ige Trenngele gegossen, wobei die Dicke der Gele 0,7 mm betrug; weiterhin wurden Kämme mit zehn bzw. 15 Spacern verwendet. Bei der Probenvorbereitung wurden die Proben in Probenpuffer aufgenommen und für zehn Minuten auf 95°C erhitzt; so wurden die Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Disulfidbrücken zwischen Cysteinen wurden durch Zugabe der reduzierenden Thiolverbindung β -Mercaptoethanol aufgespalten.

Sobald die Proben in die Geltaschen eingefüllt worden waren, wurde ein Strom von 30 mA eingestellt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zur Anfärbung für 30 Minuten in die Coomassie Blau-Färbelösung eingelegt, anschließend erfolgte die Entfernung des überschüssigen Farbstoffs in der Entfärbelösung, in der sich das Gel für mindestens 90 Minuten befand. Zu Dokumentationszwecken wurde das Gel mit einer Digitalkamera auf einem Durchlichttisch fotografiert.

2.7.3. Proteinbestimmung mittels UV-Spektroskopie

Die Absorption elektromagnetischer Strahlung mit einer vorgegebenen Energie bzw. Wellenlänge wird durch das Lambert-Beersche Gesetz beschrieben. Dabei wird vorausgesetzt, dass die absorbierende Substanz homogen in der Lösung verteilt ist, dass keine Lichtstreuung vorliegt und keine Photoreaktionen in der Lösung stattfinden. Die Absorption A eines derart gelösten Stoffes beträgt dann für monochromatisches Licht

$$A = \log \left[\frac{I_0}{I} \right] = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{Gl. (2.14)}$$

wobei I_0 die Intensität der einfallenden Strahlung und I die Intensität der aus der Messlösung austretenden Strahlung angibt. Weiterhin bezeichnet ε den molaren Extinktionskoeffizienten in $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, d die optische Weglänge in cm und c die Konzentration des absorbierenden Stoffes in mol L^{-1} .

Der molare Extinktionskoeffizient ε eines Proteins kann aus der Primärstruktur abgeschätzt werden (Gill & Hippel 1989). Der verwendete molare Extinktionskoeffizient für hPrP(121–230) beträgt bei einer eingestrahnten Wellenlänge von 280 nm $14200 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, der für die verschiedenen mPrP(121–232)-Konstrukte bei gleicher Wellenlänge $22015 \text{ L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$, jeweils berechnet mit der Software ExPASy ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>).

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Aufreinigung der verschiedenen Prionenprotein-Konstrukte

Die verschiedenen Prionenprotein-Konstrukte (hPrP(121–230), *wt*-mPrP(121–232) und *mut*-mPrP(121–232)) wurden jeweils in *E. coli* exprimiert. Die Überexpression des Prionenproteins durch Induktion mit 1 mM IPTG konnte mittels SDS-Gel-Analyse gezeigt werden (Abb. 3.1). Für hPrP(121–230) und *wt*-mPrP(121–232) konnten bei Expression in LB-Medium jeweils etwa 4 mg L⁻¹ ungelabeltes Protein, bei Expression in M9-Medium jeweils etwa 3 mg L⁻¹ ¹⁵N- bzw. ¹³C,¹⁵N-markiertes Protein aufgereinigt werden. Die für die verschiedenen *mut*-mPrP(121–232)-Konstrukte davon abweichenden Expressionsmengen werden in Abschnitt 3.5. näher betrachtet.

Aus den mittels Ultraschall aufgeschlossenen *E. coli*-Zellen wurde das ^{His}PrP-Konstrukt in einem ersten Aufreinigungsschritt über eine Ni-NTA-Säule affinitätschromatographisch separiert (Abb. 3.2).

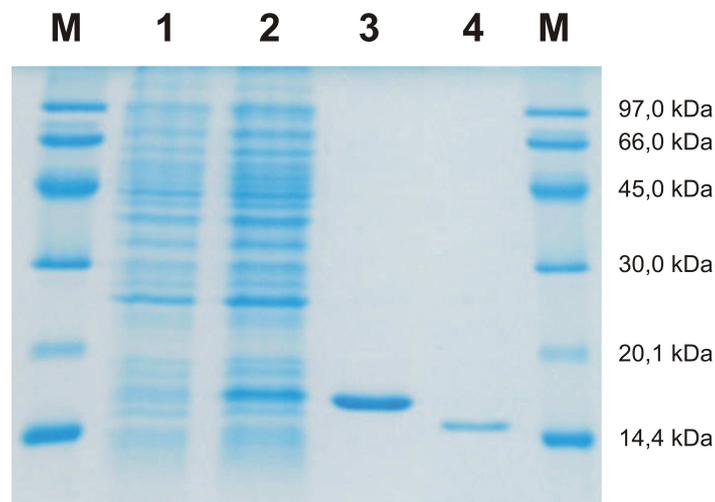


Abb. 3.1: 15%iges SDS-Gel zur Dokumentation des Aufreinigungserfolges des Prionenproteins am Beispiel des hPrP(121–230). Aufgetragen sind Proben von transformierten *E. coli*-Zellen vor der Induktion mit IPTG (1), sowie 4 Stunden nach der Induktion mit IPTG (2). Es folgen die vereinigten Fraktionen, die durch eine immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie erhalten wurden (3) und die vereinigten Fraktionen, die – nach Abspaltung des N-terminalen His-tags – bei der Gelfiltration gesammelt wurden (4). Zusätzlich wurde als Größenstandard ein Marker (M) aufgetragen; die den Banden entsprechenden Molekulargewichte sind angegeben.

Zunächst wurde das Ni-NTA-Säulenmaterial mit einem denaturierenden Puffer äquilibriert, was durch einen Anstieg der Leitfähigkeit verfolgt werden konnte. Nach der Bindung des ^{His}PrP-Konstrukts an das Säulenmaterial wurde ein linearer Gradient mit dem nativen Puffer B durchgeführt, wodurch zum einen ungebundene Proteine, die sich im Zelllysate befanden, abgetrennt werden konnten; zum anderen faltete sich das ^{His}PrP-Konstrukt auf der Säule aufgrund der weniger denaturierenden werdenden Umgebung in eine native Konformation. Der sich nach dem Gradient anschließende Waschschritt mit Puffer W trennte unspezifisch gebundene Proteine ab, bevor das ^{His}PrP-Konstrukt mit einem hochkonzentrierten Imidazolpuffer (Puffer E) eluiert wurde. Die Proteinelution konnte UV-spektrometrisch verfolgt werden. Zur Steigerung der Ausbeute wurde die gesamte Aufreinigungsstrategie wiederholt.

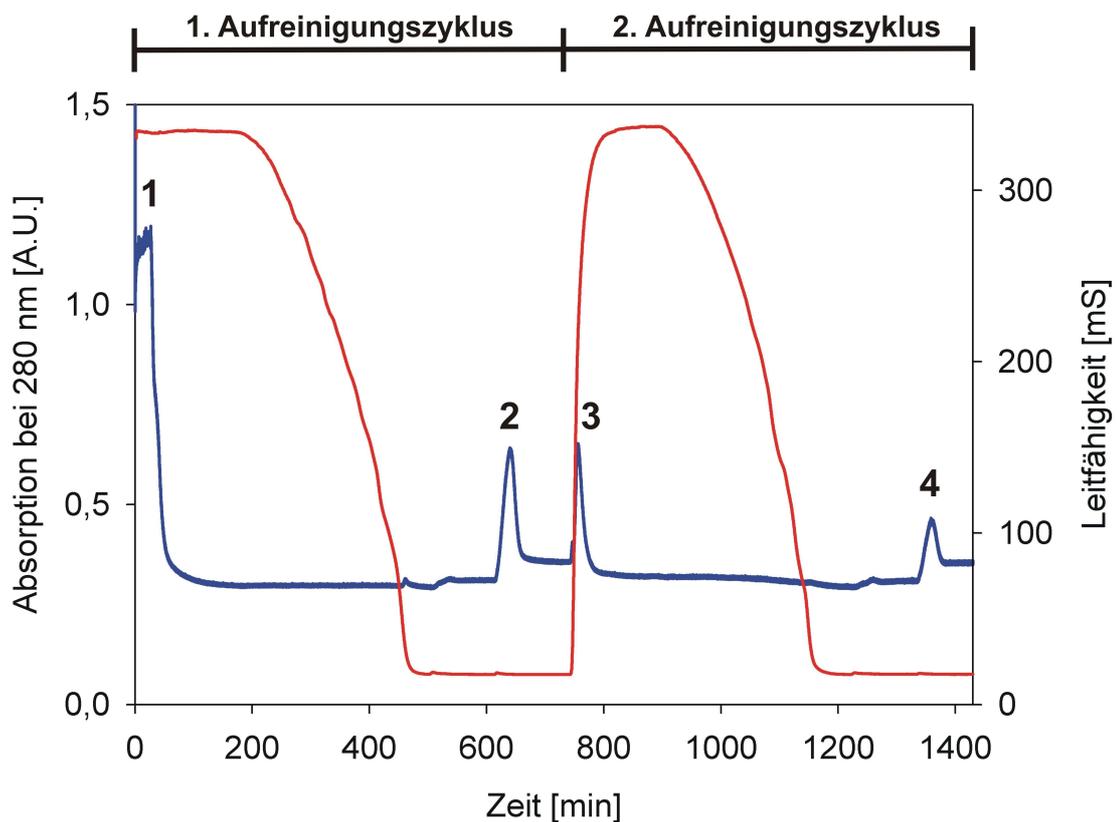


Abb. 3.2: Chromatogramm der PrP-Aufreinigung über eine immobilisierte Metallchelataffinitätssäule. Das Absorptionssignal bei 280 nm ist durch die blaue Kurve wiedergegeben, die rote Kurve beschreibt den Verlauf der Leitfähigkeit. Das UV-Signal zeigt vier Ausschläge: 1) Ungebundene Proteine aus dem Zelllysate, 2) Elution des ^{His}PrP-Konstrukts nach dem 1. Aufreinigungszyklus, 3) Elution des an das Säulenmaterial gebundenen Imidazols durch Puffer G, 4) Elution des ^{His}PrP-Konstrukts nach dem 2. Aufreinigungszyklus.

Bereits durch diesen Chromatographieschritt lag das Prionenprotein zu mehr als 95% in reiner Form vor (Abb. 3.1).

Im weiteren Verlauf wurde der N-terminale His-tag abgespalten, im Falle des hPrP(121–230) mit TEV-Protease, bei den mPrP(121–231)-Konstrukten mit Thrombin. Auch hier konnte durch ein SDS-Gel gezeigt werden, dass nach einer Inkubation von 24 Stunden mit der jeweiligen Protease der His-tag vollständig abgespalten werden konnte, was durch eine Verringerung des Molekulargewichts und ein entsprechend schnelleres Laufverhalten im SDS-Gel zum Ausdruck kam (Abb. 3.1).

Um den abgespaltenen His-tag und die Protease vom Prionenprotein-Konstrukt zu trennen, wurde das Proteingemisch in Puffer A überführt und über einer in Puffer L äquilibrierten Gelfiltrationssäule durch das Prinzip der Größenausschlusschromatographie aufgetrennt (Abb. 3.3). Eine abschließende SDS-Gel-Analyse zeigte, dass das Protein in reiner Form vorlag (Abb. 3.1).

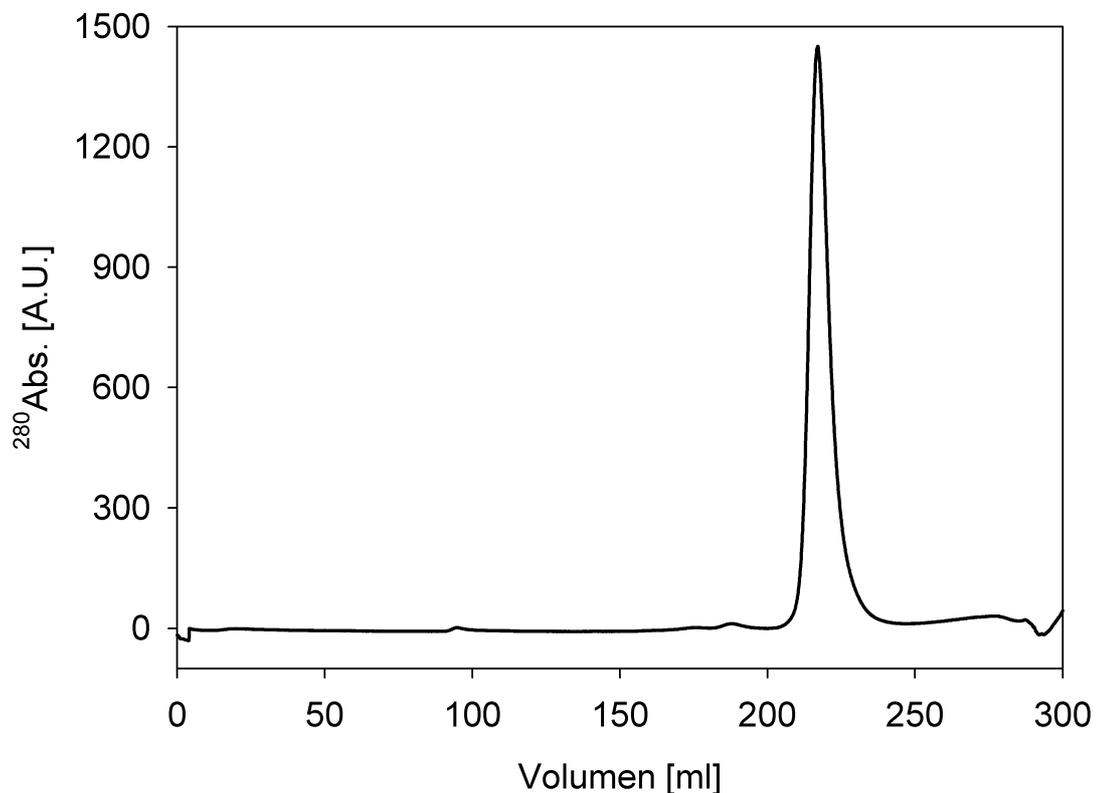


Abb. 3.3: Chromatogramm der Aufreinigung eines PrP-Konstrukts über eine Gelfiltrationssäule. Gezeigt ist die Absorption bei 280 nm in Abhängigkeit des über die Säule gelaufenen Flüssigkeitsvolumens. Das Retentionsvolumen des PrP-Konstrukts liegt bei ca. 217 mL.

3.2. Resonanzzuordnung des Proteinrückgrats

Die Voraussetzung zur Untersuchung der Struktur und Dynamik der verschiedenen PrP-Konstrukte sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand auf atomarer Ebene mittels NMR-Spektroskopie ist die Zuordnung der Resonanzen im Proteinrückgrat. Aufgrund der geringen Dispersion der Resonanzen im entfalteten Zustand und der sich daraus ergebenden Signalüberlagerung gestaltete sich die Resonanzzuordnung als schwierig und war nur durch Aufnahme zahlreicher NMR-Experimente möglich.

Zusammenfassend konnten für das hPrP(121–230) im oxidierten Zustand 101 der 107 möglichen HN-Kreuzpeaks und im reduzierten Zustand alle 107 HN-Kreuzpeaks zugeordnet werden.

Das HNCACB-Experiment ist für die sequentielle Resonanzzuordnung des Proteinrückgrats unerlässlich, da hier die Aminosäuren Alanin, Glycin, Serin und Threonin charakteristische $^{13}\text{C}_{\alpha}$ - und $^{13}\text{C}_{\beta}$ -chemische Verschiebungen besitzen. Diese Aminosäuren dienen daher als Startpunkte für die sequentielle Zuordnung. Ein Beispiel für die sequentielle Resonanzzuordnung mit Hilfe eines HNCACB-Experiments ist in Abb. 3.4A gezeigt.

Um die Resonanzzuordnung zu erleichtern, wurden zusätzlich noch HN(CA)CO- und HNN-Experimente aufgenommen und ausgewertet. Aus dem HN(CA)CO-Experiment konnten anschließend die ^{13}CO -Resonanzen erhalten werden.

Ein großer Vorteil des HNN-Experiments besteht darin, dass Kreuzpeaks sowohl für den Rest $i-1$ als auch $i+1$ existieren, was in Zusammenspiel mit den beiden anderen Experimenten eine eindeutige Resonanzzuordnung ermöglicht. Abb. 3.4B zeigt für das HNN-Experiment eine typische Sequenzzuordnung.

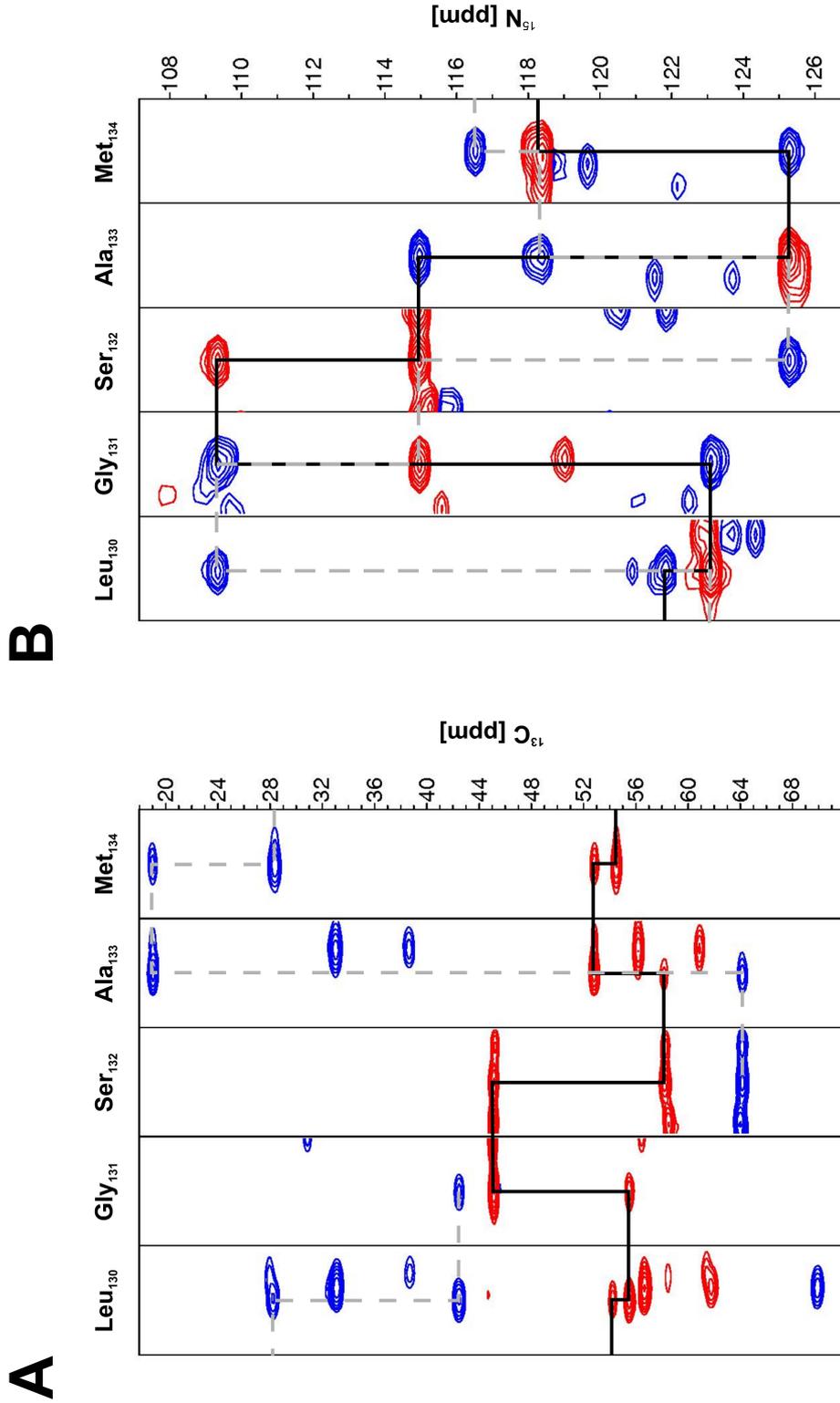


Abb. 3.4: Sequentielle Resonanzzuordnung des Proteinrückgrats unter Verwendung eines HNCACB- (A) und eines HNN-Experiments (B). Gezeigt sind jeweils die Aminosäurereste Leu₁₃₀–Met₁₃₄ von hPrp^{ox}. In A ist die Zuordnung der benachbarten C_α-Peaks durch eine schwarze Linie, die der C_β-Peaks durch eine graue Linie gezeigt. In B ist die Zugehörigkeit der N_i- und N_{i-1}-Peaks durch eine schwarze Linie, die der N_{i+1}- und N_{i+1}-Peaks durch eine graue Linie gezeigt.

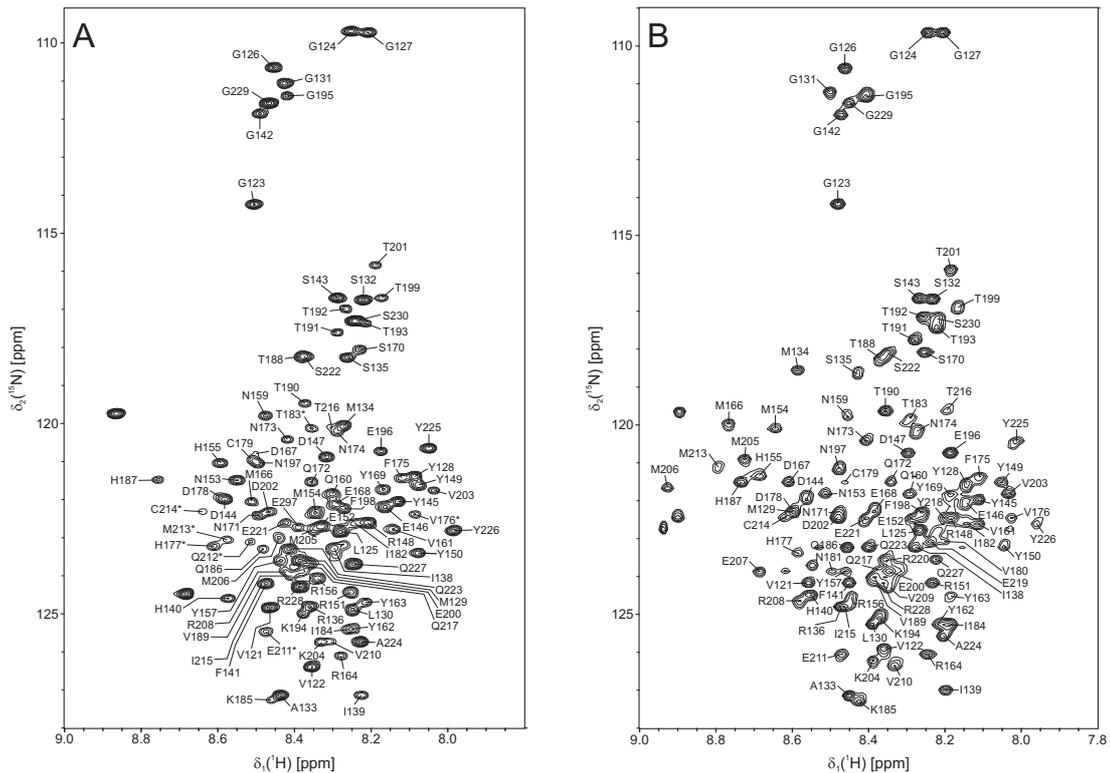


Abb. 3.5: $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektren der denaturierten Zustände von hPrP^{ox} (A) und hPrP^{red} (B), aufgenommen in 8 M Harnstoff, pH 2,0, 25°C. Peaks, die den entsprechenden Aminosäuren im Polypeptidrückgrat zugeordnet werden konnten, sind im Einbuchstabencode und mit der korrespondierenden Aminosäureposition im Protein (121 bis 230) angegeben.

Abb. 3.5 zeigt die Ergebnisse der Resonanzzuordnung an hPrP^{ox} und hPrP^{red} jeweils anhand eines aufgenommenen $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrums. Neben den zugeordneten Peaks verbleiben in beiden Spektren noch einige Peaks; diese stammen höchstwahrscheinlich von Seitenketten-NH-Gruppen, schwächere Peaks könnten von mitaufgereinigten Peptiden, Abbauprodukten oder schwach populierte alternativen Konformationen des Proteins stammen.

Die für entfaltete Proteine typische geringe Dispersion der chemischen Verschiebungen und die schmale Linienbreite in den HSQC-Spektren lassen den Schluss zu, dass die mit Harnstoff entfalteten Zustände von hPrP^{ox} und hPrP^{red} unter den hier durchgeführten Bedingungen größtenteils unstrukturiert vorliegen.

Dieser Rückschluss wird auch durch CD-spektroskopische Daten bestätigt (Abb. 3.6A). Während das CD-Spektrum des hPrP^{ox} in H_2O , pH 2,0 einen charakteristischen Verlauf für ein größtenteils α -helikales Protein annimmt, sind in Anwesenheit von 8 M Harnstoff keine Anzeichen mehr für

Sekundärstrukturelemente vorhanden. Interessanterweise führt auch die Reduktion der Disulfidbrücke zu Proteinkonstrukten, die – ebenso wie hPrP^{ox} in 8 M Harnstoff – keine bzw. nur noch sehr geringe Anteile an Sekundärstrukturelementen aufweisen. Um eine genauere Vorstellung von der harnstoffabhängigen Entfaltung des hPrP^{ox} zu erhalten, wurden CD-Spektren bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen aufgenommen und der Anteil an denaturierten Molekülen bestimmt (Abb. 3.6B). Erwartungsgemäß ergab sich eine sigmoidale Kurve mit einem Wendepunkt bei einer Harnstoffkonzentration von 3,3 M, d. h. bei dieser Konzentration liegen 50% denaturierte Moleküle vor.

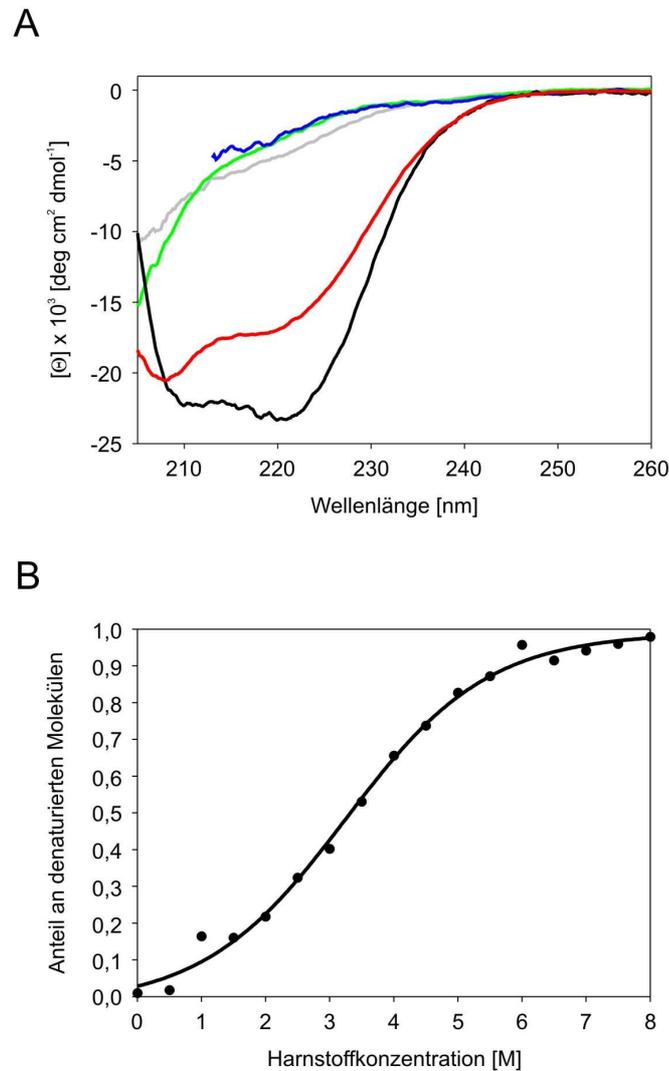


Abb. 3.6: (A) CD-Spektren von hPrP^{ox} in 10 mM NaOAc, pH 4,5 (schwarz), hPrP^{ox} in H₂O, pH 2,0 (rot), hPrP^{red} in H₂O, pH 2,0 (grün), hPrP^{red} in 10 mM NaOAc, pH 4,5 (grau) und hPrP^{ox} in 8 M Harnstoff, pH 2,0 (blau). Alle Spektren wurden bei 25°C aufgenommen. (B) Harnstoff-abhängige Denaturierung von hPrP^{ox}.

3.3. Untersuchung am harnstoffentfalteten Zustand von hPrP^{ox} und hPrP^{red}

3.3.1. Chemische Verschiebungen

Die Analyse der sekundär chemischen Verschiebungen der $^{13}\text{C}_{\alpha}$ -, $^{13}\text{C}_{\beta}$ -, ^{13}CO -, $^1\text{H}_{\alpha}$ und $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Resonanzen (Schwarzinger et al 2001; Wishart et al 1995) sowie des SSP-Algorithmus (Marsh et al 2006) – basierend auf den $^{13}\text{C}_{\alpha}$ - und $^{13}\text{C}_{\beta}$ -chemischen Verschiebungen – ergab für den in 8 M Harnstoff entfalteten Zustand sowohl von hPrP^{ox} als auch von hPrP^{red} die Existenz von Reststrukturen, die sich deutlich von den im nativen Zustand des hPrP vorhandenen Sekundärstrukturen unterscheiden (Abb. 3.7). Im Gegensatz zum nativen Zustand mit größtenteils α -helikalen Sekundärstrukturelementen ist der Anteil an diesen Strukturen im entfalteten Zustand von hPrP^{ox} bzw. hPrP^{red} sehr gering. Der zweite β -Strang, der sich im nativen Zustand ausbildet (β_2 : Val₁₆₁–Arg₁₆₄), bleibt andererseits im entfalteten Zustand erhalten; die Region zwischen Tyr₁₅₇–Pro₁₆₅ zeigt hier eine Wahrscheinlichkeit für eine β -Struktur von etwa 10%. Eine ebenso große Wahrscheinlichkeit für eine β -Struktur findet sich im Bereich Ser₁₃₅–Gly₁₄₂. Zwischen den Aminosäuren Ile₁₈₂–Val₁₈₉ existiert ebenfalls ein Bereich mit signifikanten Abweichungen der chemischen Verschiebungen zu den *random coil* Werten; hier beträgt die Wahrscheinlichkeit für eine β -Struktur 7%. Der SSP-Algorithmus gibt für den C-Terminus ebenfalls die Existenz einer β -Struktur an. Dies kann damit erklärt werden, dass die C-terminale Aminosäure (Ser₁₃₀) aufgrund ihrer Position im Protein eine starke Abweichung vom *random coil* Wert aufweist; entsprechend sind die starken Abweichungen am C-Terminus weniger auf reale strukturelle Präferenzen als auf diese Tatsache zurückzuführen.

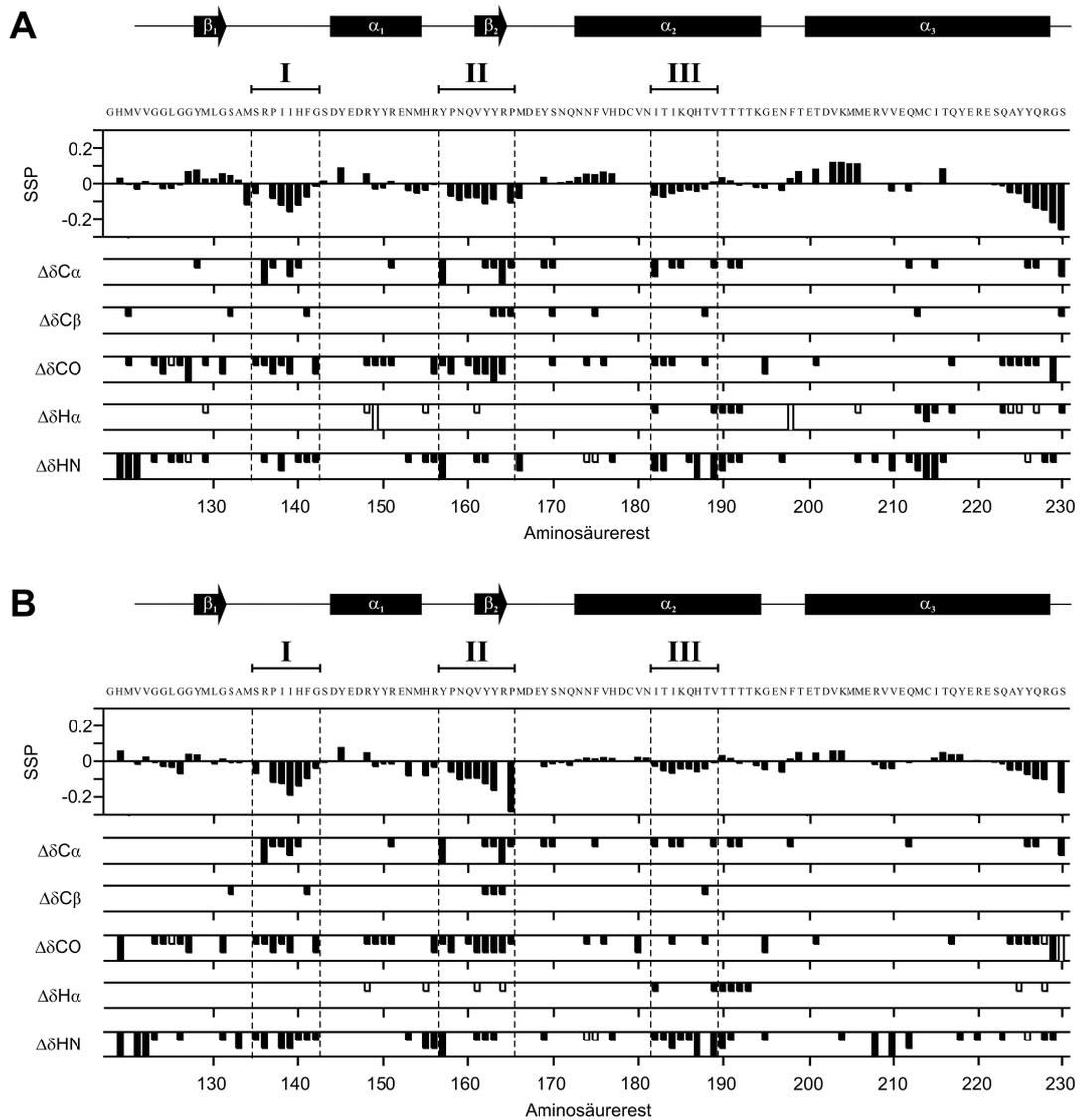


Abb. 3.7: SSP-Algorithmus (Marsh et al 2006) und normalisierte sekundäre chemische Verschiebungen für hPrP^{ox} (A) und hPrP^{red} (B) jeweils in 8 M Harnstoff, pH 2,0, 25°C. Signifikante sekundäre chemische Verschiebungen für C_α , C_β und CO ($|\Delta\delta| > 0,35$ ppm für eine Einheit, $|\Delta\delta| > 0,7$ ppm für zwei Einheiten und $|\Delta\delta| > 1,05$ für drei Einheiten) sowie signifikante sekundäre chemische Verschiebungen für H_α und H^N ($|\Delta\delta| > 0,1$ ppm für eine Einheit, $|\Delta\delta| > 0,2$ ppm für zwei Einheiten und $|\Delta\delta| > 0,3$ für drei Einheiten) sind durch vertikale Balken gekennzeichnet. Schwarze Balken stehen für eine β -Strangpräferenz, weiße Balken bezeichnen eine Präferenz für α -helikale Elemente. Regionen mit erhöhter Präferenz für β -Strutturen sind mit I–III gekennzeichnet, die nativen Sekundärstrukturelemente und die Aminosäuresequenz sind über der jeweiligen Graphik angegeben.

3.3.2. Relaxationsraten

Abb. 3.8 zeigt die R_2 - und $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten von hPrP^{ox} und hPrP^{red} . Die R_2^{ox} - und $R_{1\rho}^{\text{ox}}$ - bzw. R_2^{red} - und $R_{1\rho}^{\text{red}}$ -Raten zeigen jeweils keine Unterschiede, was darauf schließen lässt, dass in dem entfalteten Zustand des hPrP^{ox} bzw. hPrP^{red} keine Dynamiken auf μs -ms-Ebene stattfinden (Dayie & Wagner 1994; Deverell et al 1970; Szyperski et al 1993). Basierend auf den Unterschieden zwischen den experimentellen Daten und den vorausgesagten Relaxationsraten konnten Bereiche in der Polypeptidkette identifiziert werden, die eine höhere Steifigkeit besitzen als dies für eine ideale *random coil* Polypeptidkette erwartet werden konnte (Klein-Seetharaman et al 2002).

Im Fall des hPrP^{ox} gibt es die größte Abweichung zu den *random coil* Werten im Bereich der beiden Cysteine, Cys_{179} und Cys_{214} , die zusammen eine Disulfidbrücke bilden. Daraus kann man schließen, dass die Disulfidbrücke zu einer Versteifung der umliegenden Aminosäureregion führt. Die Abweichungen sind dabei größer als die Flexibilitätsabnahme annehmen ließe, die sich durch eine kovalente Bindung zwischen den Cysteinen ergäbe, was durch die rote Linie in Abb. 3.8 zum Ausdruck kommt. Zusätzlich können vier hydrophobe Cluster sowohl in hPrP^{ox} als auch in hPrP^{red} ausfindig gemacht werden; diese liegen (1) um Met_{129} zwischen Gly_{127} und Gly_{131} , (2) um die beiden Isoleucine Ile_{138} und Ile_{139} zwischen Ser_{135} und Gly_{142} , (3) um die beiden hydrophoben Tyrosine Tyr_{149} und Tyr_{150} zwischen Ser_{143} und Arg_{156} und (4) um die beiden Tyrosine Tyr_{162} und Tyr_{163} zwischen Asn_{159} und Tyr_{169} .

Die größten Unterschiede in den Dynamiken von hPrP^{ox} und hPrP^{red} liegen jedoch in den Bereichen um die beiden Cysteine, Cys_{179} und Cys_{214} . In der reduzierten Form führt die Aufspaltung der Disulfidbrücke zu einer Erhöhung der Flexibilität in diesem Bereich; darüber hinaus bleiben zusätzliche hydrophobe Cluster zurück (Abb. 3.8). Diese zusätzlichen hydrophoben Cluster liegen (5) zwischen den Aminosäuren Asn_{178} und Thr_{193} , (6) zwischen Phe_{198} und Met_{213} und (7) zwischen Ile_{215} und Gln_{227} . Die Positionen der Cluster stimmen dabei nur in Teilen mit dem Ergebnis des AABUF-Algorithmus (Rose et al 1985) überein und können somit nicht durch die Primärstruktur vorhergesagt werden.

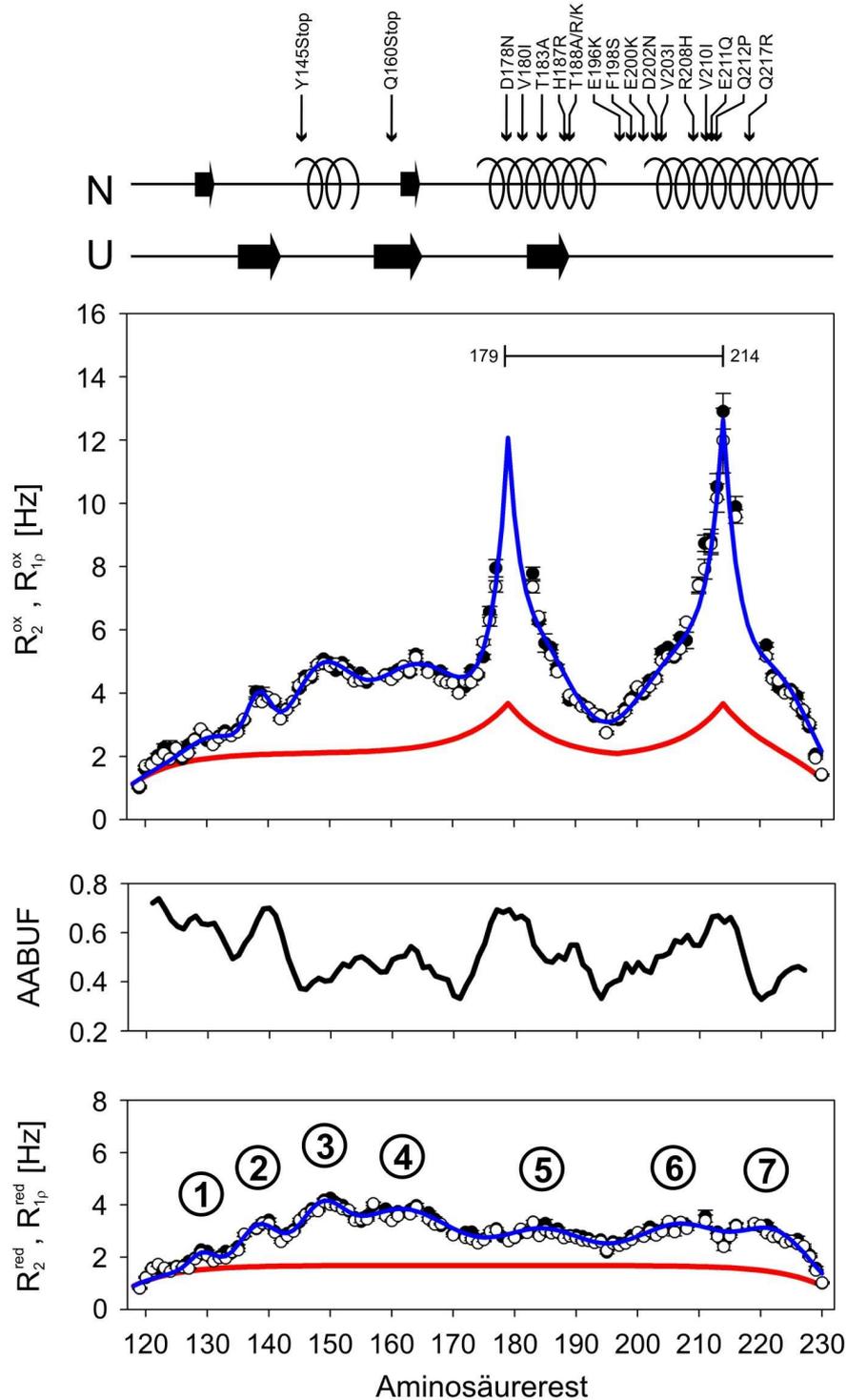


Abb. 3.8: R_2 - (schwarze Kreise) und R_{1p} -Relaxationsraten (weiße Kreise) von $hPrP^{ox}$ (oberes Bild) und $hPrP^{red}$ (unteres Bild) sind dargestellt. Die für ein *random coil* typischen Relaxationsraten (R_2^{rc}) sind jeweils durch die rote Kurve gezeigt ($R_{int}^{ox} = 0,17 \text{ s}^{-1}$, $\lambda_0^{ox} = 7$, $R_{int}^{red} = 0,15 \text{ s}^{-1}$, $\lambda_0^{red} = 7$), den Fit durch die gemessenen Relaxationsraten gibt jeweils die blaue Kurve an. Die nativen Sekundärstrukturelemente (N), Residualstrukturen im denaturierten Zustand (U) und Punktmutationen, die mit Krankheitsbildern assoziiert sind, sind angegeben. Zusätzlich dargestellt ist der AABUF-Algorithmus.

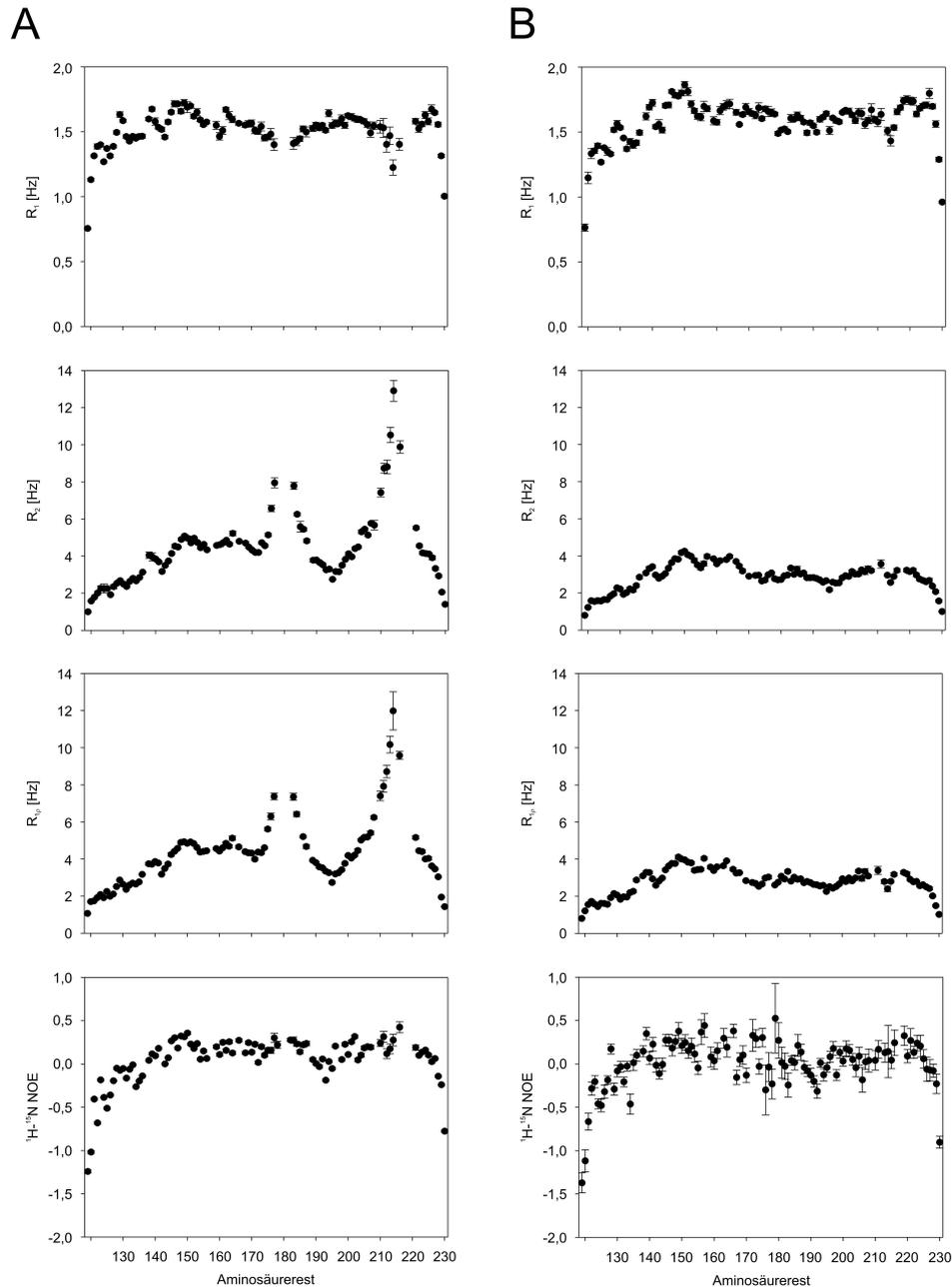


Abb. 3.9: Heteronukleare Relaxationsraten für hPrP^{ox} (A) und hPrP^{red} (B).

Die R_1 -Relaxationsraten und die ^1H - ^{15}N -NOEs zeigen grundsätzlich einen ähnlichen Verlauf wie die R_2 - bzw. $R_{1\rho}$ -Raten, jedoch mit einer geringeren Ausprägung, da jene weniger sensitiv auf Bewegungseinschränkungen reagieren (Abb. 3.9). Die ^1H - ^{15}N -NOEs von hPrP^{red} weisen zudem im Vergleich zum oxidierten Fall eine große Standardabweichung auf, was vermutlich auf die hier durchgeführte Methode der Cysteinmethylierung zurückgeführt werden kann. Nichtsdestotrotz liegen die ^1H - ^{15}N -NOE-Werte sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Fall nahe bei 0, was eine generelle Flexibilität der Polypeptidkette anzeigt.

3.3.3. ThT-Fluoreszenzassay

Die durch NMR-spektroskopische Untersuchungen festgestellten Unterschiede in der Konformationsdynamik der entfaltenen Zustände von hPrP^{ox} und hPrP^{red} führen zu der Frage, ob diese Unterschiede Auswirkungen auf das Aggregationsverhalten der jeweiligen Proteine haben. Hierfür wurde ein fluoreszenzspektroskopisches Experiment mit dem Fluoreszenzfarbstoff Thioflavin T (ThT) durchgeführt, bei dem die Aggregationskinetik des humanen Prionenproteins in Echtzeit aufgezeichnet werden konnte (Abb. 3.10).

Im Falle des hPrP^{ox} nimmt die Fluoreszenzintensität sofort nach Zugabe des Aggregationspuffers monoexponentiell zu, was auf die Ausbildung von Fibrillen schließen lässt (Abb. 3.10A). Im Gegensatz dazu wird im Falle des hPrP^{red} das Fluoreszenzintensitätssignal nicht beeinflusst, was bedeutet, dass das hPrP^{red} keine Fibrillen ausbildet. Dieser Unterschied im Aggregationsverhalten wurde bislang noch nicht beim hPrP beschrieben, aber es konnten ähnliche Resultate bei einem anderen amyloidbildenden Protein, dem β_2 -Mikroglobulin, erhalten werden, bei dem das Vorhandensein der Disulfidbrücke essentiell für die Ausbildung von Amyloidfibrillen ist (Ohhashi et al 2002). Weiterhin ergaben vorausgegangene Studien anderer Arbeitsgruppen, dass die Aufrechterhaltung der Disulfidbrücke im

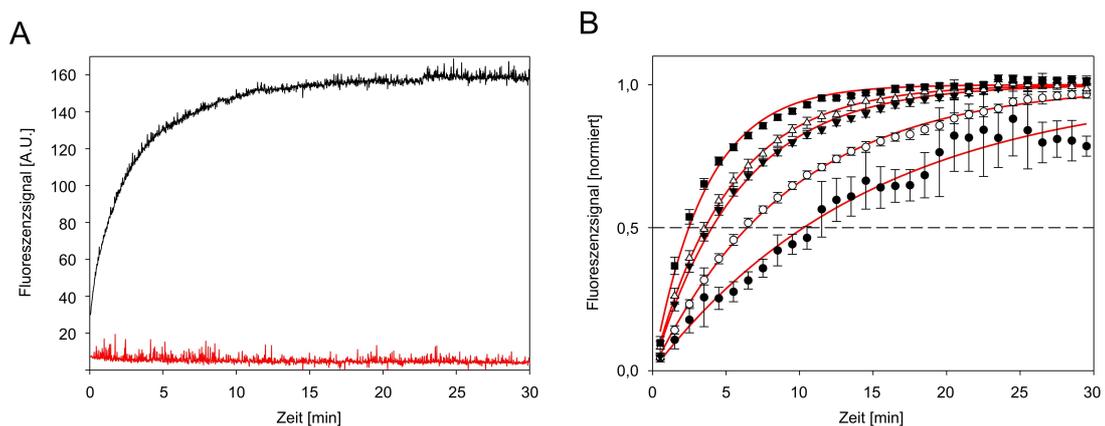


Abb. 3.10: (A) ThT-Aggregationskinetiken von hPrP^{ox} (schwarz) und hPrP^{red} (rot) jeweils bei einer Proteinkonzentration von $15 \mu\text{M}$. (B) Normierte ThT-Aggregationskinetiken von hPrP^{ox} bei verschiedenen Proteinkonzentrationen. Die Proteinendkonzentrationen liegen bei $5 \mu\text{M}$ (schwarze Kreise), $7,5 \mu\text{M}$ (weiße Kreise), $10 \mu\text{M}$ (schwarze Dreiecke), $12,5 \mu\text{M}$ (weiße Dreiecke) und $15 \mu\text{M}$ (schwarze Vierecke). Die Datenpunkte wurden über ein Fenster von einer Minute gemittelt, der monoexponentielle Fit für jede Proteinkonzentration ist jeweils durch die rote Linie wiedergegeben. Die gestrichelte Linie zeigt die halbmaximale Fluoreszenzintensität an.

Prionenprotein eine wichtige Rolle bei der Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} spielt (Das et al 2005; Herrmann & Caughey 1998).

Die Aggregationskinetik des hPrP^{ox} wurde weiterhin bei verschiedenen Proteinkonzentrationen im Bereich von 5 μ M bis 15 μ M untersucht (Abb. 3.10B). In allen Fällen konnte der Kurvenverlauf durch eine monoexponentiell ansteigende Funktion beschrieben werden. Es fällt jeweils auf, dass der Fluoreszenzanstieg – d. h. die Fibrillenbildung – sofort nach Zugabe des Aggregationspuffers erfolgt. Eine so genannte lag-Phase, die sich in Aggregationsassays unter anderen experimentellen Bedingungen ausgebildet hatte (Baskakov et al 2004; Watzlawik et al 2006), kann hier nicht festgestellt werden. Dies lässt zwei mögliche Schlüsse zu: Zum einen könnte die lag-Phase innerhalb der Totzeit von hier 5 s, die sich durch den experimentellen Aufbau ergibt, bereits abgeschlossen sein. Zum anderen könnte das Prionenprotein unter den hier gewählten Pufferbedingungen – aufgelöst in H₂O, pH 2,0 – zwar noch als Monomer, aber bereits in einer aggregationskompetenten Konformation vorliegen, die durch Zugabe des Aggregationspuffers endgültig die Fähigkeit erhält Fibrillen auszubilden.

Generell lässt sich festhalten, dass mit zunehmender Proteinkonzentration der Zeitpunkt, an dem die halbmaximale Fluoreszenzintensität erreicht wird ($t_{1/2}$), früher eintritt (Abb. 3.11). Das bedeutet, dass die Aggregationskinetik mit steigender Proteinkonzentration schneller verläuft.

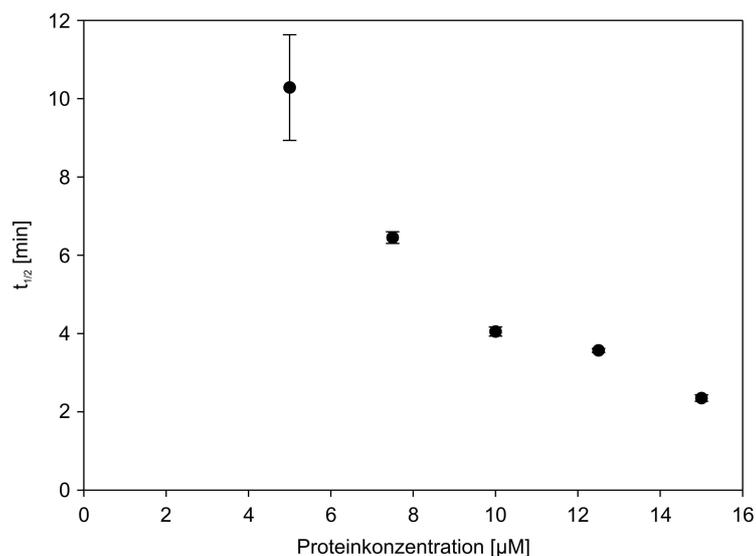


Abb. 3.11: Auftragung des Zeitpunkts der halbmaximalen Fluoreszenzintensität ($t_{1/2}$) in Abhängigkeit der eingesetzten Proteinmenge im ThT-Fluoreszenzexperiment für hPrP^{ox}.

3.3.4. Interpretation der gemessenen Daten

Die hier dargestellte Präferenz des Prionenproteins β -faltblattähnliche Strukturelemente sowohl im oxidierten entfalteten als auch im reduzierten entfalteten Zustand ausbilden zu können, deckt sich mit früheren Untersuchungen sowohl an einem β -Multimer, an dem mittels CD-Spektroskopie β -Faltblattcharakteristika nachgewiesen werden konnten (Hornemann & Glockshuber 1998) als auch mit der β -Faltblattarchitektur der hPrP-Amyloide (Cobb et al 2008; Cobb et al 2007). Die hier angewendeten NMR-Untersuchungen zeigen nun die genauen Regionen, in denen β -Strukturen existieren.

Interessanterweise befindet sich in der ersten β -strukturellen Region (Ser₁₃₅–Gly₁₄₂) die sperrige, apolare und im nativen Zustand an der Oberfläche exponierte IIHF-Sequenz (Ile₁₃₈–Ile₁₃₉–His₁₄₀–Phe₁₄₁), die als idealer Angriffspunkt für intermolekulare Kontakte angesehen wird und dadurch zur Oligomerisation und Aggregation beiträgt (DeMarco & Daggett 2004; Ziegler et al 2006).

Der dritte Aminosäurebereich, in dem eine Präferenz für β -Strukturen gefunden wurde (Ile₁₈₂–Val₁₈₉), liegt in einer Region, die als Kernstruktur der amyloiden Form identifiziert wurde, welche durch die Region zwischen Gln₁₆₀ und Lys₂₂₀ ausgebildet wird und aus einem parallelen in-register β -Faltblatt besteht (Cobb et al 2008; Cobb et al 2007). Diese Region deckt sich sehr gut mit dem Aminosäurebereich um die Disulfidbrücke, in dem die Bewegungen im hPrP^{ox} stark eingeschränkt sind und es im Vergleich zu hPrP^{red}, das keine Amyloide mehr ausbilden kann, große Unterschiede in den Relaxationsraten gibt. Entsprechend lässt sich die Hypothese aufstellen, dass der entfaltete oxidierte Zustand ähnliche Eigenschaften besitzt wie das amyloidformende Intermediat und dies besonders in dem Bereich, der für die Bildung der Amyloide verantwortlich scheint. Diese Schlussfolgerung wird auch durch die Analyse von ϕ -Werten aus Rückfaltungsstudien unterstützt, bei der dieselbe Region als Faltungskern für die Bildung der nativen Struktur des Proteins dient (Hart et al 2009). Durch bestimmte Mutationen wird die Ausbildung der Nativstruktur extrem gestört, was zu alternativen Konformationen führt.

Weiterhin korreliert die Lage der Disulfidbrücke mit einem Hotspot für genetisch festgelegte Mutationen, die mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert sind (Collinge 2001): 17 der 25 krankheitsassoziierten Mutationen finden sich zwischen den Aminosäuren Asp₁₇₈ und Gln₂₁₇. Zusammenfassend lässt sich also die Hypothese

aufstellen, dass Unterschiede in der konformationellen Dynamik des denaturierten Proteins um die Disulfidbrücke herum die Tendenz des hPrP^{ox} zur Fibrillenbildung beeinflussen können.

3.4. Vergleich von hPrP und mPrP

3.4.1. HSQC- und Sequenz-Vergleich

Entsprechend zur Untersuchung am humanen Prionenprotein waren sequentielle Resonanzzuordnungen am murinen Prionenprotein, mPrP(121–232) – sowohl im oxidierten (mPrP^{ox}) als auch im reduzierten Zustand (mPrP^{red}) – durch Aufnahme zahlreicher NMR-Experimente möglich. Insgesamt konnten für mPrP^{ox} 99 und für mPrP^{red} 102 der 109 möglichen HN-Kreuzpeaks zugeordnet werden.

Abb. 3.12 zeigt die Ergebnisse der Resonanzzuordnung an mPrP^{ox} und mPrP^{red} jeweils anhand eines aufgenommenen [¹H, ¹⁵N]-HSQC-Spektrums. Neben den zugeordneten Peaks verbleiben in beiden Spektren noch einige Peaks; diese stammen höchstwahrscheinlich von Seitenketten-NH-Gruppen, schwächere Peaks könnten von mitaufgereinigten Peptiden, Abbauprodukten oder schwach populierten alternativen Konformationen des Proteins stammen.

Entsprechend zum hPrP lassen die typische geringe Dispersion der chemischen Verschiebungen und die schmale Linienbreite in den HSQC-Spektren den Schluss zu, dass die mit Harnstoff entfalteten Zustände von mPrP^{ox} und mPrP^{red} unter den hier durchgeführten Bedingungen größtenteils unstrukturiert vorliegen.

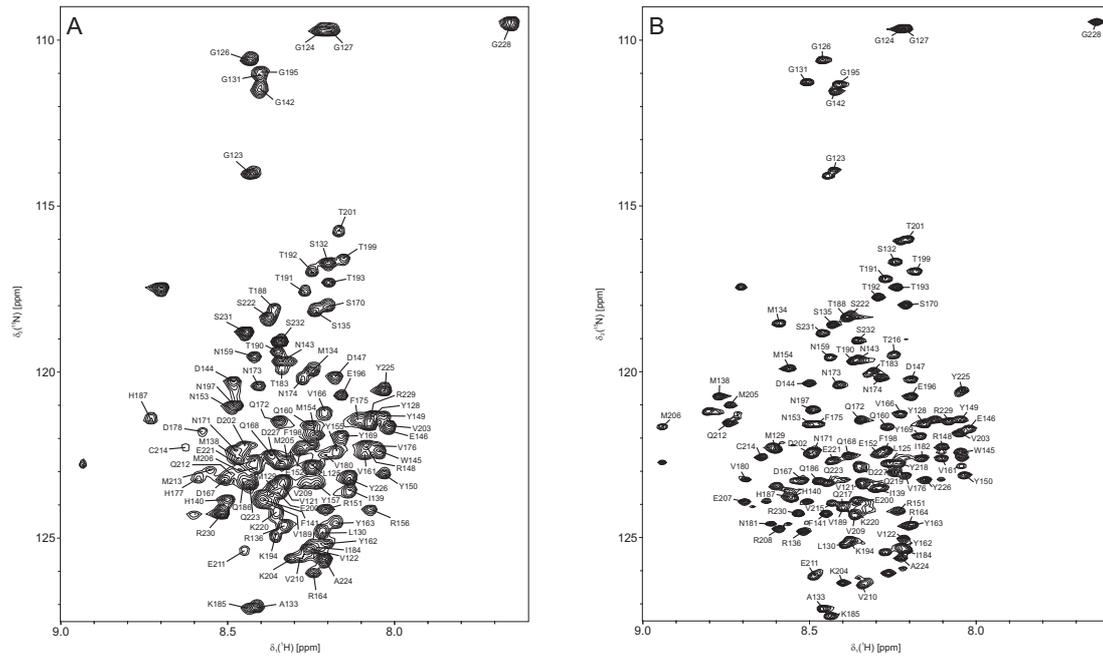


Abb. 3.12: [¹H, ¹⁵N]-HSQC-Spektren der denaturierten Zustände von mPrP^{ox} (A) und mPrP^{red} (B), aufgenommen in 8 M Harnstoff, pH 2,0, 25°C. Peaks, die den entsprechenden Aminosäuren im Polypeptidrückgrat zugeordnet werden konnten, sind im Einbuchstabencode und mit der korrespondierenden Aminosäureposition im Protein (121 bis 232) angegeben.

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der C-terminalen Domänen von humanem und murinem Prionenprotein (Abb. 3.13A), so ergibt sich, dass 88% der beiden Sequenzen identisch sind. Da Sequenzvergleiche eine Standardtechnik in der Bioinformatik zur Veranschaulichung von Beziehungen zwischen Aminosäureresten in verschiedenen evolutionär oder strukturell verwandten Proteinen darstellen und im Kontext der Strukturbiologie äquivalente Reste zu homologen Faltungen in Proteinen führen, war zu erwarten, dass sich die NMR-Spektren von hPrP^{ox} und mPrP^{ox} bzw. hPrP^{red} und mPrP^{red} nur unwesentlich voneinander unterscheiden. Vergleicht man die entsprechenden HSQC-Spektren miteinander (Abb. 3.5 und Abb. 3.12), zeigt sich aufgrund dessen in beiden Fällen ein ähnliches Peakmuster.

Unterschiede in den Sequenzen von hPrP(121–230) und mPrP(121–232) lassen sich im Bereich zwischen den Aminosäurepositionen 138 und 168 – hier existieren insgesamt sechs Unterschiede – und im Bereich zwischen den Aminosäurepositionen 215 und 227 – hier gibt es vier Unterschiede – ausmachen. Mit Ausnahme des semi-konservativen Austausches an Position 143 (^{hPrP}Ser → ^{mPrP}Asp) werden an den anderen neun Positionen die jeweiligen Reste durch homologe Aminosäuren ersetzt,

was zu hoch konservierten Substitutionen führt. Nur am C-Terminus (228–230 bzw. 228–232) wird durch das Einfügen von zwei weiteren Resten im murinen Prionenprotein der gleiche Sequenzaufbau verhindert, wenn auch die Aminosäurezusammensetzung – bestehend aus Gly, Arg und Ser – identisch bleibt. Nicht nur zwischen humanem und murinem Prionenprotein besteht eine hohe Sequenzhomologie, sondern auch zu anderen Säugetieren – insbesondere zu Primaten (Abb. 3.13B). Dies zeigt, dass das PrP im Laufe der Evolution nur eine sehr geringe Mutationsrate aufweist und somit ein hochkonserviertes Protein darstellt.

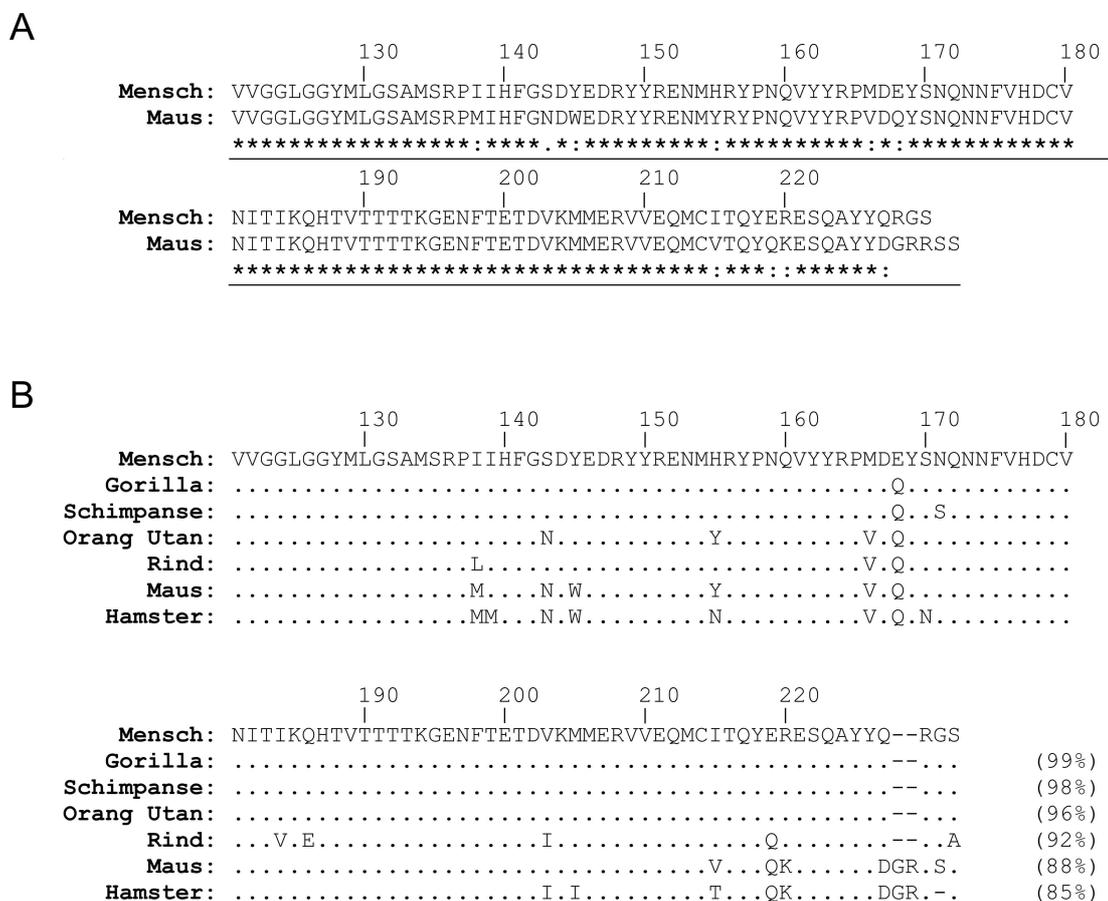


Abb. 3.13: (A) Vergleich der Aminosäuresequenzen von hPrP(121–230) und mPrP(121–232). "*" : identische Aminosäuren; ":" : hoch konservierte Substitutionen; "." : schwach konservierte Substitutionen. (B) Sequenzalignment verschiedener PrP-Sequenzen von Gorilla, Schimpanse, Orang Utan, Rind, Maus und Hamster im Vergleich zu humanem PrP. Punkte stehen hierbei für identische Aminosäuren. Der prozentuale Anteil an identischen Aminosäuren, im Vergleich zu humanem PrP, ist in Klammern angegeben.

Die NMR-Strukturen der monomeren, zellulären Prionenproteine von mPrP (Billeter et al 1997; Riek et al 1996) und hPrP (Zahn et al 2000) wurden neben weiteren aufgeklärt. Die generelle Faltung der beiden Proteine ist sehr ähnlich. Unterschiede in der nativen Struktur lassen sich nur in lokalen Bereichen feststellen, die vermutlich bei der Ausbildung der so genannten Speziesbarriere und der damit verbundenen infektiösen Übertragung eine wichtige Rolle spielen (Lopez Garcia et al 2000; Lysek et al 2005). Im Fall des mPrP endet Helix 3 am Aminosäurerest 219 und nach einem Knick im Segment 219–222 formt das Protein eine helixartige Schleife (Riek et al 1996). Im Gegensatz dazu besitzt das native hPrP eine reguläre durchgehende α -Helix in diesem Teil der Polypeptidkette (Zahn et al 2000).

In beiden Proteinen ist die Struktur des Loops im Bereich 167–171 nicht genau definiert, wohingegen der korrespondierende Loop im Prionenprotein des Goldhamsters (ShaPrP) strukturell aufgelöst werden konnte (James et al 1997). Interessanterweise befindet sich dieses Fragment in allen Fällen in einer Region der dreidimensionalen Struktur, in der der Austausch von Aminosäuren zu einer Veränderung der Seitenkettenladung führt (Abb. 3.13B), was weitreichende Kräfte, die die intermolekulare Erkennung gestalten, modifizieren könnte (Billeter et al 1997).

3.4.2. Chemische Verschiebungen

Die sekundär chemischen Verschiebungen der $^{13}\text{C}_{\alpha}$ -, $^{13}\text{C}_{\beta}$ -, ^{13}CO - und $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Resonanzen (Schwarzinger et al 2001; Wishart et al 1995) sowie der SSP-Algorithmus (Marsh et al 2006) – basierend auf den $^{13}\text{C}_{\alpha}$ - und $^{13}\text{C}_{\beta}$ -chemischen Verschiebungen – wurden für die in 8 M Harnstoff entfalteten Zustände sowohl von mPrP^{ox} als auch von mPrP^{red} bestimmt (Abb. 3.14). Für mPrP^{ox} konnten drei Bereiche identifiziert werden, die eine Wahrscheinlichkeit für residuale β -Strukturen zulassen (Abb. 3.14A). Diese drei Regionen sind nahezu identisch mit denen, die in hPrP^{ox} gefunden wurden und erfassen die Aminosäurebereiche Met₁₃₄–Asn₁₄₃, Pro₁₅₈–Val₁₆₆ und Thr₁₈₃–Val₁₈₉.

Auch wenn die Bereiche mit Reststrukturen in hPrP^{ox} und mPrP^{ox} nahezu übereinstimmen, so unterscheiden sie sich doch teilweise in ihrer Ausbildungswahrscheinlichkeit. Während im zweiten Bereich (II) in beiden

Proteinen durch den SSP-Algorithmus eine Reststruktur-Wahrscheinlichkeit von etwa 10% voraussagt wird, ist die Wahrscheinlichkeit für eine β -Struktur im ersten Bereich (I) in mPrP^{ox} auf 12% leicht angestiegen, im Vergleich zu 10% in hPrP^{ox}. Eine signifikante Veränderung in der Ausbildungswahrscheinlichkeit ist im dritten Bereich (III) zu beobachten; während die Wahrscheinlichkeit in hPrP^{ox} bei 7% liegt, hat sie sich in mPrP^{ox} auf 13% fast verdoppelt.

Ein weiterer Unterschied ergibt sich, wenn man die reduzierten Zustände hPrP^{red} und mPrP^{red} vergleicht (Abb. 3.14B). Zwar existiert in beiden Proteinen eine residuale β -Struktur im Bereich der Aminosäuren Met₁₃₄–Asn₁₄₃ (I) mit einer Ausbildungswahrscheinlichkeit von jeweils 10%, doch bereits der zweite Bereich (II) fällt in mPrP^{red} signifikant kleiner aus, sowohl in Größe als auch Ausbildungswahrscheinlichkeit (Asn₁₅₉–Tyr₁₆₃; 3%) im Vergleich zu dem in hPrP^{red} (Tyr₁₅₇–Pro₁₆₅; 10%). Besonders auffällig ist, dass der dritte Residualstrukturbereich (III), der in hPrP^{red} existiert in mPrP^{red} vollständig fehlt.

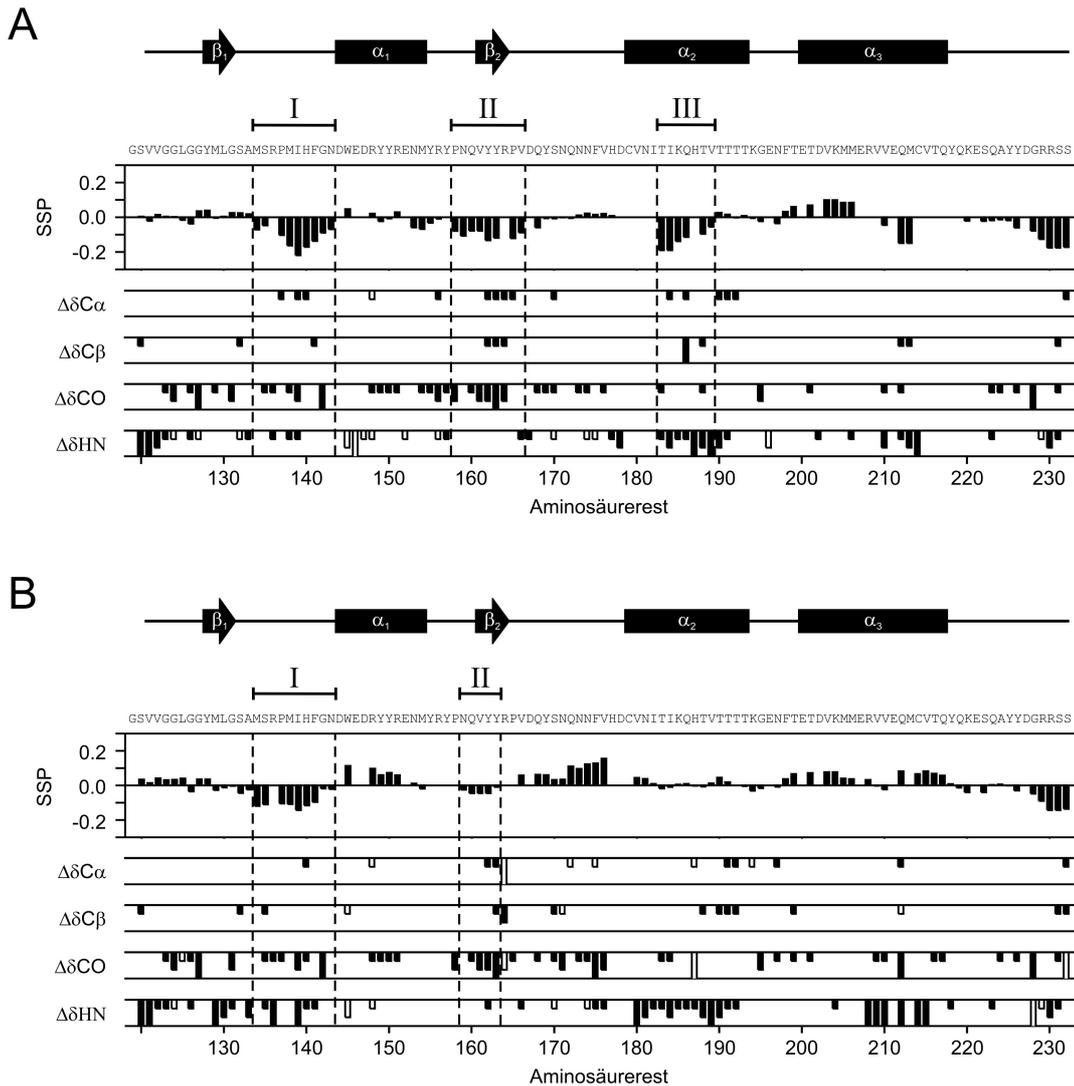


Abb. 3.14: SSP-Algorithmus (Marsh et al 2006) und normalisierte sekundäre chemische Verschiebungen für mPrP^{ox} (A) und mPrP^{red} (B) jeweils in 8 M Harnstoff, pH 2,0, 25°C. Signifikante sekundäre chemische Verschiebungen für C_α, C_β und CO ($|\Delta\delta| > 0,35$ ppm für eine Einheit, $|\Delta\delta| > 0,7$ ppm für zwei Einheiten und $|\Delta\delta| > 1,05$ für drei Einheiten) sowie signifikante sekundäre chemische Verschiebungen für H^N ($|\Delta\delta| > 0,1$ ppm für eine Einheit, $|\Delta\delta| > 0,2$ ppm für zwei Einheiten und $|\Delta\delta| > 0,3$ für drei Einheiten) sind durch vertikale Balken gekennzeichnet. Schwarze Balken stehen für eine β -Strangpräferenz, weiße Balken bezeichnen eine Präferenz für α -helikale Elemente. Regionen mit erhöhter Präferenz für β -Strukturen sind mit I–III gekennzeichnet, die nativen Sekundärstrukturelemente und die Aminosäuresequenz sind über der jeweiligen Graphik angegeben.

3.4.3. Relaxationsraten

Die R_2 - und $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten von $mPrP^{ox}$ und $mPrP^{red}$ sind in Abb. 3.15A angegeben. Die R_2^{ox} - und $R_{1\rho}^{ox}$ - bzw. R_2^{red} - und $R_{1\rho}^{red}$ -Raten zeigen jeweils keine Unterschiede, was darauf schließen lässt, dass in dem entfalteten Zustand des $mPrP^{ox}$ bzw. $mPrP^{red}$ keine Dynamiken auf μ s-ms-Ebene stattfinden (Dayie & Wagner 1994; Deverell et al 1970; Szyperski et al 1993).

Ein Vergleich der konformationellen Dynamiken zwischen $hPrP^{ox/red}$ und $mPrP^{ox/red}$ zeigt sowohl für den oxidierten (Abb. 3.15B) als auch für den reduzierten Zustand (Abb. 3.15C) ein ähnliches Verhalten. Die Reduktion der Disulfidbrücke induziert auch bei $mPrP$ eine größere Beweglichkeit, was letztlich zu einer Zunahme in den Dynamiken um die beiden Cysteine, Cys_{179} und Cys_{214} , führt. Als Folge davon können – entsprechend zu $hPrP^{red}$ – zusätzlich drei hydrophobe Cluster in dem Bereich um die Cysteine identifiziert werden, die im oxidierten Zustand durch hohe Relaxationsraten verdeckt sind. Die Positionen der Cluster stimmen dabei nur in Teilen mit dem Ergebnis des AABUF-Algorithmus (Rose et al 1985) überein und können somit nicht durch die Primärstruktur vorhergesagt werden.

Ein signifikanter Unterschied in den Dynamiken von $hPrP$ und $mPrP$ zeigt sich jedoch im Bereich zwischen den Aminosäuren 135 und 142. Bei $hPrP$ kann in dieser Region ein hydrophober Cluster detektiert werden, der jedoch in $mPrP$ nicht mehr vorhanden ist. Das Verschwinden dieses hydrophoben Clusters in $mPrP$ kann darauf zurückgeführt werden, dass in der Primärsequenz der beiden Proteine $hPrP$ und $mPrP$ ein Aminosäureaustausch an der Position 138 ($^{hPrP}Ile \rightarrow ^{mPrP}Met$) stattfindet. Ein anderer Aminosäureaustausch an Position 155 ($^{hPrP}His \rightarrow ^{mPrP}Tyr$) ist weiterhin verantwortlich für das Zustandekommen eines neuen hydrophoben Clusters, der jedoch nur in $mPrP^{ox}$ detektiert werden konnte. Vorausgegangene Studien zeigten, dass eben diese beiden Aminosäurepositionen unter anderem eine wichtige Rolle für die Festlegung der speziesabhängigen Spezifität der konformationellen Umwandlung von PrP^C zu PrP^{Sc} spielen (Jones & Surewicz 2005; Kocisko et al 1995; Vanik et al 2004).

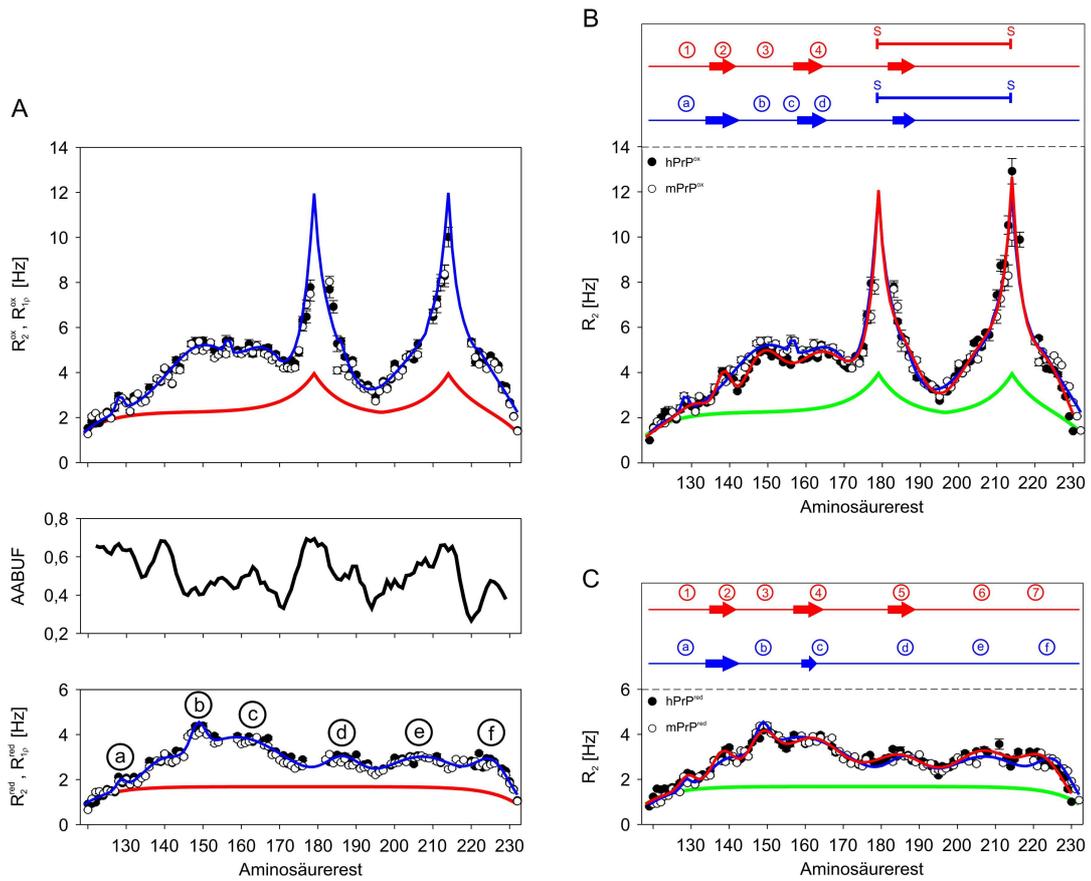


Abb. 3.15: (A) R_2 - (schwarze Kreise) und $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten (weiße Kreise) von $mPrP^{ox}$ (oberes Bild) und $mPrP^{red}$ (unteres Bild) sind dargestellt. Die für *random coil* typischen Relaxationsraten (R_2^{rc}) sind jeweils durch die rote Kurve gezeigt ($R_{int}^{ox} = 0,16 \text{ s}^{-1}$, $\lambda_0^{ox} = 7$, $R_{int}^{red} = 0,15 \text{ s}^{-1}$, $\lambda_o^{red} = 7$), den Fit durch die gemessenen Relaxationsraten gibt jeweils die blaue Kurve wieder. Zusätzlich angegeben ist der AABUF-Algorithmus. (B, C) Vergleich der ^{15}N -Relaxationsraten von $hPrP$ (schwarze Kreise) und $mPrP$ (weiße Kreise) sowohl im oxidierten (B) als auch im reduzierten Zustand (C). Der prognostizierte Verlauf eines *random coil* Polypeptids ist jeweils durch die grüne Linie gezeigt, gefittete Relaxationsraten sind im Fall des $hPrP$ durch eine rote, im Fall des $mPrP$ durch eine blaue Linie wiedergegeben. Bereiche mit Residualstrukturen in $hPrP^{ox/red}$ und $mPrP^{ox/red}$ sind über der jeweiligen Figur mit dem entsprechenden Farbschlüssel angegeben. Hydrophobe Cluster sind mit 1–7 für $hPrP^{ox/red}$ und mit a–f für $mPrP^{ox/red}$ gekennzeichnet. In (B) ist zusätzlich die Disulfidbrücke zwischen Cys₁₇₉ und Cys₂₁₄ markiert.

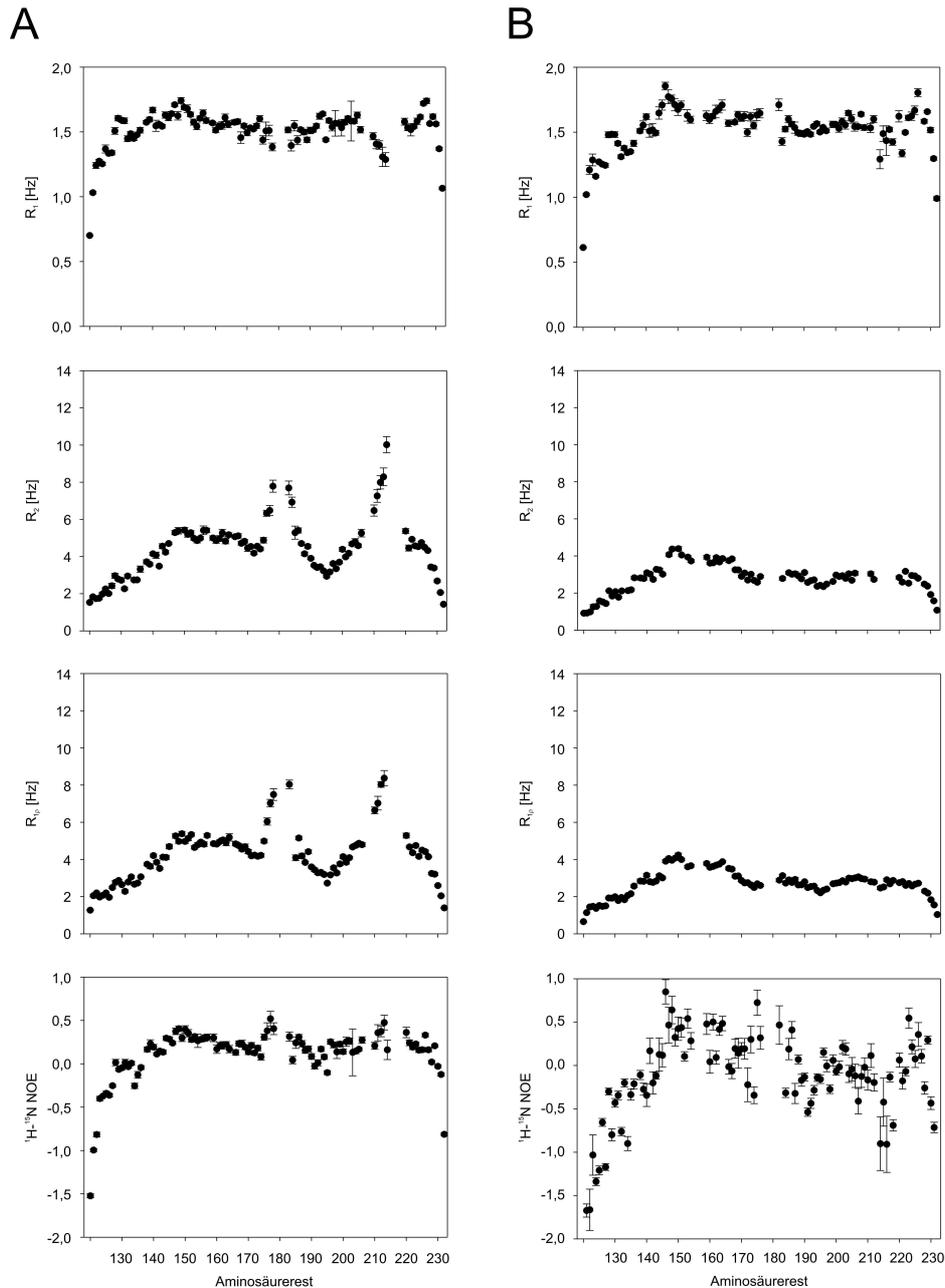


Abb. 3.16: Heteronukleare Relaxationsraten für mPrP^{ox} (A) und mPrP^{red} (B).

Die R_1 -Relaxationsraten und die ^1H - ^{15}N -NOEs zeigen grundsätzlich einen ähnlichen Verlauf wie die R_2 - bzw. $R_{1\rho}$ -Raten, jedoch mit einer geringeren Ausprägung, da jene weniger sensitiv auf Bewegungseinschränkungen reagieren (Abb. 3.16). Die ^1H - ^{15}N -NOEs von mPrP^{red} weisen zudem im Vergleich zum oxidierten Fall eine große Standardabweichung auf, was vermutlich auf die hier durchgeführte Methode der Cysteinmethylierung zurückgeführt werden kann. Nichtsdestotrotz liegen die ^1H - ^{15}N -NOE-Werte sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Fall nahe bei 0, was eine generelle Flexibilität der Polypeptidkette anzeigt.

3.4.4. ThT-Fluoreszenzassay

Wie bei hPrP(121–230) wurde auch für den oxidierten bzw. reduzierten Zustand des mPrP(121–232) die Aggregationskinetik mit Hilfe eines ThT-Fluoreszenz-experiments ermittelt (Abb. 3.17A). Völlige Übereinstimmung besteht dabei im generellen Aggregationsverhalten der beiden mPrP-Zustände im Vergleich zu den jeweiligen hPrP-Zuständen. Im Fall des mPrP^{ox} steigt sofort nach Zugabe des Aggregationspuffers die Fluoreszenzintensität an, was auf die Ausbildung von Fibrillen hindeutet. Entsprechend zu hPrP^{ox} lässt sich der Kurvenverlauf durch eine monoexponentiell ansteigende Funktion beschreiben. Die Methylierung der Cysteine und die sich dadurch nicht mehr ausbildende Disulfidbrücke in mPrP^{red} führt, analog zu hPrP^{red}, dazu, dass sich keine Fibrillen mehr bilden können, was sich durch das Stagnieren der ThT-Fluoreszenzintensität auf dem niedrigen Anfangsniveau ausdrückt. Ein Vergleich der Aggregationskinetiken von hPrP^{ox} und mPrP^{ox} bei derselben Proteinkonzentration von 12,5 μM (Abb. 3.17B) zeigt, dass die halbmaximale Fluoreszenzintensität jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten $t_{1/2}$ erreicht wird ($t_{1/2}^{mPrP} = 1,85 \pm 0,07 \text{ min}$; $t_{1/2}^{hPrP} = 3,57 \pm 0,05 \text{ min}$). Das bedeutet, dass bei dieser Konzentration die Aggregation des hPrP^{ox} langsamer verläuft als die des mPrP^{ox}. Das generelle Verhältnis zwischen dem Zeitpunkt der halbmaximalen Fluoreszenzintensität $t_{1/2}$ und den verschiedenen PrP-Konstrukten wird im Abschnitt 3.5. genauer betrachtet.

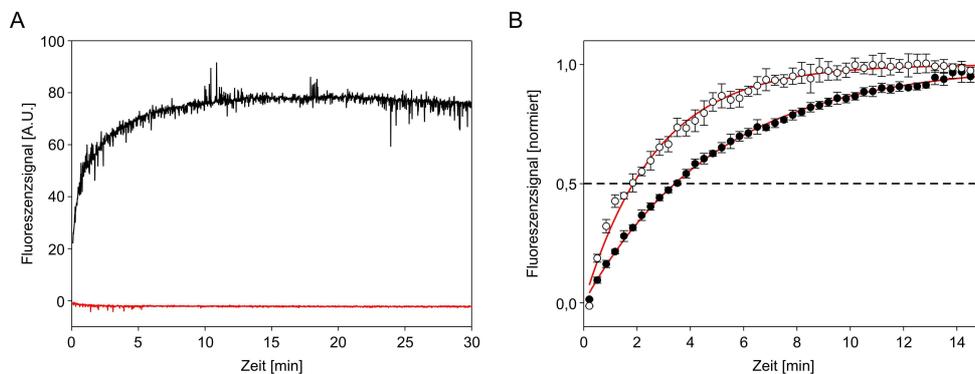


Abb. 3.17: (A) ThT-Aggregationskinetiken von mPrP^{ox} (schwarz) und mPrP^{red} (rot) jeweils bei einer Proteinkonzentration von 15 μM . (B) Normierte ThT-Aggregationskinetiken von hPrP^{ox} (schwarze Kreise) und mPrP^{ox} (weiße Kreise), jeweils bei einer Proteinkonzentration von 12,5 μM . Der monoexponentielle Fit für jede Proteinkonzentration ist jeweils durch die rote Linie wiedergegeben. Die gestrichelte Linie zeigt die halbmaximale Fluoreszenzintensität an.

3.5. Aggregationskinetiken an *mut-mPrP^{ox}*

Um den Einfluss verschiedener Punktmutationen, die beim Menschen mit TSE-Erkrankungen assoziiert sind, auf das Aggregationsverhalten zu ermitteln, wurden insgesamt zwölf verschiedene mPrP^{ox}-Mutanten aufgereinigt und untersucht.

Zunächst fällt bei der Aufreinigung auf, dass man je nach verwendeter Mutante unterschiedliche Mengen an Protein erhält (Abb. 3.18). Die aufgereinigte Proteinmenge schwankte dabei zwischen 3,94 g L⁻¹ (Q212P) und 0,03 g L⁻¹ (D202N). Da das Expressionslevel bei allen mPrP^{ox}-Konstrukten jedoch ein ähnliches Niveau erreichte (Abb. 3.18), kann man daraus schließen, dass keine der verwendeten Mutationen einen Einfluss auf die Expressionsfähigkeit der kompetenten *E. coli*-Zellen hat. Eine mögliche Erklärung für das Erhalten unterschiedlich großer Proteinmengen kann darin gesehen werden, dass entweder bei der hier gewählten Aufreinigungsstrategie durch methodologische Fehler

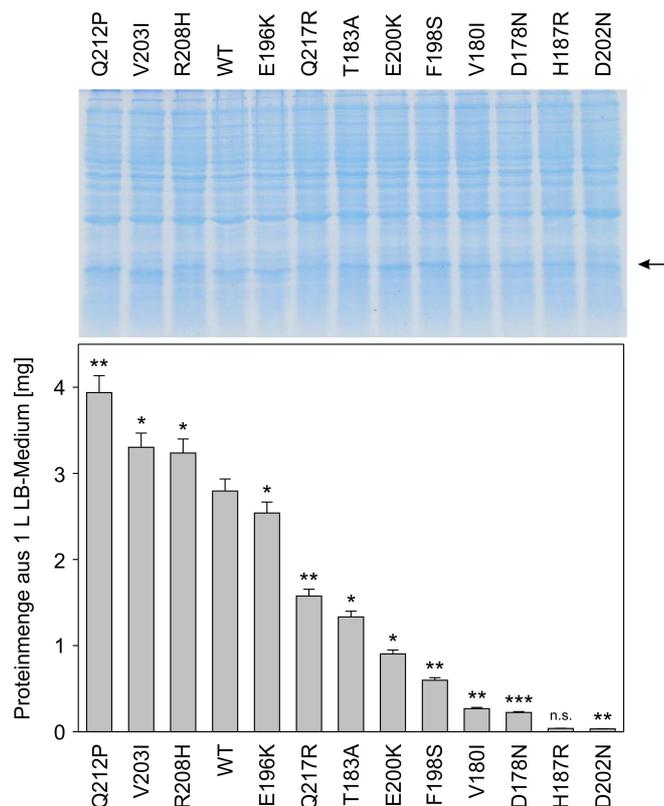


Abb. 3.18: Aufgereinigte Proteinmenge der jeweiligen mPrP^{ox}-Mutanten aus 1 L LB-Medium. Die einzelnen Mutanten sind nach der Art der TSE-Erkrankungen gekennzeichnet. *: Creutzfeldt-Jakob-Krankheit; **: Gerstmann-Sträußler-Scheinker-Syndrom; ***: Familiäre Letale Schlaflosigkeit; n.s.: nicht spezifiziert. Dargestellt ist weiterhin ein 15%iges SDS-Gel, auf dem das Expressionslevel der jeweiligen mPrP^{ox}-Mutante (Pfeil) nach einer dreistündigen Inkubationszeit mit IPTG gezeigt ist.

unterschiedlich starke Verluste aufgetreten sind oder aber unterschiedliche Mengen der jeweiligen mPrP-Mutanten in einer aufreinigungskompetenten Form vorlagen. Von einigen Mutanten weiß man, dass sie in *E. coli* nicht als lösliche Proteine, sondern in periplasmatischen Einschlusskörpern exprimiert werden (Liemann & Glockshuber 1999). Inwieweit dieses Phänomen Einfluss auf die hier aufgereinigte Proteinmenge hat, kann jedoch nicht mit absoluter Sicherheit festgestellt werden.

Infolge dieser Schwierigkeiten konnten für die sich anschließende Untersuchung der Aggregationskinetiken nicht alle mPrP^{OX}-Konstrukte in ausreichender Menge aufgereinigt werden. Die Kinetik der Mutanten V180I, D178N, H187R und D202N konnte somit nicht durchgeführt werden.

Für die Aggregationskinetiken der weiteren mPrP^{OX}-Mutanten zeigt sich – wie bei der Untersuchung des hPrP^{OX} bzw. mPrP^{OX} – ein monoexponentiell ansteigender Verlauf (Abb. 3.19A). Durch Bestimmung des Zeitpunkts der halbmaximalen Fluoreszenzintensität $t_{1/2}$ zeigen sich für die einzelnen mPrP^{OX}-Mutanten jedoch Unterschiede im Vergleich zu *wt*-mPrP^{OX}. Zwar tritt bei allen Mutanten der Zeitpunkt der halbmaximalen Fluoreszenzintensität mit zunehmender Proteinkonzentration analog zu *wt*-mPrP^{OX} früher ein – d. h. die Aggregationskinetiken verlaufen mit steigender Proteinkonzentration schneller – doch es ist auffällig, dass es insbesondere

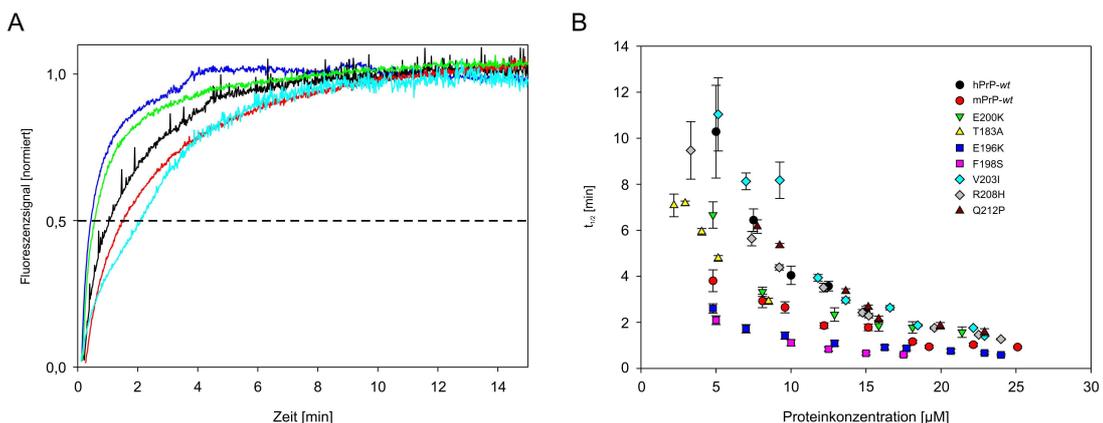


Abb. 3.19: (A) Normierte ThT-Aggregationskinetiken von *wt*-mPrP^{OX} (schwarz) sowie der *mut*-mPrP^{OX}-Konstrukte E196K (grün), F198S (dunkelblau), E200K (rot) und V203I (hellblau), jeweils bei einer Proteinkonzentration von 15 μM. Die gestrichelte Linie zeigt die halbmaximale Fluoreszenzintensität an. (B) Auftragung des Zeitpunkts der halbmaximalen Fluoreszenzintensität ($t_{1/2}$) in Abhängigkeit der eingesetzten Proteinmenge im ThT-Fluoreszenzexperiment für die verschiedenen PrP-Konstrukte.

bei geringen Proteinkonzentrationen zu großen Unterschieden in der Aggregationsgeschwindigkeit der einzelnen *mut*-mPrP^{OX}-Konstrukte kommt (Abb. 3.19B). So schwankt $t_{1/2}$ bei einer eingesetzten Proteinkonzentration von 5 μM zwischen $t_{1/2}^{F198S} = 2,13 \pm 0,22$ min und $t_{1/2}^{V203I} = 11,04 \pm 1,59$ min, jedoch nähern sich diese Werte mit steigender Proteinkonzentration an. So schwankt $t_{1/2}$ bei einer Proteinkonzentration von 20 μM nur noch zwischen $t_{1/2}^{F198S} = 0,51 \pm 0,04$ min und $t_{1/2}^{Q212P} = 1,79 \pm 0,08$ min. Dies bedeutet, dass die Geschwindigkeit der Aggregation von Mutanten, die bei geringen Proteinkonzentrationen eine im Vergleich zu anderen Mutanten langsamere Kinetik aufweisen, mit steigender Proteinkonzentration überdurchschnittlich stark ansteigt. Mutanten, die bei geringen Proteinkonzentrationen bereits eine schnelle Aggregation zeigen, erhöhen zwar auch die Aggregationsgeschwindigkeit mit steigender Proteinkonzentration, können diese aber nicht im gleichen Maße steigern.

4. Zusammenfassung

Die genetische Information innerhalb einer Zelle kodiert nicht nur die spezifische Struktur und Funktion von Proteinen, sondern auch die Entstehung dieser Struktur durch den Prozess der Proteinfaltung. Aus zahlreichen experimentellen und theoretischen Studien wurde offensichtlich, dass Faltung und Entfaltung von Proteinen in vielen zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle spielt. Diese Beobachtungen führten zu der zwangsläufigen Erkenntnis, dass das Unvermögen von Proteinen sich korrekt zu falten oder korrekt gefaltet zu bleiben der Auslöser für viele verschiedene Arten biologischen Fehlverhaltens ist und infolgedessen unterschiedliche Krankheitsformen mit sich bringt. Die strukturelle und dynamische Charakterisierung von nicht-nativen Proteinzuständen ist daher eine wichtige Grundlage einerseits zur Erforschung der krankheitsauslösenden Prozesse, andererseits aber auch zum generellen Verständnis der Proteinfaltung an sich. Allein hochauflösende NMR-Experimente können detaillierte Informationen über Struktur und Dynamiken solcher Zustände auf atomarer Ebene liefern.

In der vorliegenden Arbeit wurde die C-terminale Domäne des humanen Prionenproteins [hPrP(121–230)] unter Bedingungen untersucht, bei denen dieses Protein permanent in einem nicht-nativen Zustand vorliegt. Dies wurde durch die Verwendung einer hochmolaren Harnstofflösung (8 M, pH 2,0) erreicht.

Zur Untersuchung dieses nicht-nativen Zustands mittels NMR wurde das hPrP(121–230) in *E. coli*-Zellen isotopenmarkiert exprimiert und in Mengen von einigen Milligramm aufgereinigt. Nach der sequentiellen Zuordnung der $^{13}\text{C}_{\alpha}$, $^{13}\text{C}_{\beta}$, ^{13}CO -, $^1\text{H}_{\alpha}$ - und $^1\text{H}^{\text{N}}$ -Resonanzen konnte aus den sekundären chemischen Verschiebungen auf Regionen innerhalb der Polypeptidkette geschlossen werden, die erhöhte β -faltblattartige Konformationsanteile enthalten. Heteronukleare Relaxationsraten wurden zur Untersuchung der konformationellen Dynamik herangezogen. Auch hier konnten Regionen verminderter Mobilität (hydrophobe Cluster) nachgewiesen werden, die mit den zuvor entdeckten Bereichen aus der Analyse der chemischen Verschiebungen übereinstimmten. Die Messung von $R_{1\rho}$ -Relaxationsraten erbrachte zudem keine Hinweise auf konformationellen Austausch auf der μs -ms-Zeitskala.

Weiterhin wurde der Einfluss der Disulfidbrücke auf Konformation und Dynamik des hPrP(121–230) untersucht. Dies wurde durch die Reduktion der Disulfidbrücke und die anschließende Methylierung der beiden Cysteine erreicht. Im Gegensatz zu der Analyse der chemischen Verschiebungen zeigte die Auswertung der konformationellen Dynamiken dramatische Unterschiede zwischen den oxidierten und reduzierten Zuständen des hPrP(121–230). Insbesondere im Bereich um die beiden Cysteine konnten große Unterschiede festgestellt werden; im reduzierten Zustand führte die zusätzliche Bewegungsfreiheit zu erhöhten Dynamiken und gab den Blick auf zusätzliche hydrophobe Bereiche frei, die im oxidierten Zustand durch hohe Relaxationsraten verdeckt geblieben waren. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen dem oxidierten und dem reduzierten Zustand des hPrP(121–230), der mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Thioflavin T beschrieben werden konnte, bestand in der Fähigkeit Fibrillen auszubilden; während das oxidierte hPrP diese Eigenschaft besaß, führte der Verlust der intakten Disulfidbrücke zu einer Proteinkonformation, die nicht mehr zur Bildung von fibrillären Strukturen im Stande war.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die strukturellen, dynamischen und kinetischen Charakteristika des hPrP(121–230) mit denen des murinen Prionenproteins mPrP(121–232) sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand verglichen. Auf der Basis der chemischen Verschiebungen und der heteronuklearen Relaxationsdaten konnte gezeigt werden, dass beide Proteine in den jeweiligen komplementären Zuständen (oxidiert bzw. reduziert) sehr ähnliche strukturelle und dynamische Eigenschaften besitzen. Aufgrund einiger Aminosäureaustausche in den beiden Proteinsequenzen kommt es jedoch zu kleineren Unterschieden, die jedoch nur in lokalen Bereichen der Polypeptidkette zum Tragen kommen. Somit konnte gezeigt werden, dass das mPrP(121–232) als ein geeignetes Modellsystem für das humane Prionenprotein dienen kann.

Abschließend wurde der Einfluss von insgesamt zwölf verschiedenen Punktmutationen, die beim Menschen mit Prionenerkrankungen assoziiert sind, auf das Aggregationsverhalten des mPrP(121–232) untersucht. Dabei fiel zum einen auf, dass die Aggregation mit zunehmender Proteinkonzentration schneller verlief, zum anderen aber auch, dass es insbesondere bei geringen Proteinkonzentrationen zu

signifikanten Unterschieden in der Aggregationsgeschwindigkeit der verschiedenen mutierten Proteinkonstrukte kommt.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass in dieser Arbeit strukturelle und dynamische Eigenschaften der nicht-nativen Zustände von hPrP(121–230) und mPrP(121–232) sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand durch die Verwendung von NMR-spektroskopischen Experimenten charakterisiert werden konnten. Zudem konnte mit Hilfe von Fluoreszenzspektroskopie das Aggregationsverhalten der einzelnen Proteinzustände beschrieben und in einem ersten Schritt der Einfluss von verschiedenen Punktmutationen auf die Aggregationsgeschwindigkeit ermittelt werden.

5. Anhang

5.1. Material

Im Folgenden sind die Bezugsquellen bzw. Hersteller der verwendeten Chemikalien, Geräte und Materialien angegeben.

5.1.1. Bakterienstämme

Escherichia coli BL21(DE3)pLysS kompetente Zellen Invitrogen

Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3) pLysS (Cam^R)

Escherichia coli BL21StarTM(DE3)pLysS kompetente Zellen Invitrogen

Genotyp: F⁻ *ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻)
gal dcm rne131* (DE3) pLysS (Cam^R)

Escherichia coli TOP10F' kompetente Zellen Invitrogen

Genotyp: F' {*lacI^q, Tn10(Tet^R)*} *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)
φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697
galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*

Escherichia coli DH5α kompetente Zellen Invitrogen

Genotyp: F⁻ *φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1
hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA*

5.1.2. Enzyme

TEV-Protease [1 mg mL ⁻¹]	aus eigener Herstellung
Thrombin-Protease [1 U µL ⁻¹]	Sigma
Pfu Turbo DNA Polymerase [2,5 U µL ⁻¹]	Stratagene
<i>DpnI</i> [10 U µL ⁻¹]	Stratagene
<i>NdeI</i> [20 U µL ⁻¹]	New England Biolabs
<i>BamH1</i> [20 U µL ⁻¹]	New England Biolabs
<i>EcoR1</i> [20 U µL ⁻¹]	New England Biolabs
<i>NcoI</i> [10 U µL ⁻¹]	New England Biolabs

5.1.3. Chemikalien

Acetonitril	Merck
Arylamid	Roth / Fluka
Agar-Agar	Serva
Agarose	Cambrex
Ammoniumchlorid (¹⁴ N)	Fluka
Ammoniumchlorid (¹⁵ N)	Martek Biosciences
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Ampicillin	Sigma
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs
Bromphenolblau	Merck
β-Mercaptoethanol	Fluka
Calciumchlorid	Fluka
Chloramphenicol	Sigma
Coomassie Brilliant Blue R-250	Fluka
Deuteriumoxid (D ₂ O)	Cambridge Isot. Lab
D-Glucose (¹² C)	Roth
D-Glucose (¹³ C)	Silantes
di-Kaliumhydrogenphosphat	Fluka
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Eisen(III)chlorid	Sigma

Eisessig (100% wasserfrei)	Merck
Ethanol (99,8% p.a.)	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma
Gluthation red.	Fluka
Glycerin (99,8%)	Fluka
Glycin	Roth
Guanidiniumhydrochlorid	Fluka
Harnstoff	Fluka
Imidazol	Fluka
Isopropanol	Grüssing GmbH
Isopropyl- β -D-thiogalactosid	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Luria Broth / LB-Medium	Sigma
Magnesiumsulfat	Fluka
Methanol	Fisher
Methyl-4-Nitrobenzolsulfonat (MNBS)	Fluka
N,N'-Methylenbisacrylamid	Fluka
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin	Fluka
Natriumacetat	Acros
Natriumchlorid	Fluka
Natriumdihydrogenphosphat	Fluka
Natriumdodecylsulfat	Roth
Nickel(II)sulfat-Hexahydrat	Roth
4-Nitro-benzolsulfonsäure-methylester	Fluka
Salzsäure (rauchend)	Merck
Thiamin	Fluka
Thioflavin T	Fluka
Trimethylsilylpropionat	Cambridge Iso. Lab
Tris	Roth

5.1.4. Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

5.1.5. Längen- und Molekulargewichtstandards

LMW-SDS Marker	GE Healthcare
Lambda DNA <i>Hind</i> III Digest	New England Biolabs
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs

5.1.6. Geräte und sonstige Materialien

Brutschrank B6030	Heraeus
CD-Spektrometer J-810	Jasco
Dialyseschlauch Spectra/Por MWCO 3500 Da	Spectrum
Digitalkamera DC 40 (mit UV Filter), DC120	Kodak
Einmalspritzen: 5 mL, 10 mL und 20 mL	B.Braun
Einwegkonzentratoren	Millipore
Elektrophoresespannungseinheit	Biometra
Elektrophoresesystem	Bio-Rad
FPLC-Anlage BioLogic LB	Bio-Rad
Gelfiltrationssäule	
HiLoad 26/60 Superdex TM 75 prep grade	GE Healthcare
Heizbad B-490	Büchi
Heizblock	Pharmacia
Heizmagnetrührer MR 3001K	Heidolph
Inkubationsschüttler Minitron	Infors
Inkubationsschüttler Multitron	Infors
Laborwaage	Sartorius
NMR-Röhrchen 507-HP	Norell
NMR-Spektrometer	
DRX 600	Bruker

DRX 600 mit Cryoprobenkopf	Bruker
AV 700 mit Cryoprobenkopf	Bruker
AV 800 mit Cryoprobenkopf	Bruker
AV 900 mit Cryoprobenkopf	Bruker
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Roth
Reaktionsgefäße: 1,5 mL und 2 mL	Roth
Säulenkörper	Bio-Rad
Säulenmaterial Ni-NTA Superflow	Qiagen
Softtubes: 15 mL und 50 mL	Corning
Ultraschallgerät Sonoplus	Bandelin
UV-Vis-Spektrometer Cary 50	Varian
Zentrifugen	
Biofuge primo R	Heraeus
Biofuge primo	Heraeus
Biofuge pico	Heraeus
Biofuge fresco	Heraeus
Sorvall RC28S	DuPont
Avanti J-20	Beckman

5.2. Primärsequenzen

5.2.1. ^{His}hPrP(121–230) und hPrP(121–230)

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des ^{His}hPrP(121–230) und des hPrP(121–230). Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Unterstrichen ist der N-terminal an das Protein angehängte His-tag, die Spaltstelle für die TEV-Protease ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

↓

M G H H H H H H H A S E N L Y F Q G H M V V G G L G G Y M L G S A M S
 R P I I H F G S D Y E D R Y Y R E N M H R Y P N Q V Y Y R P M D E Y S N Q
 N N F V H D C V N I T I K Q H T V T T T T K G E N F T E T D V K M M E R V
 V E Q M C I T Q Y E R E S Q A Y Y Q R G S

5.2.2. ^{His}wt-mPrP(121–232) und wt-mPrP(121–232)

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des ^{His}wt-mPrP(121–232) und des wt-mPrP(121–232). Die Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben. Unterstrichen ist der N-terminal an das Protein angehängte His-tag, die Spaltstelle für die Thrombin-Protease ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

↓

M R G S H H H H H H G L V P R G S V V G G L G G Y M L G S A M S R P M I
 H F G N D W E D R Y Y R E N M Y R Y P N Q V Y Y R P V D Q Y S N Q N N F
 V H D C V N I T I K Q H T V T T T T K G E N F T E T D V K M M E R V V E Q
 M C V T Q Y Q K E S Q A Y Y D G R R S S

5.3. Plasmide

pJC40TEV

pRSET A

Aventis Kooperation

Dr. Simone Hornemann

5.4. Primer-Sequenzen

Tabelle 5.1: Verwendete Primer für die ortsspezifische Mutagenese.

Primer	Sequenz
forD178N revD178N	5'-aacttcgtgcacaactgcgtcaatc-3' 5'-gatattgacgcagttgtgcacgaagt-3'
forV180I revV180I	5'-gtgcacgactgcatcaatcaccatc-3' 5'-gatggtgatattgatgcagtcgtgcac-3'
forT183A revT183A	5'-tgcgtcaatcgcgatcaagcagcac-3' 5'-gtgctgcttgatggcgatattgacgca-3'
forH187R revH187R	5'-catcaagcagcgcacggtcaccac-3' 5'-gtggtgaccgtgcgctgcttgatg-3'
forE196K revE196K	5'-caccaaggggaagaactcaccg-3' 5'-cggagaagtcttccccttggtg-3'
forF198S revF198S	5'-aagggggagaactccaccgagaccgat-3' 5'-atcggctcggaggagttctcccctt-3'
forE200K revE200K	5'-gagaactcaccaagaccgatggaag-3' 5'-cttcacatcggcttggtgaagttctc-3'
forD202N revD202N	5'-caccgagaccaatggaagatgatg-3' 5'-catcatcttcacattggtctcgggtg-3'
forV203I revV203I	5'-cgagaccgatatcaagatgatggag-3' 5'-ctccatcatcttgatcgggtctcg-3'
forR208H revR208H	5'-gatgatggagcacgtggtggagc-3' 5'-gctccaccacgtgctccatc-3'
forQ212P revQ212P	5'-cgcgtggtggagccgatgtcgtcacc-3' 5'-ggtgacgcacatcggctccaccacg-3'
forQ217R revQ217R	5'-atgtgcgtcaccgggtaccagaaggag-3' 5'-ctccttctggtaccgggtgacgacat-3'

5.5. Puffer und Lösungen

5.5.1. Agarose Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x)

242 g Tris
57,1 mL Eisessig
100 mL 0,5 M EDTA, pH 8,0
Auf 1 mL mit ddH₂O aufgefüllt

Orange-G-Auftragspuffer (5x)

40 % Glycerin (v/v)
0,25 % Orange G (w/v)
in ddH₂O

Ethidiumbromidlösung

0,5 µg Ethidiumbromid in 1 mL ddH₂O

5.5.2. Puffer für Restriktionsverdau und PCR

NEB-Puffer 2 (Herstellerangaben)

10 mM Tris/HCl, pH 7,9
10 mM MgCl₂
50 mM NaCl
1 mM DTT

NEB-Puffer 4 (Herstellerangaben)

20 mM Tris/Acetat, pH 7,9
10 mM Mg(OAc)₂
50 mM KOAc
1 mM DTT

10x Reaktionspuffer (Herstellerangaben)

100 mM KCl
100 mM (NH₄)₂SO₄
200 mM Tris/HCl, pH 8,8
20 mM MgSO₄
1% Triton[®] X-100
1 mg mL⁻¹ nukleasefreies BSA

5.5.3. SDS-PAGE nach LaemmliProbenpuffer

100 mM Tris/HCl, pH 6,8
4% SDS (w/v)
0,2% Bromphenolblau (w/v)
20% Glycerin (v/v)
200 mM β -Mercaptoethanol

Trenngelpuffer (4x)

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
0,4% SDS (w/v)

Sammelgelpuffer (4x)

1 M Tris/HCl, pH 6,8
0,4% SDS (w/v)

Acrylamidlösung

30% Acrylamid
0,8% N,N'-Methylenbis-
acrylamid

Laufpuffer (10x)

0,25 M Tris
2,5 M Glycin
1% SDS (w/v)

Coomassie Blau-Färbelösung

1,1 g Coomassie Brilliant Blue
in 500 mL ddH₂O

Entfärbelösung

70% deionisiertes Wasser (v/v)
20% Methanol (v/v)
10% Eisessig (v/v)

5.5.4. Puffer zur Aufreinigung über IMAC

Puffer B (Renaturierungspuffer)

10 mM Tris/HCl, pH 8,0
100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0
5 mM Imidazol

Puffer G (Denaturierungspuffer)

6 M Guanidiniumhydrochlorid
10 mM Tris/HCl, pH 8,0
100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0
10 mM reduziertes Gluthation
5 mM Imidazol

Puffer W (Waschpuffer)

10 mM Tris/HCl, pH 8,0
100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0
50 mM Imidazol

Puffer E (Elutionspuffer)

10 mM Tris/HCl, pH 8,0
100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 8,0
150 mM Imidazol

5.5.5. Puffer zur Aufreinigung über Gelfiltration

Puffer A (Auftragungspuffer)

6 M Guanidiniumhydrochlorid
50 mM Tris/HCl, pH 7,2

Puffer L (Laufpuffer)

50 mM NaOAc
150 mM NaCl
1 M Harnstoff, pH 5,5

5.5.6. Puffer für ThT-Fluoreszenzassay

Puffer F (Aggregationspuffer)

- 1 M Harnstoff
- 1 M Guandiniumhydrochlorid
- 50 μM Thioflavin T, pH 2,0

5.5.7. Antibiotika-Stammlösungen

Ampicillin (1:1000)

- 100 mg mL^{-1} Ampicillin in ddH₂O

Chloramphenicol (1:1000)

- 60 mg mL^{-1} Chloramphenicol in Ethanol

5.5.8. Minimalmedien

M9-Minimalmedium zur ¹⁵N-Isotopenmarkierung

- 42 mM Na₂HPO₄
- 22 mM KH₂PO₄
- 8,5 mM NaCl
- 1 g L^{-1} NH₄Cl (¹⁵N)
- 0,1 mM CaCl₂
- 2 mM MgSO₄
- 10 g L^{-1} Glucose (steril filtriert)
- 1 mL L^{-1} Spurenelemente-Stammlösung
(enthält jeweils 1 mM Cu²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, MoO₄²⁻)
- 30 μM FeCl₃
- 5 ng L^{-1} Thiamin
- 1 mL L^{-1} Ampicillin-Stammlösung
- 1 mL L^{-1} Chloramphenicol-Stammlösung

M9-Minimalmedium zur ^{13}C , ^{15}N -Isotopenmarkierung

entsprechend der Zusammensetzung für die ^{15}N -Isotopenmarkierung,
statt 10 g L^{-1} Glucose wurden hier jedoch $2,5 \text{ g L}^{-1}$ ^{13}C -Glucose eingesetzt.

5.6. Software

CARA	www.nmr.ch
ExPASy ProtParam	www.expasy.ch/tools/protparam.html
NMRView	One Moon Scientific, Inc.
SigmaPlot 10.0	Systat Software, Inc. 2006
Sparky 3.113	(Goddard & Kneller 1997)
TOPSPIN 2.0	Bruker BioSpin 2006
TOPSPIN 2.1	Bruker BioSpin 2008

5.7. NMR-Akquisitions- und Prozessierungsparameter

Tabelle 5.2: Akquisitions- und Prozessierungsparameter für die Resonanzzuordnung an hPrP^{ox}.

Experiment	T ^a	B ₀ ^b	sw ₁ ^c	sw ₂ ^c	sw ₃ ^c	ns ^d	d _I ^e	ω _{15N} ^f	ω _{13C} ^f	SI ₁ ^g	SI ₂ ^g	SI ₃ ^g
[¹ H, ¹⁵ N]-HSQC	298	14,1	16,00	14,03	–	8	1,3	117,0	–	1024	2048	–
HN(CA)CO	298	14,1	18,41	20,01	14,03	16	1,3	117,0	176,0	256	64	2048
HNCACB	298	14,1	62,54	20,01	14,03	16	1,3	117,0	42,0	128	64	2048
HNN	298	14,1	24,00	24,00	13,95	16	1,3	117,0	54,0	64	64	2048

^a Temperatur in K^b magnetische Feldstärke in T^c spektrale Breite in erster, zweiter bzw. dritter Dimension in Hz^d Anzahl der Transienten pro Aufnahme^e Wartezeit zwischen den Aufnahmen in s^f Offset der Frequenzen für ¹⁵N und ¹³C in ppm^g Prozessierte Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

Tabelle 5.3: Akquisitions- und Prozessierungsparameter für die Resonanzzuordnung an hPrP^{red}.

Experiment	T ^a	B ₀ ^b	sw ₁ ^c	sw ₂ ^c	sw ₃ ^c	ns ^d	d ₁ ^e	ω _{15N} ^f	ω _{13C} ^f	SI ₁ ^g	SI ₂ ^g	SI ₃ ^g
[¹ H, ¹⁵ N]-HSQC	298	14,1	20,00	13,98	–	8	1,3	117,0	–	128	2048	–
HNCO	298	16,4	15,77	20,57	13,95	8	1,3	117,0	172,0	128	64	2048
HN(CA)CO	298	16,4	15,77	20,57	13,95	16	1,3	117,0	172,0	256	64	2048
HNCACB	298	16,4	53,58	20,57	13,95	8	1,3	117,0	42,0	512	64	2048

^a Temperatur in K

^b magnetische Feldstärke in T

^c spektrale Breite in erster, zweiter bzw. dritter Dimension in Hz

^d Anzahl der Transienten pro Aufnahme

^e Wartezeit zwischen den Aufnahmen in s

^f Offset der Frequenzen für ¹⁵N und ¹³C in ppm

^g Prozessierte Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

Tabelle 5.4: Akquisitions- und Prozessierungsparameter für die Resonanzzuordnung an mPrP^{ox}.

Experiment	T ^a	B ₀ ^b	sw ₁ ^c	sw ₂ ^c	sw ₃ ^c	ns ^d	d ₁ ^e	ω _{15N} ^f	ω _{13C} ^f	SI ₁ ^g	SI ₂ ^g	SI ₃ ^g
[¹ H, ¹⁵ N]-HSQC	298	14,1	19,00	13,98	–	8	1,3	116,5	–	256	2048	–
HNCO	298	18,8	9,20	18,00	13,95	8	1,4	117,0	171,0	128	64	2048
HN(CA)CO	298	14,1	18,41	20,01	14,03	16	1,3	116,5	176,0	256	64	2048
HNCACB	298	16,4	53,58	20,57	13,59	8	1,5	116,5	42,0	256	64	2048
HNN	298	14,1	24,00	24,00	13,95	16	2,0	116,5	54,0	64	64	2048

^a Temperatur in K^b magnetische Feldstärke in T^c spektrale Breite in erster, zweiter bzw. dritter Dimension in Hz^d Anzahl der Transienten pro Aufnahme^e Wartezeit zwischen den Aufnahmen in s^f Offset der Frequenzen für ¹⁵N und ¹³C in ppm^g Prozessierte Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

Tabelle 5.5: Akquisitions- und Prozessierungsparameter für die Resonanzzuordnung an mPrP^{recd}.

Experiment	T ^a	B ₀ ^b	sw ₁ ^c	sw ₂ ^c	sw ₃ ^c	ns ^d	d ₁ ^e	ω _{15N} ^f	ω _{13C} ^f	SI ₁ ^g	SI ₂ ^g	SI ₃ ^g
[¹ H, ¹⁵ N]-HSQC	298	18,8	19,89	13,95	–	8	1,3	116,5	–	256	2048	–
HN(CA)CO	298	18,8	13,80	18,00	13,95	16	1,3	116,5	172,0	512	256	2048
HNCACB	298	18,8	99,78	18,00	13,95	16	1,3	116,5	43,0	512	256	2048

^a Temperatur in K

^b magnetische Feldstärke in T

^c spektrale Breite in erster, zweiter bzw. dritter Dimension in Hz

^d Anzahl der Transienten pro Aufnahme

^e Wartezeit zwischen den Aufnahmen in s

^f Offset der Frequenzen für ¹⁵N und ¹³C in ppm

^g Prozessierte Punkte in erster, zweiter bzw. dritter Dimension

6. Literaturangaben

Adler AJ, Greenfield NJ, Fasman GD. 1973.

Circular dichroism and optical rotatory dispersion of proteins and polypeptides.

Methods Enzymol. 27:675-735

Aguzzi A, Heikenwalder M. 2003.

Prion diseases: cannibals and garbage piles.

Nature 423:127-129

Aguzzi A, Polymenidou M. 2004.

Mammalian prion biology. One century of evolving concepts.

Cell 116:313-327

Aguzzi A, Sigurdson C, Heikenwaelder M. 2008.

Molecular mechanisms of prion pathogenesis.

Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 3:11-40

Alper T, Haig DA, Clarke MC. 1966.

The exceptionally small size of the scrapie agent.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 22:278-284

Anderson RM, Donnelly CA, Ferguson NM, Woolhouse MEJ, Watt CJ, et al. 1996.

Transmission dynamics and epidemiology of BSE in British cattle.

Nature 382:779-788

Anfinsen CB. 1973.

Principles that govern the folding of protein chains.

Science 181:223-230

Ban T, Hamada D, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y. 2003.

Direct observation of amyloid fibril growth monitored by thioflavin T fluorescence.

J. Biol. Chem. 278:16462-16465

Baskakov IV, Legname G, Gryczynski Z, Prusiner SB. 2004.
The peculiar nature of unfolding of the human prion protein.
Prot. Sci. 13:586-595

Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Wälchli M, et al. 1986.
Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene.
Cell 46:417-428

Bhavesh NS, Panchal SC, Hosur RV. 2001.
An efficient high-throughput resonance assignment procedure for structural
genomics and protein folding research by NMR.
Biochemistry 40:14727-14735

Billeter M, Riek R, Wider G, Hornemann S, Glockshuber R, Wüthrich K. 1997.
Prion protein NMR structure and species barrier for prion diseases.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:7281-7285

Boehr DD, Dyson HJ, Wright PE. 2006.
An NMR perspective on enzyme dynamics.
Chem. Rev. 106:3055-3079

Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. 1982.
Identification of a protein that purifies with the scrapie prion.
Science 218:1309-1311

Britton TC, AlSarraj S, Shaw C, Campbell T, Collinge J. 1995.
Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 16-year-old in the UK.
Lancet. 346:1155

Brockes JP. 1999.
Topics in prion cell biology.
Curr. Opin. Neurobiol. 9:571-577

Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, et al. 1997.
Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent.
Nature 389:498-501

Bryngelson JD, Onuchic JN, Socci ND, Wolynes PG. 1995.
Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis.
Proteins Struct. Funct. Genet. 21:167-195

Büeler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, et al. 1993.
Mice devoid of PrP are resistant to scrapie.
Cell 73:1339-1347

Büeler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp H-P, et al. 1992.
Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP
protein.
Nature 356:577-582

Chandler RL. 1961.
Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material.
Lancet 1:107-108

Clubb RT, Thanabal V, Wagner G. 1992.
A constant time three-dimensional triple resonance pulse scheme to correlate
intraresidue H^N , ^{15}N and $^{13}C'$ chemical shifts in ^{15}N - ^{13}C labeled proteins.
J. Magn. Reson. 97:213-217

Cobb NJ, Apetri AC, Surewicz WK. 2008.
Prion protein amyloid formation under native-like conditions involves refolding of
the C-terminal α -helical domain.
J. Biol. Chem. 283:34704-34711

Cobb NJ, Sönnichsen FD, Mchaourab H, Surewicz WK. 2007.

Molecular architecture of human prion protein amyloid: A parallel, in-register β -structure.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:18946-18951

Cohen FE, Pan KM, Huang Z, Baldwin M, Fletterick RJ, Prusiner SB. 1994.

Structural clues to prion replication.

Science 264:530-531

Collinge J. 2001.

Prion diseases of humans and animals: Their causes and molecular basis.

Annu. Rev. Neurosci. 24:519-550

Collins E, Wirmer J, Hirai K, Tachibana H, Segawa S, et al. 2005.

Characterization of disulfide bond dynamics in non-native states of lysozyme and its disulfide deletion mutants by NMR.

ChemBioChem 6:1619-1627

Come JH, Fraser PE, Lansbury PTJ. 1993.

A kinetic model for amyloid formation in the prion diseases: importance of seeding.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5959-5963

Creutzfeldt HG. 1920.

Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems.

Neurol. Psychiat. 57:1-18

Cuille J, Chelle PL. 1936.

Pathologie animale. La maladie dite tremblant du mouton est-elle inoculable?

Compt. Rend. Acad. Sci. (Paris) 203:1552-1554

Cuille J, Chelle PL. 1939.

Experimental transmission of trembling to the goat.

Compt. Rend. Acad. Sci. 208:1058-1060

Das AK, Drew MGB, Haldar D, Banerjee A. 2005.

The role of the disulfide bond in amyloid-like fibrillogenesis in a model peptide system.

Org. Biomol. Chem. 3:3502-3507

Dayie KT, Wagner G. 1994.

Relaxation-rate measurements for ^{15}N - ^1H groups with pulsed-field gradients and preservation of coherence pathways.

J. Magn. Reson. A 111:121-126

DeMarco ML, Daggett V. 2004.

From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:2293-2298

DeMarco ML, Silveira J, Caughey B, Daggett V. 2006.

Structural properties of prion protein protofibrils and fibrils: an experimental assessment of atomic models.

Biochemistry 45:15573-15582

Deverell C, Morgan RE, Strange JH. 1970.

Studies of chemical exchange by nuclear magnetic relaxation in the rotating frame.

Mol. Phys. 18:553-559

Dill KA, Chan HS. 1997.

From Levinthal to pathways to funnels.

Nature Struct. Biol. 4:10-19

Farrar TC, Becker ED. 1971.

Pulse and Fourier Transform NMR.

New York

- Farrow NA, Muhandiram R, Singer AU, Pascal SM, Kay CM, et al. 1994.
Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ^{15}N NMR relaxation.
Biochemistry 33:5984-6003
- Gajdusek DC. 1988.
Transmissible and nontransmissible amyloidoses: autocatalytic posttranslational conversion of host precursor proteins to beta-pleated sheet configurations.
J. Neuroimmunol. 20:95-110
- Gajdusek DC, Gibbs CJ. 1971.
Transmission of two subacute spongiform encephalopathies of man (kuru and Creutzfeldt-Jakob disease) to new world monkeys.
Nature 230:588-591
- Gajdusek DC, Gibbs CJ, Alpers M. 1966.
Experimental transmission of a kuru-like syndrome to chimpanzees.
Nature 209:794-796
- Gerstmann J, Sträussler E, Scheinker I. 1936.
Über eine eigenartige hereditär-familiäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns.
Z. Neur. Psychiat. 154:736-762
- Gianni S, Travaglini-Allocatelli C, Cutruzzolà F, Brunori M, Ramachandra Shastry MC, Roder H. 2003.
Parallel pathways in cytochrome c_{551} folding.
J. Mol. Biol. 330:1145-1152
- Gill SC, Hippel PH. 1989.
Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequences.
Anal. Biochem. 182:319-326

Goddard TD, Kneller DG. 1997.

SPARKY 3.

University of California, San Francisco

Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE. 2004.

Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:8342-8347

Griffith JS. 1967.

Self-replication and scrapie.

Nature 215:1043-1044

Grzesiek S, Bax A. 1992.

Improved 3D triple resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein.

J. Magn. Reson. 96:432-440

Hadlow WJ. 1959.

Scrapie and kuru.

Lancet 274:289-290

Hart T, Hosszu LLP, Trevitt CR, Jackson GS, Waltho JP, et al. 2009.

Folding kinetics of the human prion protein probed by temperature jump.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106:5651-5656

Heinrikson RL. 1971.

The selective S-methylation of sulfhydryl groups in proteins and peptides with methyl-p-nitrobenzenesulfonate.

J. Biol. Chem. 246:4090-4096

Herrmann LM, Caughey B. 1998.

The importance of the disulfide bond in prion protein conversion.

NeuroReport 9:2457-2461

Hill AF, Desbruslais M, Joiner S, Sidle KCL, Gowland I, et al. 1997.

The same prion strain causes vCJD and BSE.

Nature 389:448-450

Hornemann S, Glockshuber R. 1998.

A scrapie-like unfolding intermediate of the prion protein domain PrP(121-231) induced by acidic pH.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6010-6014

Hsiao K, Baker HF, Crow TJ, Poulter M, Owen F, et al. 1989.

Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Sträussler syndrome.

Nature 338:342-345

Hsiao K, Prusiner SB. 1990.

Inherited human prion diseases.

Neurology 40:1820-1827

Jakob A. 1921.

Über eine eigenartige Erkrankung des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befund (Spastische Pseudoskleroseencephalomyopathie mit disseminierten Degenerationsherden).

Neurol. Psychiat. 64:147-228

James TJ, Liu H, Ulyanov NB, Farr-Jones S, Zhang H, et al. 1997.

Solution structure of a 142-residue recombinant prion protein corresponding to the infectious fragment of the scrapie isoform.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10086-10091

Jones EM, Surewicz WK. 2005.

Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids.

Cell 121:63-72

- Jones GP. 1966.
Spin-lattice relaxation in the rotating frame: weak-collision case.
Phys. Rev. 148:332-335
- Kahana E, Alter M, Braham J, Sofer D. 1974.
Creutzfeldt-Jakob disease: focus among Libyan Jews in Israel.
Science 183:90-91
- Kasha M. 1950.
Characterization of electronic transitions in complex molecules.
Disc. Faraday Soc. 9:14-19
- Kay LE, Nicholson LK, Delaglio F, Bax A, Torchia DA. 1992.
Pulse sequences for removal of the effects of cross correlation between dipolar and chemical-shift anisotropy relaxation mechanisms on the measurement of heteronuclear T_1 and T_2 values in proteins.
J. Magn. Reson. 97:359-375
- Keller R. 2004.
The computer aided resonance assignment tutorial.
Cantina Verlag
- Khurana R, Coleman C, Ionescu-Zanetti C, Carter SA, Krishna V, et al. 2005.
Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils.
J. Struct. Biol. 151:229-238
- Klein-Seetharaman J, Oikawa M, Grimshaw SB, Wirmer J, Duchardt E, et al. 2002.
Long-range interactions within a non-native protein.
Science 295:1719-1722
- Kocisko DA, Priola SA, Raymond GJ, Chesebro B, Lansbury PTJ, Caughey B. 1995.
Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3923-3927

Krebs MRH, Bromley EHC, Donald AM. 2005.

The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications.

J. Struct. Biol. 149:30-37

Lasmézas CI, Deslys J-P, Demaimay R, Adjou KT, Lamoury F, et al. 1996.

BSE transmission to macaques.

Nature 381:743-744

Lasmézas CI, Fournier J-G, Nouvel V, Boe H, Marcé D, et al. 2001.

Adaptation of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeldt-Jakob disease: Implications for human health.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:4142-4147

Levine HI. 1993.

Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides:

Detection of amyloid aggregation in solution.

Prot. Sci. 2:404-410

Levinthal C. 1968.

Are there pathways for protein folding?

J. Chim. Phys. 65:44-45

Liemann S, Glockshuber R. 1999.

Influence of amino acid substitutions related to inherited human prion diseases on the thermodynamic stability of the cellular prion protein.

Biochemistry 38:3258-3267

Lopez Garcia F, Zahn R, Riek R, Wüthrich K. 2000.

NMR structure of the bovine prion protein.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:8334-8339

Lysek DA, Schorn C, Nivon LG, Esteve-Moya V, Christen B, et al. 2005.

Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:640-645

M'Gowan. 1914.

Investigation into the disease of sheep called scrapie:

Edinburgh, Blackwood

Manson J, West JD, Thomson V, McBride P, Kaufman MH, Hope J. 1992.

The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis?

Development 115:117-122

Marsh JA, Singh VK, Jia Z, Forman-Kay JD. 2006.

Sensitivity of secondary structure propensities to sequence differences between α - and γ -synuclein: Implications for fibrillation.

Prot. Sci. 15:2795-2804

Moore RA, Taubner LM, Priola SA. 2009.

Prion protein misfolding and disease.

Curr. Opin. Struct. Biol 19:14-22

Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B. 1995.

Development expression of the prion protein gene in glial cells.

Neuron 14:509-517

Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. 1989.

Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, Thioflavine T.

Anal. Biochem. 177:244-249

Oesch B, Groth DF, Prusiner SB, Weissmann C. 1988.

Search for a scrapie-specific nucleic acid: a progress report.

Ciba Found. Symp. 135:209-223

Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, et al. 1985.

A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein.

Cell 40:735-746

- Ohhashi Y, Hagihara Y, Kozhukh G, Hoshino M, Hasegawa K, et al. 2002.
The intrachain disulfide bond of β_2 -microglobulin is not essential for the immunoglobulin fold at neutral pH, but is essential for amyloid fibril formation at acidic pH.
J. Biochem. 131:45-52
- Onuchic JN, Nymeyer H, García AE, Chahine J, Socci ND. 2000.
The energy landscape theory of protein folding: Insights into folding mechanisms and scenarios.
Adv. Prot. Chem. 53:87-130
- Onuchic JN, Wolynes PG, Luthey-Schulten Z, Socci ND. 1995.
Toward an outline of the topography of a realistic protein-folding funnel.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:3626-3630
- Owen F, Poulter M, Lofthouse R, Collinge J, Crow TJ, et al. 1989.
Insertion in prion protein gene in familial Creutzfeldt-Jakob disease.
Lancet. 1:51-52
- Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, et al. 1993.
Conversion of α -helices β -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10962-10966
- Panchal SC, Bhavesh NS, Hosur RV. 2001.
Improved 3D triple resonance experiments, HNN and HN(C)A, for H^N and ^{15}N sequential correlations in (^{13}C , ^{15}N) labeled proteins: Application to unfolded proteins.
J. Biomol. NMR 20:135-147
- Peng JW, Wagner G. 1992.
Mapping of spectral density functions using heteronuclear NMR relaxation measurements.
J. Magn. Reson. 98:308-332

Peti W, Smith L, Redfield C, Schwalbe H. 2001.

Chemical shifts in denatured proteins: Resonance assignments for denatured ubiquitin and comparisons with other denatured proteins.

J. Biomol. NMR 19:159-165

Prusiner SB. 1982.

Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie.

Science 216:136-144

Prusiner SB. 1989.

Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie prions.

Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 3:52-78

Prusiner SB, Dearmond SJ. 1990.

Prion diseases of the central nervous system.

Monogr. Pathol. 32:86-122

Radford SE, Dobson CM, Evans PA. 1992.

The folding of hen lysozyme involves partially structured intermediates and multiple pathways.

Nature 358:302-307

Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wüthrich K. 1996.

NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231).

Nature 382:180-182

Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wüthrich K. 1997.

NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231).

FEBS Lett. 413:282-288

Rose GD, Geselowitz AR, Lesser GJ, Lee RH, Zehfus MH. 1985.

Hydrophobicity of amino acid residues in globular proteins.

Science 229:834-838

- Safar J, Roller PP, Gajdusek DC, Gibbs CJ. 1993.
Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity.
Prot. Sci. 2:2206-2216
- Schlepckow K, Wirmer J, Bachmann A, Kiefhaber T, Schwalbe H. 2008.
Conserved folding pathways of α -lactalbumin and lysozyme revealed by kinetic CD, fluorescence, NMR and interrupted refolding experiments.
J. Mol. Biol. 378:686-698
- Schwalbe H, Fiebig KM, Buck M, Jones JA, Grimshaw SB, et al. 1997.
Structural and dynamical properties of a denatured protein. Heteronuclear 3D NMR experiments and theoretical simulations of lysozyme in 8 M urea.
Biochemistry 36:8977-8991
- Schwarzinger S, Kroon GJ, Foss TR, Chung J, Wright PE, Dyson HJ. 2001.
Sequence-dependent correction of random coil NMR chemical shifts.
J. Am. Chem. Soc. 123:2970-2978
- Schwarzinger S, Kroon GJ, Foss TR, Wright PE, Dyson HJ. 2000.
Random coil chemical shifts in acidic 8 M urea: Implementation of random coil shift data in NMRView.
J. Biomol. NMR 18:43-48
- Simonic T, Duga S, Strumbo B, Asselta R, Ceciliani F, Ronchi S. 2000.
cDNA cloning of turtle prion protein.
FEBS Lett. 469:33-38
- Spera S, Bax A. 1991.
Empirical correlation between protein backbone conformation and C_{α} and C_{β} ^{13}C nuclear magnetic resonance chemical shifts.
J. Am. Chem. Soc. 113:5490-5492

Strumbo B, Ronchi S, Bolis LC, Simonic T. 2001.

Molecular cloning of the cDNA coding for *Xenopus laevis* prion protein.

FEBS Lett. 508:170-174

Szyperski T, Luginbühl P, Otting G, Güntert P, Wüthrich K. 1993.

Protein dynamics studied by rotating frame ^{15}N spin relaxation times.

J. Biomol. NMR 3:151-164

Uversky VN, Li J, Fink AL. 2001.

Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein - A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure.

J. Biol. Chem. 276:44284-44296

Uversky VN, Li J, Souillac P, Millett IS, Doniach S, et al. 2002.

Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate -

Inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins.

J. Biol. Chem. 277:11970-11978

Vanik DL, Surewicz KA, Surewicz WK. 2004.

Molecular basis of barriers for interspecies transmissibility of mammalian prions.

Mol. Cell 14:139-145

Wagner G. 1993.

NMR relaxation and protein mobility.

Curr. Opin. Struct. Biol 3:748-754

Watzlawik J, Skora L, Frense D, Griesinger C, Zweckstetter M, et al. 2006.

Prion protein helix1 promotes aggregation but is not converted into β -sheet.

J. Biol. Chem. 281:30242-30250

Weissmann C. 1991.

A 'unified theory' of prion propagation.

Nature 352:679-683

Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, et al. 1987.

A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle.

Vet. Rec. 121:419-420

Wickner RB. 2005.

Scrapie in ancient China?

Science 309:874

Wilesmith JW, Ryan JB, Atkinson MJ. 1991.

Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin.

Vet. Rec. 128:199-203

Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, et al. 1996.

A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK.

Lancet. 347:921-925

Will RG, Zeidler M, Stewart GE, Macleod MA, Ironside JW, et al. 2000.

Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease.

Ann. Neurol. 47:575-582

Wille H, Michelitsch MD, Guénebaud V, Supattapone S, Serban A, et al. 2002.

Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:3563-3468

Wishart DS, Bigam CG, Holm A, Hodges RS, Sykes BD. 1995. ¹H, ¹³C and ¹⁵N random coil NMR chemical shifts of the common amino acids. I. Investigations of nearest-neighbor effects.

J. Biomol. NMR 5:67-81

Wishart DS, Sykes BD. 1994a.

Chemical shifts as a tool for structure determination.

Methods Enzymol. 239:363-392

Wishart DS, Sykes BD. 1994b.

The ^{13}C chemical-shift index: A simple method for the identification of protein secondary structure using ^{13}C chemical-shift data.

J. Biomol. NMR 4:171-180

Wishart DS, Sykes BD, Richards FM. 1991.

Relationship between nuclear magnetic resonance chemical shift and protein secondary structure.

J. Mol. Biol. 222:311-333

Wishart DS, Sykes BD, Richards FM. 1992.

The chemical shift index: A fast and simple method for the assignment of protein secondary structure through NMR spectroscopy.

Biochemistry 31:1647-1651

Wittekind M, Mueller L. 1993.

HNCACB, a high-sensitivity 3D NMR experiment to correlate amide-proton and nitrogen resonances with the alpha-carbon and beta-carbon resonances in proteins.

J. Magn. Reson. 101:201-205

Wolynes PG, Onuchic JN, Thirumalai D. 1995.

Navigating the folding routes.

Science 267:1619-1620

Yon JM. 2002.

Protein folding in the post-genomic era.

J. Cell. Mol. Med. 6:307-327

Zahn R, Liu A, Lührs T, Riek R, von Schroetter C, et al. 2000.

NMR solution structure of the human prion protein.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:145-150

Zhang H, Neal S, Wishart DS. 2003.

RefDB: A database of uniformly referenced protein chemical shifts.

J. Biomol. NMR 25:173-195

Ziegler J, Viehrig C, Geimer S, Rösch P, Schwarzinger S. 2006.

Putative aggregation initiation sites in prion protein.

FEBS Lett. 580:2033-2040

Zigas V, Gajdusek DC. 1957.

Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea.

Med. J. Aust. 2:745-754

Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Harald Schwalbe danke ich für die spannende und interessante Themenstellung, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und seine ständige Ansprechbarkeit.

Christian Richter danke ich für die Hilfe an den verschiedenen NMR-Spektrometern.

Julia Wirmer-Bartoschek und Robert Silvers danke ich für ihre Unterstützung bei der Analyse der verschiedenen Relaxationsraten sowie für anregende Diskussionen und hilfreiche Anmerkungen.

Anna Paulus und Elena Hartmann danke ich für die hervorragende Arbeit, die sie bei der Organisation des Arbeitskreises aus dem Sekretariat heraus leisten.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises und der Aventis-Kooperation danke ich für das gute Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft.

Besonderer Dank gilt den Mitgliedern des *Horizon Room* Katja Barthelmes, Senada Nozinovic und Jörg Rinnenthal für das tolle Büroklima.

Schließlich danke ich meinen Eltern ohne deren ideelle, materielle und finanzielle Unterstützung all dies nicht möglich gewesen wäre.

Publikationsliste

Hermann FG, Egerer L, Brauer F, Gerum C, Schwalbe H, Dietrich U, von Lear D. 2009.

Mutations in gp120 contribute to the resistance of human immunodeficiency virus type 1 to membrane-anchored C-peptide maC46.

J. Virol. 83:4844-4853

Gerum C, Silvers R, Wirmer-Bartoschek J, Schwalbe H. 2009.

Unfolded-state structure and dynamics influence the fibril formation of human prion protein

Angew. Chem. Int. Ed. 48:9452-9456

Gerum C, Schlepckow K, Schwalbe H.

The unfolded state of the murine prion protein and properties of single-point mutations related to human prion diseases

Manuskript under revision

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Gerum
Vorname:	<u>Christian</u> Thomas
Geburtsdatum:	25.12.1979
Geburtsort:	Hanau
Familienstand:	ledig
Religionszugehörigkeit:	evangelisch

Werdegang

1986 – 1990	Grundschule Wolfgang
1990 – 1999	Hohe Landesschule - Gymnasium der Stadt Hanau –
16.06.1999	Allgemeine Hochschulreife: Note 1,7
01.09.1999 – 30.06.2000	Ableistung des Grundwehrdienstes
01.10.2000 – 25.04.2005	Studium der Fachrichtung Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
14.08.2002	Diplom-Biochemie-Vorprüfung, Gesamtnote: “sehr gut“
25.10.2004 – 25.04.2005	Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Harald Schwalbe an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main mit dem Thema “NMR-spektroskopische Untersuchungen des Harnstoff entfalteten Zustands des humanen Prionenproteins hPrP(121–230)“
25.04.2005	Diplom-Biochemie-Hauptprüfung, Gesamtnote: “sehr gut“
02.06.2005	Beginn der Doktorarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. Harald Schwalbe an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Besondere Kenntnisse

1986 – 1996	Akkordeon-Unterricht
11.08.1992 – 15.12.1992	Maschinenschreiben für Anfänger mit Erfolg (Stenografenverein 1860 Hanau)
29.01.1996 – 15.07.1996	Stenografie für Anfänger mit gutem Erfolg (Stenografenverein 1860 Hanau)
1997 – 2005	aktives Mitglied im Evangelischen Posaunenchor Steinheim (Posaune)
seit 25.02.2005	aktives Mitglied im Blasorchester Wachenbuchen (Posaune)
seit 02.12.2007	Mitglied des Kirchenvorstands der Evangelischen Kirchengemeinde Wolfgang

Meine **akademischen Lehrer** an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main waren (in alphabetischer Reihenfolge):

Prof. Dr. Wolf Aßmus, Prof. Dr. Ernst Bamberg, Prof. Dr. Jürgen Bereiter-Hahn, Prof. Dr. Volker Dötsch, Prof. Dr. Ernst Egert, Prof. Dr. Dr. Hugo Fasold, PD Dr. Klaus Fendler, Prof. Dr. Jürgen Feierabend, Prof. Dr. Clemens Glaubitz, Prof. Dr. Werner Gnatzy, Prof. Dr. Michael Göbel, PD Dr. Ulrich Günther, Prof. Dr. Bernd Ludwig, Prof. Dr. Heinz D. Osiewacz, Prof. Dr. Roland Prinzing, Prof. Dr. Heinz Rüterjans, Prof. Dr. Reinhard Schmidt, Prof. Dr. Harald Schwalbe, Prof. Dr. Robert Tampé, Prof. Dr. Walter Volknandt, Prof. Dr. Herbert Zimmermann