

Semisynthese und Charakterisierung membranverankerter muriner Prion Proteine

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs Chemie der TU Dortmund

Angefertigt am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund

vorgelegt von
Diana Olschewski
aus Castrop-Rauxel (Nordrhein-Westfalen)

Dortmund, im November 2007

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung Physikalische Biochemie von Prof. Dr. Roger S. Goody, unter Anleitung von Dr. Christian Becker durchgeführt und von Prof. Dr. Martin Engelhard an der TU Dortmund betreut. Der experimentelle Teil wurde vom Januar 2005 bis zum August 2007 angefertigt.

1. Berichterstatter : Prof. Dr. M. Engelhard
2. Berichterstatter : Prof. Dr. R. Winter

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Dortmund

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert:

Marsac, Y., Cramer, J., Olschewski, D., Alexandrov, K. & Becker, C.F.W. Site-Specific Attachment of Polyethylene Glycol-like Oligomers to Proteins and Peptides. *Bioconjugate Chem.* **17**, 1492-1498 (2006).

Olschewski, D. *et al.* Semisynthetic Murine Prion Protein Equipped with a GPI Anchor Mimic Incorporates into Cellular Membranes. *Chemistry & Biology* **14**, 994-1006 (2007).

Inhaltsverzeichnis:

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Verwendete Materialien	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2 Instrumentation	16
2.1.3 Lösungen und Puffer	17
2.1.3.1 Lösungen und Puffer für molekularbiologisches Arbeiten	17
2.1.3.2 Lösungen und Puffer für proteinchemisches Arbeiten	18
2.1.4 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide	18
2.1.4 Medien zur Bakterienzucht	19
2.2 Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1 Zellanzucht	21
2.2.2 UV-photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA	21
2.2.3 Agarosegelelektrophorese zur DNA-Auftrennung	21
2.2.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	21
2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab	22
2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	22
2.2.7 Amplifikation von DNA-Fragmenten	22
2.2.8 Restriktion von DNA	23
2.2.9 Ligation von DNA	23
2.2.10 Elektrotransformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen	24
2.2.11 Sequenzierung von DNA	24
2.3 Proteinchemische Methoden	26
2.3.1 Proteinexpression in <i>E.coli</i> und Proteinreinigung	26
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	27
2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Proteinauftrennung	27
2.3.4 Westernblot und Immunonachweis	28
2.3.5 <i>Trans</i> -Spleißen des Fusionsproteins PrP(90-232)-DnaE ^N -His	28
2.3.6 Faltung der lipidierten Prion Protein Varianten rPrP ^{Palm}	29
2.3.7 Präparation von SUVs-Liposomen	29
2.3.8 Darstellung lipidierter SiO _x -Nanopartikel	29
2.3.9 <i>In vitro</i> Aggregation von rPrP und rPrP ^{Palm}	30

2.4	Chemische Methoden	31
2.4.1	Festphasensynthese von Peptiden	31
2.4.2	Abspaltung der Peptide vom Harz	32
2.4.3	Aufreinigung der Peptide	33
2.4.4	Native chemische Ligation der Peptide	33
2.4.5	Peptidanalytik	34
2.5	Biophysikalische Methoden	35
2.5.1	Dynamische Lichtstreuung	35
2.5.2	CD-Spektroskopie	35
2.5.3	Fluoreszenzspektroskopie	35
2.5.4	Isotherme Titrations Kalorimetrie	35
2.5.5	Rasterkraftmikroskopie (AFM)	36
2.5.6	FT-ATR-Spektroskopie	36
2.5.7	NMR-Spektroskopie	36
2.6	Zellkultur	37
2.6.1	Kultivierung von Zellen	37
2.6.2	Transfektion von rPrP ^{Palm}	37
2.6.3	Zelluläre Aufnahme von rPrP ^{Palm}	37
2.6.4	Indirekte Immunofluoreszenz	37
2.6.5	Flotations Untersuchung	38
3.	ERGEBNISSE	39
3.1	Semisynthese von membranverankertem Maus Prion Protein	39
3.1.1	Darstellung von rPrP ^{Palm} mittels EPL	39
3.1.1.2	Festphasenpeptidsynthese der lipidmodifizierten Peptide	40
3.1.1.3	Darstellung von NHS aktiviertem Cy5	42
3.1.1.4	Synthese von Peptid 1	43
3.1.1.5	Synthese von Peptid 2	45
3.1.1.6	Synthese von Peptid 3	46
3.1.1.7	Synthese von Peptid 4	47
3.1.1.8	Expression und Aufreinigung von rPrP-C _α -Thioester	48
3.1.1.9	Ligation von rPrP-C _α -Thioester mit Peptid 4	50
3.1.2	Darstellung von rPrP ^{Palm} mittels Protein <i>trans</i> -Spleißen	52
3.1.2.1	Synthese und Ligation von lipidierten DnaE ^C Varianten	53

3.1.2.2	Expression und Aufreinigung von mPrP(89-232)-DnaE ^N -His	60
3.1.2.3	Faltung des rekombinanten PrP	65
3.1.2.4	Aggregation der Prion Protein Varianten	68
3.1.2.5	Insertion des lipidierten Prion Proteins in Membranen	72
3.1.2.6	Zelluläre Aufnahme	75
3.2	Protein Immobilisierung auf lipidierten SiO _x -Nanopartikeln	79
3.2.1	Expression und Aufreinigung von eGFP-DnaE ^N -His	80
3.2.2	Bestimmung der Bindungskonstante der Inteinsegmente	81
3.2.3	Insertion des lipidierten eGFP in Membranen	83
3.2.4	Kinetik der Spleißreaktion auf Nanopartikeln	86
3.3	N-terminale Fluoreszenzmarkierung von mPrP(90-232)	89
3.3.1	Expression und Aufreinigung von rPrP(134-232)S134C	90
3.3.2	Synthese von mPrP(90-133)-SR	92
3.3.3	Ligationen zur Darstellung von N-terminal modifizierten rPrP(90-232)	94
3.4	Inhibitoren der Fibrillogenese	98
3.4.1	Untersuchung der Bindung von EGCG/ECG an mPrP	99
3.4.2	Untersuchung der strukturellen Änderung von rPrP durch EGCG Bindung	101
3.4.3	Einfluss der Inhibitoren auf die <i>in vitro</i> Aggregation von rPrP	103
3.4.4	Einfluss der N-terminalen Sequenz auf die Bindung von EGCG	105
3.4.4.1	Untersuchung der strukturellen Änderung von rPrP(134-232) durch Zugabe von EGCG	106
3.4.4.3	Bindung von EGCG an rPrP(134-232)	109
4.	DISKUSSION	111
4.1	Semisynthese von C-terminal lipidierten Proteinen	111
4.1.1	Charakterisierung von lipidierten murinen Prion Protein Varianten	112
4.1.2	Immobilisierung von eGFP auf lipidierten Nanopartikeln	119
4.1.3	N-terminale Fluoreszenzmarkierung des murinen Prion Proteins	121
4.2	Inhibitoren der Fibrillogenese	123
5.	ZUSAMMENFASSUNG	131
6.	LITERATURVERZEICHNIS	133
7.	ANHANG	141

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaar
CMC,	Kritische Mizellenkonzentration
CTAB	Cetytrimethylammoniumbromid
DDM	N-Dodecyl- β -D-maltosid
DDM	N-Dodecyl- β -D-maltosid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC	Desoxycholol
DOPC	C18:1-Dioleoylphosphatidylcholin
DPC	Dodecylphosphocholin
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
h	Stunde(n)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge des Lichts
MesNa	2-Mercaptoethansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
o/n	über Nacht
OD	Optische Dichte
OD _x	Optische Dichte bei Wellenlänge x nm
OG	n-Octyl- β -D-glycopyranosid
PAGE	Polyarylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline

PCR	Polymerase Kettenreaktion
rbs	ribosomale Bindungsstelle
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
u	<i>units</i>
VÄ	Volumen-Äquivalent

Ein- und Dreibuchstabencode der 20 codierten Aminosäuren

Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Aspartat	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutamat	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Alanin	R	Ala
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

1. Einleitung

Lange Zeit ging man davon aus, dass die native dreidimensionale Struktur von Proteinen allein durch ihre Primärsequenz definiert ist und die thermodynamisch stabilste Form darstellt¹. Diese Vorstellung der Proteinfaltung musste nach der Entdeckung stabiler, nicht nativer Protein Konformationen grundlegend überdacht werden. Die Stabilität solcher Konformationen konnte schließlich unter Verwendung des Faltungstrichtermodells erklärt werden². Danach kann ein sich faltendes Protein auf unterschiedliche Weise seine native Struktur erlangen. Dabei können zum Teil kinetisch stabile Intermediate durchlaufen werden, welche dazu führen, dass das Protein in einem lokalen Energieminimum „gefangen“ ist und nicht seine native Struktur annimmt. Diese fehlgefalteten Proteine sind zum Teil toxisch und führen zum Ausbruch unterschiedlicher Erkrankungen. Dabei ist charakteristisches Merkmal dieser sogenannten Protein-konformationeller Krankheiten die Ablagerung von Proteinen in der Form von amyloiden Fibrillen und Plaques. Von dieser Gruppe der Protein-konformationellen Erkrankungen sind sowohl das zentrale Nervensystem (ZNS), wie auch eine Vielzahl anderer Gewebe betroffen. Die Pathogenese zeichnet sich durch die Fehlfaltung, Fehlprozessezierung und Aggregation von spezifischen Proteinen aus. Zu der Klasse der neurodegenerativen Amyloidosen gehören unter anderem Alzheimer, Parkinson, Polyglutamin-Erkrankungen, wie Huntington, oder die unter Säugern weit verbreitete Gruppe der TSEs (Transmissible spongiform encephalopathies), welche auch als Prionen Erkrankungen bezeichnet werden. Trotz aller Gemeinsamkeiten innerhalb der Gruppe der Protein-konformationellen Krankheiten unterschieden sich die TSEs durch ihre Eigenschaft nicht nur in sporadischer oder vererblicher Form auf zu treten, sondern auch als infektiöse Variante vor zu kommen³. Stellvertreter dieser TSE Erkrankungen im Menschen sind die Creutzfeld-Jakob-Krankheit, das Gerstmann-Sträussler-Scheinker-Syndrom (GSS), „Fatal familial insomnia“ (FFI) und Kuru. Bei Nutztieren treten die TSE's in Form der Traber Krankheit bei Schafen und Ziegen und BSE bei Rindern⁴.

Die am längsten bekannte Form einer TSE ist die Traber Krankheit, über die erste Berichte bereits vor 200 Jahren verfasst wurden und deren Übertragbarkeit bereits seit ca. 100 Jahren bekannt ist⁵. Trotz dieser Beobachtung ging man lange Zeit nicht von der Infektiösität humaner neurodegenerativer Erkrankungen aus. Dies änderte sich erst mit der Entdeckung der Kuru-Krankheit bei einem kannibalischen Volksstamm in Neu Guinea im Jahre 1957⁶. Die Übertragbarkeit Kurus auf Chimpansen konnte von Hadlow et al. nachgewiesen werden⁷

womit der Beweis der Infektiosität einer humanen neurodegenerativen Erkrankung erbracht war. Später wurden von Klatzo weitere Ähnlichkeiten zwischen Kuru und CJD detektiert⁸.

Auf Grund dieser Ergebnisse wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass eine Infektion mit TSE lediglich innerhalb einer Spezies oder einer nah verwandten Art stattfindet. Jedoch kann vermutlich durch regelmäßige Aufnahme von infiziertem Material diese Speziesbarriere überwunden werden. Als prominentes Beispiel dafür dient das Auftreten der bovinen spongiform encephalopathy (BSE) in Großbritannien in den 90er Jahren⁹. Ob der Ausbruch dieser Epidemie durch die Übertragung der Traber-Krankheit oder durch eine neue ursprünglich sporadisch auftretende Form in Rindern ausgelöst wurde, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden. Die Verbreitung dieser Krankheit wurde jedoch durch die Verfütterung von Tiermehl an Rinder begünstigt.

Im Zusammenhang mit BSE wurde ferner eine neue Variante der CJD (vCJD) beobachtet, welche sich durch das ungewöhnlich junge Alter der Patienten (~ 30 Jahre) im Vergleich zu der klassischen Form der CJD (~ 65 Jahre) unterscheidet. Die Inkubationszeit von vCJD beträgt nach erfolgter Infektion durchschnittlich 12,6 Jahre und der Krankheitsverlauf 14 Monate im Vergleich zu 6 Monaten für die sporadische Form von CJD (sCJD)¹⁰. Auch die klassischen Mutationen wie M129V des später identifizierten CJD auslösenden Proteins PrP, welche eine Fehlfaltung begünstigen, wurden in an vCJD erkrankten Patienten nicht detektiert. Das zeitnahe Auftreten dieser Variante mit der BSE Epidemie in Jahr 1996 und dessen überwiegende Beschränkung auf Großbritannien legt die Vermutung nahe, dass eine Übertragung von BSE durch den Verzehr von kontaminierten, auf Rind basierenden Lebensmitteln auf den Menschen stattgefunden hat. Durch das Verbot des Einsatzes von Tiermehl als Futtermittel in der Nutztierhaltung konnte die BSE Erkrankung weitestgehend eingedämmt werden, ferner sind, durch die strikte Kontrolle des zum Verzehr bestimmten Rindermaterials, ebenfalls die Zahlen der an vCJD erkrankten Personen rückläufig. Durch die zum Teil lange Inkubationszeit ist zwar eine zweite Welle von vCJD Erkrankungen nicht auszuschließen, jedoch ist die Wahrscheinlichkeit recht gering.

Nachdem eine Übertragbarkeit dieser neurodegenerativen Erkrankungen feststand, lag nun der Fokus auf der Identifikation des erforderlichen Erregers. Einer der dabei angestellten Vermutungen über dessen Natur gingen, auf Grund der langen Inkubationszeit, unter anderem auch von einem „langsamen Virus“ aus, welcher zunächst latent im Wirt vorhanden ist und erst Jahre nach der Infektion zu einem Ausbruch der Krankheit führt¹¹. Als weitere mögliche Erreger wurden kleine DNA Viren, Membranfragmente, Polysaccharide und Proteine postuliert^{5,12-18}. Bei den zur Aufklärung der Natur dieses Pathogens durchgeführten

Untersuchungen erwiesen sich die infektiösen Isolate als resistent gegenüber Prozeduren wie UV-Bestrahlung oder Behandlung mit ionisierender Strahlung, welche eine Inaktivierung von DNA und RNA bewirken, nicht aber gegenüber der Behandlung mit Protein modifizierenden Agenzien. Die Summe der von unterschiedlichen Gruppen erhaltenen Ergebnisse deutete verstärkt darauf hin, dass eine Infektiosität der TSE Pathogene auf ein Protein oder mehrere Proteine zurückzuführen ist. An Hand der Beobachtungen wurde von S. Prusiner schließlich die „Protein only hypothesis“ aufgestellt¹⁹. In dieser geht er davon aus, dass das Pathogen größtenteils, wenn nicht ausschließlich, aus Proteinen bestehen muss und nannte diese Erreger Prionen (**proteinaceous and Infectious partice**l). Die fehlende Immunantwort wies ferner darauf hin, dass es sich um ein wirtseigenes Protein handeln muss, welches im weiteren Verlauf von McKinley et al. als eine, durch einen noch nicht näher charakterisierten posttranslationalen Prozess, fehlgefaltete Variante des membranständigen Proteins PrP^C identifiziert werden konnte²⁰⁻²². In Analogie zu der am längsten bekannten Prionen Erkrankung in Schafen und Ziegen, wird diese Form des Proteins als PrP^{Sc} bezeichnet, wobei Sc für Scrapie, die englische Bezeichnung der Traber-Krankheit steht. Die dreidimensionale Struktur des unter Säugern hochkonservierten zellulären PrP^C konnte NMR-spektroskopisch aufgeklärt werden²³⁻²⁶. Dabei zeigen die Strukturen der einzelnen Spezies lediglich geringe Unterschiede. Als typisches Beispiel ist im Folgenden die Struktur des 209 AS großen syrischen Hamster Prion Proteins dargestellt. Es verfügt über einen flexiblen N-terminalen Bereich und einen strukturierten C-terminalen Bereich, der die Aminosäuren 90-232 umfasst und in Abb. 1 dargestellt ist. Dieser nimmt seine Struktur unabhängig vom N-Terminus ein.

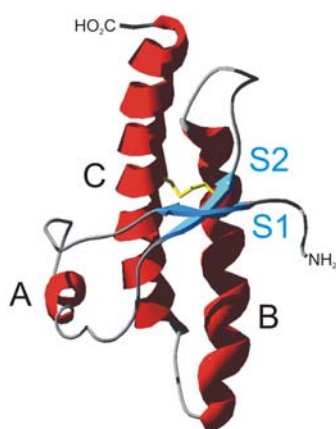


Abb. 1: Ribbon Darstellung der PrP(90-231) Struktur. Die drei Helices erscheinen rot. Helices B und C sind über eine Disulfidbrücke (gelb) über die AS C179 und C214 verknüpft. Die Stränge S1 und S2 des β -Faltblattes sind als blaue Pfeile dargestellt. Die Loops und die unstrukturierte N-terminale Domäne sind grau dargestellt²⁶.

Diese C-terminale Domäne besteht aus drei α -Helices und einem kurzen zweisträngigem β -Faltblatt. Die Helices B und C werden durch eine Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen 179 und 214 verknüpft ²⁶.

Die strukturelle Komplexität des PrPs wird durch mehrere posttranslationalen Modifikationen erhöht. Während der Biogenese wird das Protein durch ein N-terminales Signalpeptid zum Lumen des endoplasmatischen Retikulums dirigiert. Dort werden die Modifikationen nach Entfernung des Signalpeptids initialisiert und die Reste Asn 181 und Asn 197 N-glycosyliert. Nach der Abspaltung eines C-terminalen Signalpeptids und dem Transfer eines Glycosylphosphatidyinositol (GPI)-Ankers an die Akzeptoraminosäure S231 werden die posttranslationalen Modifikationen durch die Prozessierung der Glycangrundgerüste in komplexe Glycosylierungsmuster im Golgi Apparat vervollständigt ^{27,28}. Korrekt gefaltetes, reifes PrP^C wird über den Translokationsweg zur Außenseite der Plasmamembran dirigiert, wo es vermutlich in bestimmte stärker geordnete Bereiche segregiert ²⁹. Man geht davon aus, dass für die konformationelle Änderung in die pathogene PrP^{Sc} Form die Membranlokalisierung essentiell ist ²⁹⁻³². Die Ausbildung einer TSE Erkrankung im Mausmodell erfordert GPI verankertes PrP. Fehlt diese Modifikation bilden sich zwar fibrilläre Strukturen, welche jedoch nicht zur typischen Pathologie einer TSE führten.

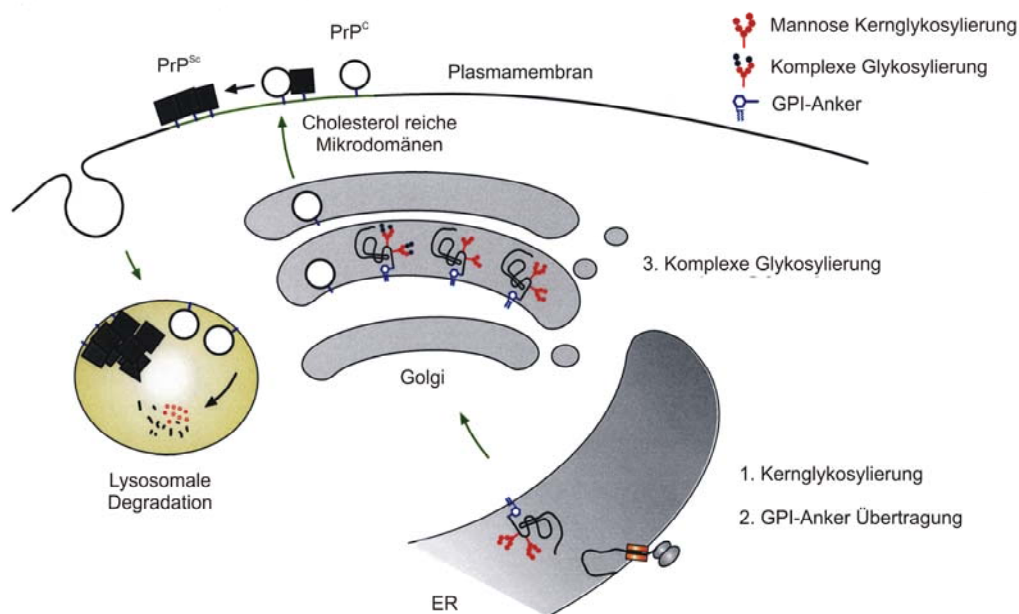
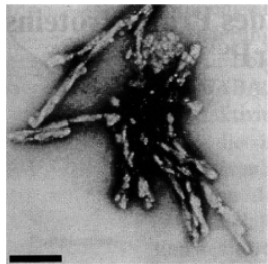


Abb. 2: Biosynthese des mammalianen Prion Proteins ³³ (Bild übernommen von J. Tatzelt)

Im Vergleich der zellulären mit der pathogenen Variante des Prion Proteins ergeben sich bei gleicher Primärsequenz und gleichem Modifikationsmuster jedoch signifikante Unterschiede

bezüglich ihrer physikalischen Eigenschaften. Das monomere PrP^C zeichnet sich durch einen hohen α -helikalen Anteil von 43% aus und das PrP^{Sc} besteht überwiegend aus β -Faltblatt-haltigen Strukturen. Wohingegen die Struktur des PrP^C verschiedener Spezies weitestgehend bekannt ist, fehlen detaillierte Ergebnisse der Struktur der Fibrillen von PrP^{Sc}. Dabei weisen die Fibrillen verschiedener Proteine eine hohe Übereinstimmung der eingenommenen Strukturelemente, wie die Ausbildung einer „cross- β “ Struktur, auf³⁴. Die hohe Unlöslichkeit der gebildeten hochmolekularen Strukturen erschwert jedoch die Analyse dieser Strukturen mittels Methoden wie NMR und Kristallographie^{35,36}. Anhand hochauflösender elektronenmikroskopischer Aufnahmen wurde Vermutung aufgestellt, dass die gebildeten PrP Fibrillen die Struktur einer parallelen links händigen β -Helix beinhalten^{37,38}. Diese Strukturen tendieren zur Ausbildung von Trimeren, welche dann in lange Filamente assemblieren. Gestützt wird diese These durch molekular dynamische Simulationen von DeMarco et al. , welche ebenfalls die Ausbildung trimerer Strukturen bei niedrigen pH-Werten postulieren^{39,40}. Die Bildung dieser amyloiden Strukturen hat des Weiteren die Akkumulation des Proteins in den Endosomen, Lysosomen und an der Zelloberfläche oder in den extrazellulären Zwischenräumen zur Folge. Die beobachtete Schädigung des Nervengewebes und dies führt zu den charakteristischen Krankheitsmerkmalen, wie Koordinationsstörungen und Demenz⁴¹. Zur Detektion von PrP^{Sc} *in vitro* macht man sich häufig die unterschiedliche Zugänglichkeit dieser fibrillären Form des Proteins gegenüber Proteolyse im Vergleich zu PrP^C zu Nutze. Die Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} hat die Ausbildung eines gegenüber Proteinase K resistenten Kerns, welcher die Aminosäuren 90-231 umfasst, zur Folge. Die biochemischen und biophysikalischen Unterschiede der beiden Formen des Prion Proteins sind im Folgenden tabellarisch aufgelistet (Tab 1).

PrP^C	⇒	PrP^{Sc}	⇒	Aggregierte Prionen
α -helikal		β -Faltblatt		
Löslich		Unlöslich		
PK sensitiv		PK resistent		
Monomer		Aggregatbildung		
Nicht infektiös		Infektiös		

Tab 1: Auflistung der unterschiedlichen Eigenschaften von PrP^C und PrP^{Sc}

Trotz intensiver Forschung ist die molekulare Basis, welche zur Ausbildung einer Amyloidose führt und deren Propagierung noch nicht bis ins Detail verstanden. Am Beispiel von PrP^{Sc} wurden initiale Infektiositätsuntersuchungen mit aus Nervengewebe isolierten Aggregaten durchgeführt, welches zu der Annahme führte, dass eben diese Filamente die Erkrankung propagieren. Weitere Studien führten jedoch zu den im Folgenden in der Literatur beschriebenen beiden aktuellen Modellen, welche den Prozess der Verbreitung von PrP^{Sc} erklären sollen (Abb. 3):

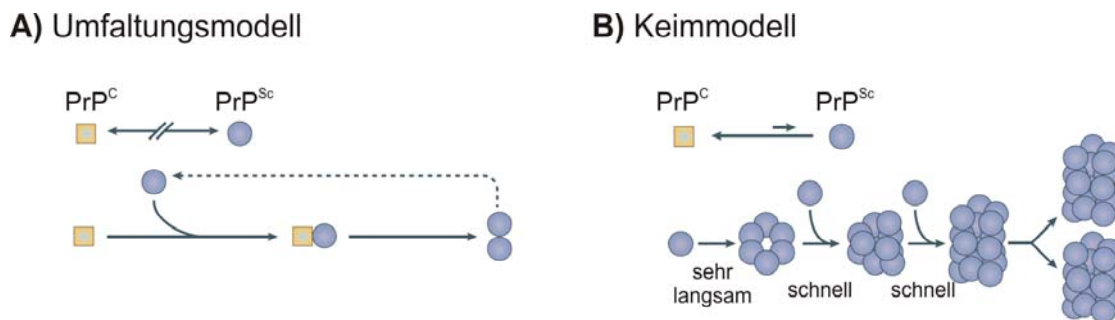


Abb. 3: Darstellung der unterschiedlichen Modelle der PrP Konversion ⁴².

Bei dem in Abb. 3 A dargestellten Umfaltungsmodell wird davon ausgegangen, dass die Änderung der Konformation kinetisch kontrolliert ist. Die für diesen Prozess benötigte Aktivierungsenergie ist dabei so hoch, dass es spontan nicht zur Bildung von PrP^{Sc} kommt. Die Induktion der Konversion findet erst nach Interaktion von PrP^C mit exogen eingeführten PrP^{Sc} statt. Das Auftreten von Erkrankungen wie sCJD oder GSS resultiert durch Mutationen innerhalb des PrP Gens, welche zu einer Erniedrigung der Aktivierungsenergie führen. Das in Abb. 3 B dargestellte Keimmodell setzt voraus, dass sich PrP^C im Gleichgewicht mit PrP^{Sc} befindet, wobei sich letzteres nur in Form von kristallähnlichen Keimen oder Aggregaten stabilisieren lässt. Die Ausbildung dieser Keime ist ein sehr langsamer Prozess, sind sie jedoch vorhanden lagern sich monomere PrP Moleküle sehr schnell an diese Strukturen an. Zur Erklärung der beobachteten exponentiellen Konversionsraten ist eine Fragmentierung der Aggregate zur Vergrößerung der aktiven Oberfläche notwendig ⁴². Neueren Erkenntnissen zu Folge sind nicht Fibrillen die Spezies mit der ausgeprägtesten Infektiosität, sondern vielmehr nicht fibrilläre Intermediate, welche aus 14 bis 28 PrP Molekülen bestehen ⁴³. Die reifen Fibrillen stellen somit lediglich den Endzustand dar. Diese Beobachtungen stützen die These des Keimmodells für die Propagierung von PrP^{Sc}.

Auf Grund dieser Untersuchungen könnten z.B. therapeutische Ansätze, welche auf der Fragmentierung gebildeter amyloiden Plaques beruhen, zur unabsichtlichen Beschleunigung

des Krankheitsverlaufs führen. Diese Beobachtung ist konsistent mit anderen Protein konformationellen Erkrankungen, bei denen ebenfalls lösliche oligomere Strukturen die Konversion der betreffenden Proteine in ihre pathogene Form propagieren⁴⁴.

Neben der Aufklärung der molekularen Prozesse, welche die Konversion des zellulären Prion Protein in seine pathologische Form induzieren, ist die Entwicklung von Therapeutika, welche durch eine gezielte Interaktion mit dem Protein, die Ausbildung der Pathogene verhindern. Trotz der hohen Diversität der bereits identifizierten, gegen die Bildung von PrP^{Sc} wirksamen Substanzen, teilen diese stets bestimmte Eigenschaften, wie z.B. definierte PrP Bindungsstellen, Induktion von PrP Aggregation und Endocytose des Proteins. Dabei scheint die Bindung dieser Inhibitoren mit der bis jetzt noch kontrovers diskutierten biologischen Funktion des zellulären Prion Proteins verknüpft zu sein. Als potentielle Bindungspartner von PrP an der Außenseite der Zellmembran werden Nukleinsäuren, Porphyrine und Metalle wie z.B. Cu(II) diskutiert⁴⁵⁻⁵¹. Auf Grund der Bindung an diese unter Umständen schädigenden Faktoren wird weitestgehend von einer protektiven Funktion des Prion Proteins bei oxidativem Stress ausgegangen⁵².

Neben der noch nicht eindeutig geklärten natürlichen Funktion des PrPs bedarf auch dessen vollständige Rolle bei den TSE Erkrankungen noch weiterer Untersuchungen. Denn obwohl viele Indizien die von Prusiner aufgestellte „Protein only hypothesis“ unterstützen, konnte bis jetzt noch nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die Infektiösität der Prion Erkrankungen ausschließlich auf PrP^{Sc} zurückzuführen ist und keine weitere zelluläre Komponente dazu benötigt wird. Ein endgültiger Beweis des Prion Konzeptes erfordert die Generierung von infektiösem PrP aus hochgereinigten Proteinen *in vitro*. Dabei muss eine Kontamination des Materials mit den potentiellen zellulären Co-Faktoren ausgeschlossen werden. Ein Ansatz dazu stellt die Verwendung rekombinanter Prion Proteine dar. Bei entsprechenden von Legname et al. durchgeführten Versuchen, wurden *in vitro* generierte Fibrillen aus rekombinantem Material in das Nervengewebe von Mäusen, welche 16 fach PrP überexprimieren appliziert⁵³. Diese Mäuse entwickelten eine neurologische Funktionsstörung in einem Zeitrahmen von 380 bis 660 Tagen nach erfolgter Inokulation. Die lange Inkubationszeit und das erhöhte Expressionsniveau des PrP Proteins in den Mäusen lassen nicht ausschließen, dass die entwickelte Neurodegeneration der Mäuse auf eine spontane Konversion des PrPs zurückzuführen ist. Deshalb liefert diese Studie nicht den endgültigen Beweis der „Protein only hypothesis“.

Andere Ansätze zur Generierung von PrP^{Sc} *in vitro* verwenden das Homogenisat von infiziertem Nervengewebe als Templat der Konversion. Bei dieser als PMCA (**P**rotein

misfolding cyclic amplification) bezeichneten Methode wird infektiöses Material als Keim in eine Konversionsreaktion mit rekombinantem PrP^C eingebracht und mit Ultraschall behandelt. Diese Beschallung bewirkt eine Fragmentierung der amyloiden Strukturen und beschleunigt die Fibrillognese. Dieser Ansatz wird nun mehrfach in eine Lösung mit rekombinanten Prionen 1:10 verdünnt und die Prozedur wiederholt. Durch das wiederholte Verdünnen des initialen Homogenisats in eine PrP^C Lösung befinden sich nach dem letzten PMCA Zyklus praktisch keine Proteine aus der ursprünglichen Probe mehr in der erhaltenen Lösung, somit konnte PrP^{Sc} aus hochgereinigtem PrP^C generiert werden⁵⁴⁻⁵⁷. Durch den Zusatz polyanionischer Agenzien zum PMCA Ansatz konnte der erreichte Infektiositätstiter auf das gleiche Niveau des initialen Homogenisats gesteigert werden⁵⁸. Dieses Resultat unterstützt die These, dass die *de novo* Bildung von PrP^{Sc} die Interaktion von PrP^C mit anderen Zellkomponenten wie Nukleinsäuren oder GAGs (Glykosaminoglykanen) benötigt. Ein Vorteil dieser Methode ist sicherlich die Anwendbarkeit zur Detektion geringer Menge von PrP^{Sc} durch Amplifikation⁵⁹⁻⁶¹.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den hochinfektiösen Prion Partikeln, welche *in vitro* durch PMCA hergestellt worden sind und der rein rekombinanten Prion Fibrillen mit geringer bis keiner Infektiosität sind die natürlichen posttranslationalen Modifikationen des PrPs aus Säugetierzellen, deren Einfluss auf die *de novo* Formation von PrP^{Sc} noch nicht vollständig geklärt ist. Dabei tritt in der Natur eine Mischung aus nicht-, einfach- oder zweifach glykosilierten PrP Varianten auf. Neben den auftretenden unterschiedlichen Glykosilierungsmustern ist, wie bereits erwähnt, die Verankerung des zellulären Prion Proteins an der Außenseite der Plasmamembran durch einen C-terminalen GPI Anker, ein entscheidender Faktor für die Ausbildung der charakteristischen Symptome einer TSE. Nach Deletion des GPI-Ankers wird zwar weiterhin die Ausbildung von PK resistenten Partikeln nach Infektion beobachtet, jedoch bleiben die Symptome einer klassischen TSE Erkrankung aus³⁰. Ferner unterschied sich die Distribution und Morphologie der gebildeten Plaques. Die Analyse der GPI-Ankerfreien Ablagerungen zeigte ausschließlich große extrazelluläre amyloide Plaques, wohingegen für den Wildtyp nicht-amyloide Ablagerungen charakteristisch sind. Eine Co-expression von verankertem und ankerfreiem PrP (Δ GPI-PrP) bewirkte jedoch im Tiermodell eine Beschleunigung des Krankheitsverlaufs. Es wird angenommen, dass die aus Δ GPI-PrP gebildeten PK resistenten Proteine (PrP-res) ebenfalls als Templat für die Konversion von wt PrP dienen⁶². Dies ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass zu einem bestimmten Anteil die Membranverankerung des Proteins für die initiale Ausbildung von TSEs erforderlich ist^{63,64}.

Obgleich die beschriebenen Daten die These eines direkten Einflusses der Membranverankerung bei der Konversion von PrP^C in PrP^{Sc} unterstützen, wurden in der Vergangenheit die meisten Untersuchungen mit rekombinanten Prionen ohne diese posttranslationalen Modifikationen durchgeführt^{19,65-67}. Deshalb ist ein Rückschluss der daraus erhaltenen Ergebnisse auf das Verhalten der Proteine in ihrer natürlichen Umgebung nur bedingt möglich. Die aufwendige Isolation aus DRM's (detergent resistant membranes) und die geringen Ausbeuten an PrP^C unter Verwendung eukaryotischer Expressionssysteme erschwert die biophysikalische Charakterisierung von membranverankerten Prion Proteinen *in vitro*.

Die Verwendung neuer Methoden in der Proteinchemie bietet nun jedoch die Möglichkeit der Inkorporation von Modifikationen. Dabei kann eine Lipidierung der Proteine auf unterschiedliche Weise erzielt werden. Die Einführung eines C-terminalen Cysteins ermöglicht dessen Modifikation zum einen durch die Ausbildung von Disulfidbrücken,^{68,69} oder zum anderen durch die Bildung einer Thioether Bindung⁷⁰. Der Nachteil dieser Methoden besteht in der Notwendigkeit der korrekten Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke vor der Einführung der Modifikation. Eine andere variable Methode der Inkorporation von Modifikationen, bietet die Verknüpfung synthetischer Peptide mit rekombinanten Proteinen. Diese Methode wird als *Expressed Protein Ligation* (EPL) bezeichnet und wird im Folgenden detailliert beschrieben werden. Unter Anwendung der EPL konnten bereits eine Vielzahl lipidierter Ras und Rab Proteine generiert werden⁷¹⁻⁷³. Diese Methode lässt sich ebenfalls zur Generierung lipidierter Prion Proteine anwenden und ermöglicht somit eine gezielte Studie des Einflusses der Membranverankerung auf die PrP^C→PrP^{Sc} Konversion.

Die selektive Inkorporation von nahezu beliebigen Modifikationen und PTMS in Peptide bietet dabei die von Merrifield 1963 entwickelte Festphasenpeptidsynthese (SPPS)⁷⁴. Die Darstellung von Proteinen/Peptiden mittels SPPS mit einer Größe von über 60 Aminosäuren ist jedoch stark durch die Akkumulation einander ähnlicher Abbruchsequenzen und der daraus resultierenden Aufreinigungsprobleme limitiert. Die selektive Verknüpfung mehrerer Peptide zur Generierung größerer Proteine unter Verwendung klassischer Kondensationsmethoden war durch die Unlöslichkeit der verwendeten geschützten Peptide nur sehr eingeschränkt möglich. Die Möglichkeit zur Verbindung ungeschützter Peptide durch eine chemoselektive Reaktion in wässriger Umgebung und bei physiologischen pH wurde zu erst von Dawson et al. im Jahr 1994 beschrieben⁷⁵. Die dazu verwendete Reaktion bezeichnet man als native chemische Ligation (NCL). Die Reaktion beruht auf einer initialen Umesterung, gefolgt von

einer S→N Acylgruppenübertragung welche, die zuerst von Wieland et al. beschrieben wurde⁷⁶. Der Reaktionsmechanismus ist in Abb. 4 dargestellt.

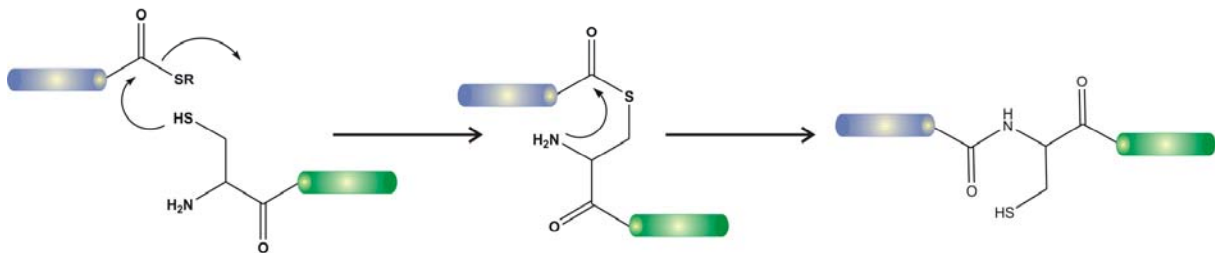


Abb. 4: Reaktionsmechanismus der nativen chemischen Ligation⁷⁵

Dabei erfolgt die Verknüpfung über den nukleophilen Angriff des N-terminalen Cysteins des C-terminalen Peptids auf einen C-terminalen α-Thioester des N-terminalen Fragmentes über eine Umesterungsreaktion. Durch eine anschließende unter den gewählten Bedingungen irreversible S→N Acylgruppenübertragung wird die native Amidbindung gebildet. Die so entstehenden Proteine sind nicht auf die Kombination zweier synthetischer Peptide beschränkt, sondern lassen sich theoretisch mit einer beliebigen Anzahl von Peptiden sequentiell und aber auch konvergent durchführen⁷⁷. Jedoch ist auch hier die Kopplungseffizienz und der Aufreinigungsaufwand bei der Darstellung großer Proteine der limitierende Faktor, so dass bis jetzt lediglich die vollsynthetische Generierung mittlerer Proteine mit einer Größe von ca. 180 Aminosäuren gelungen ist^{78,79}.

Eine Möglichkeit die Größenlimitierung der synthetischen Darstellungsmethoden zu überwinden liefert die Kombination mit rekombinanten Proteinen unter Verwendung von Inteinen. Dabei handelt es sich um Proteinsegmente, welche sich in einer Reihe von intramolekularen Umlagerungs- und Zyklisierungsreaktionen aus einem Vorläuferprotein selbst entfernen und dabei die beiden flankierenden Proteinesegmente (Exteine) durch eine native Amidbindung miteinander verknüpfen⁸⁰. In Analogie zum RNA-Spleißen wird dieser Prozess auch als Protein-Spleißen bezeichnet. Die bereits identifizierten Inteine treten in allen Domänen des Lebens (Eubakterien, Achae und Eukaryoten) auf. Die Existenz einer „Homing Endonuklease“-Aktivität in den meisten Inteinen lässt einen viralen Ursprung dieser Proteine vermuten, die genaue Funktion ist bis jetzt jedoch noch nicht geklärt. Der Mechanismus, welcher zur Verknüpfung der beiden flankierenden Exteine führt ist in Abb. 5 dargestellt.

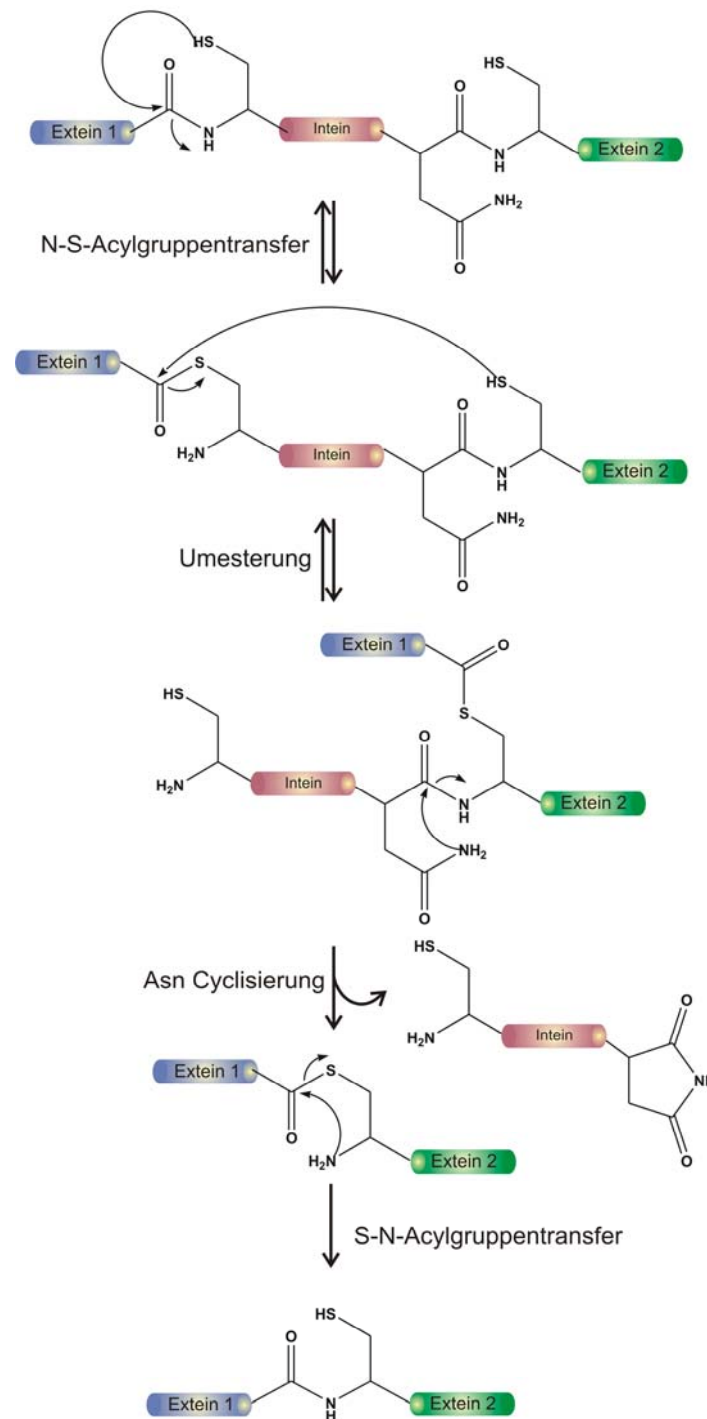


Abb. 5: Mechanismus des Proteins-Spleißens⁸⁰

Als initialer Schritt dieser Reaktion erfolgt ein Acylgruppentransfer des N-terminalen Cysteins des Inteins, auf Grund der Konformation des Inteins wird die folgende Umesterung mit dem N-terminalen Cystein des C-terminalen Exteins thermodynamisch begünstigt. Aus dem resultierenden verzweigten Intermediat folgt als irreversibler Schritt die Entfernung des Inteins über eine Zyklisierungsreaktion des Asparagins. Durch einen abschließenden S→N Acylgruppentransfer wird eine native Amidbindung zwischen den beiden Exteinen

ausgebildet. Diesen Prozess kann man sich zur Generierung von C_α-Thioestern rekombinanter Proteine zu Nutze machen. Die dazu verwendeten „defekten“ Inteine weisen Mutationen auf, welche keine weitere Reaktion auf der Stufe des ersten Cysteinthioesters zulassen. Dieses Intermediat kann durch Zugabe von Thiolen abgefangen werden und im Folgenden unter Verwendung der nativen chemischen Ligation mit synthetischen Peptiden umgesetzt werden. Diese Methode der semisynthetischen Darstellung wird als *Expressed Protein Ligation* (EPL) bezeichnet und ist in Abb. 6 B gezeigt⁸¹. Auf diesem Weg lassen sich eine beliebige Anzahl von C-terminalen Modifikationen, wie z.B. Lipidierung, Phosphorylierung oder Reporter-molekülen, einführen. Ferner ist auch die Inkorporation N-terminaler Modifikationen auf semisynthetischem Weg möglich, dies ist zum einen ebenfalls unter Verwendung der Inteinchemie zu erreichen. Eine Möglichkeit der Generierung eines N-Terminales Cysteins bei rekombinanten Proteinen ist in Abb. 6 A aufgeführt. Dies kann durch die Einführung einer Proteaseschnittstelle zwischen einem Aufreinigungstag und dem Protein gewährleistet werden.

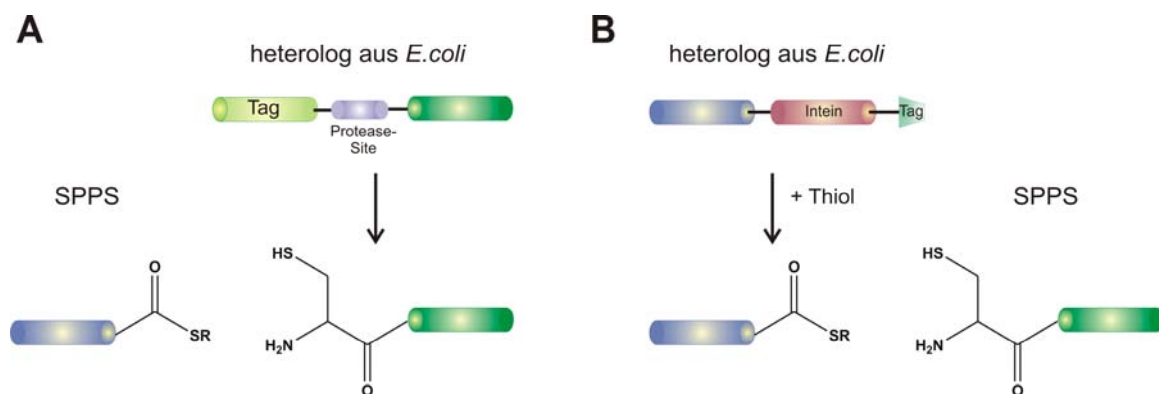


Abb. 6: Darstellungsschema von N- (A) und C-terminal (B) modifizierten semisynthetischen Proteinen

Durch die anschließende Reaktion mit einem synthetisch dargestellten Thioester wird das semisynthetische Protein gebildet. Durch die Kombination dieser Strategien ist eine Modifikation der Proteine an jeder Position des Proteins theoretisch möglich.

Unter Anwendung dieser Methoden ist also nicht nur die C-terminale Lipidierung z.B. des Prion Proteins, sondern auch die Inkorporation N-terminaler Reporter-moleküle zur Analyse der an der Konversion des Proteins beteiligten Strukturelemente möglich⁸².

Obwohl die beschriebenen semisynthetischen Methoden die effiziente und selektive Darstellung modifizierter Proteine beliebiger Größe ermöglichen, sind nach erfolgter

Semisynthese zusätzliche Renaturierungsschritte zur Generierung der Proteinaktivität notwendig.

Abhilfe liefert die Tatsache, dass sich einige Inteine in zwei oder mehr Segmente teilen lassen, welche individuell gesehen keinerlei Aktivität aufweisen, aber nach Assoziation der Fragmente ein funktionelles Protein-Spleiß Element ausbilden (Abb. 7). Diese Inteine bezeichnet man als Split-Inteine und den dazu gehörigen Prozess als Protein *trans*-Spleißen. Neben den künstlich generierten Split-Inteinen wurden ebenfalls bereits natürlich vorkommende, wie das DnaE Intein aus *Synechocystis Ssp* charakterisiert⁸³. Dieses Split-Intein zeichnet sich dadurch aus, dass die Fragmente funktionell in *E.coli* dargestellt werden können und keine weiteren De- und Renaturierungsschritte erfordern.

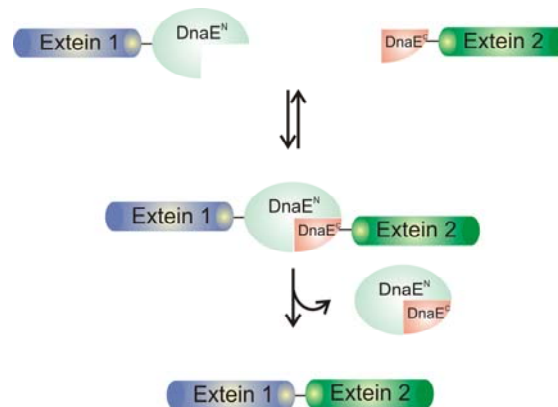


Abb. 7: Schematische Darstellung des Protein *trans*-Spleißens⁸⁴

Dabei ist häufig eines der Inteinsegmente durch dessen geringe Größe gut mittels Festphasenpeptidsynthese zugänglich. Als Beispiel sind hier das C-terminale Fragment des DnaE Split-Inteins mit einer Größe von 36 AS und das N-terminale Fragment des DnaB Split-Inteins mit einer Größe von gerade 11 AS zunennen^{83,85}.

Der Prozess des Protein *trans*-Spleißens toleriert ein weites Spektrum an Pufferbedingungen und ermöglicht auf Grund der hohen Stabilität der Inteinstruktur sogar die Verwendung von geringen Mengen chaotroper Agenzien, wie Harnstoff. Von entscheidendem Vorteil ist jedoch, dass eine semisynthetische Darstellung auch unter physiologischen Bedingungen ohne den Zusatz von hohen Thiolkonzentrationen *in vivo* möglich ist.

Diese Split-Inteine bieten zusätzlich den Vorteil der Semisynthese *in vivo*, dieses konnte bereits von Giriat et al gezeigt werden⁸⁶. Dabei ist es möglich innerhalb einer Zelle Proteine in Fusion mit einer Domäne des Split-Inteins zu exprimieren. Nach Mikroinjektion des synthetischen Segments, erfolgt die Modifikation der Proteine *in vivo*. So ist es möglich z.B. ein Signalpeptid oder eine Membranverankerung erst zu einem bestimmten Zeitpunkt in

Proteine einzuführen und anschließend dessen Auswirkungen auf die Prozessierung der Proteine zu beobachten⁸⁷.

Ziele der Arbeit:

Unter Anwendung semisynthetischer Strategien ist die Darstellung und biophysikalische sowie zellbiologische Charakterisierung verschiedener C-terminal lipidierter Varianten des murinen Prion Proteins ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Dabei steht neben der Verwendung der Expressed Protein Ligation auch die Etablierung der Semisynthese mittels Protein *trans*-Spleißen im Vordergrund. Die daraus erhaltenen lipidierten Prion Proteine sollen bezüglich der Stabilität ihrer Membranintegration, Struktur und Aggregationsverhalten im Vergleich zu nicht modifizierten rekombinanten Prion Proteinen untersucht werden.

Zur detaillierteren Analyse der Konversionsreaktion des Prion Proteins *in vitro* soll ebenfalls ein semisynthetischer Zugang zur Inkorporation N-terminaler Reportermoleküle in das Protein etabliert werden. Mit dem daraus resultierenden N-terminalen modifizierten Protein sollen im Folgenden Umfaltungsstudien mittels Fluoreszenzspektroskopie durchgeführt werden.

Die bereits im Vorfeld verwendeten rekombinanten Prion Proteine sollen im Folgenden auch der Charakterisierung potentieller Inhibitoren der Fibrillogenese dienen. Dazu sollen Substanzen aus dem Extrakt des grünen Tees bezüglich ihrer inhibitorischen Wirkung bei der Fibrillogenese der murinen Prion Proteins untersucht werden. Dabei ist die Bestimmung der Interaktion dieser Substanzen mit der zellulären Form des rekombinanten Prion Protein, sowie deren Einfluss auf dessen Struktur ein Ziel der Untersuchungen. Ferner soll der Einfluss der potentiellen Inhibitoren auf die Formation von Proteinase K resistenten Partikeln nach Induktion der Fibrillogenese *in vitro* bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.a. Qualität und stammten von den Firmen Aldrich (Heidenheim), Baker (Groß-Gerau), Bio-Rad (München), Fluka (Neu-Ulm), Gibco-BRL (Neu Isenburg), Merck (Darmstadt), Riedel de Häen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Steinheim).

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Pharmacia (Freiburg) und New England Biolabs (Frankfurt) bezogen.

Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte mit dem Pfu-DNA Polymerase-System von Promega (Mannheim).

Ligationen wurden mit der T4-DNA-Ligase von Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt.

Der 1kB DNA-Marker stammte von Invitrogen (Karlsruhe).

Die für die Zellanzucht verwendeten Antibiotika waren von Sigma (Steinheim), Nährmedien (Caseinhydrolysat und Hefe-Extrakt) von Gibco BRL (Neu Isenburg).

Der verwendete LMW-Proteinmarker enthielt α -Lactalbumin (14.4 kDa), Trypsininhibitor (20.1 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Albumin (66 kDa) und Phosphorylase b (97 kDa) und wurde von Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire) bezogen.

Das polymere Trägermaterial für die Festphasensynthese der Peptide wurde von AnaSpec (SanJose) und Novabiochem (Schwalbach) bezogen.

2.1.2 Instrumentation

Die Anzucht von *E.coli* erfolgte in temperierbaren Schüttlern der Firma New Brunswick (Nürtingen) unter aeroben Bedingungen.

Die Elektrotransformation kompetenter *E.coli* Zellen wurden mittels eines GenePulsers der Firma Biorad (München) in Elektroporationküvetten der Firma Biozym (Hessisch Oldendorf) durchgeführt.

Sedimentationen erfolgte in den Zentrifugen RC28S und RC5B der Firma Sorvall (Bad Homburg) in den Rotoren SS-34, F28/36 sowie GS3.

Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall oder einem Mikrofluidizer M-110S der Firma Microfluidics Corp. (Newton). Die Polymerase-Kettenreaktion wurden in den Thermocyclern PCR-Express und PCR-Sprint der Firma Hybaid (Heidelberg) durchgeführt.

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem Sequenziergerät 3100 von Applied Biosystems oder von der Firma AGOWA (Berlin) durchgeführt.

Ni-NTA Superflow Säulenmaterial wurde von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen.

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen erfolgten mit dem Mini-PROTEAN III-System der Firma Biorad.

Zur Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) wurden Anlagen der Firmen Beckmann (System Gold) und Waters verwendet. Die verwendeten Säulen wurden von der Firma Macherey-Nagel (Düren) und Vydac bezogen.

Zur Messung von Massenspektren wurde ein Voyager-DE Pro MALDI-Massenspektrometer von Perseptive Biosystems (Weiterstadt) sowie das ESI-MS LCQ Advantage MAX (Finnigan) verwendet.

2.1.3 Lösungen und Puffer

2.1.3.1 Lösungen und Puffer für molekularbiologisches Arbeiten

DNA-Probenpuffer 3 x	10 % (w/v) Ficoll 400 0,025 % (w/v) Bromphenolblau 0,025 % (w/v) Xylencyanol in TBE-Puffer
Lösung 1	1 M Tris, pH 8,0 0,2 M EDTA 20 % Glucose in Wasser
Lösung 2	1 M NaOH 10 % SDS in Wasser
Lösung 3	27 ml 5 M KOAc 5,2 ml Eisessig 12,8 ml Wasser, pH 5,5
Ligasepuffer	Fa. Invitrogen (Karlsruhe)
PCR-Puffer	Fa. Stratagene
Restriktionspuffer	Incubation Buffers for Restriction Enzymes, Buffer A, B, L, M, H der Fa. Boehringer- Mannheim
DNA-Ligationspuffer 4 x	220 mM HEPES-Na ⁺ pH 7,5 8 µg/ml BSA 1 mM ATP 60 mM MgCl ₂ in DEPC-Wasser

2.1.3.2 Lösungen und Puffer für proteinchemisches Arbeiten

Laufpuffer	25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 1 % w/v SDS
Coomassie-Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie R250 10 % (v/v) Essigsäure 5 % (v/v) Methanol in Wasser
Entfärberlösung	10 % (v/v) Essigsäure 5 % (v/v) Methanol in Wasser
SDS-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, 0,4 % SDS w/v, pH 6.8
SDS-Trenngelpuffer	1,5 M Tris, 0,4 % SDS w/v, pH 8.8
SDS-Probenpuffer 2 x	500 mM Tris pH 6.8 6 % (w/v) SDS 35 % (v/v) Glycerin 3,55 % (v/v) Monothioglycerol 0,05 % (w/v) Bromphenolblau in Wasser

2.1.4 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

Bakterienstämme:

XL1-Blue (Stratagene)

BL21(DE3) (Stratagene)

BL21(DE3)RIL (Stratagene)

Plasmide:

pTXB1 NEB (Beverly)

pTXB3 NEB (Beverly)

Oligonukleotide:

Alle folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech (Göttingen) bezogen

T7 Promotor	5'-TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG GAA-3'
RPS 09	5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG-3'
PrPS134C_for	5'-AGC GCC ATG TGT AGG CCC-3'
PrPS134C-rev	5'-GGG CCT ACA CAT GGC GCT-3'
PrPV160Chin	5'-CTA ACC AAT GCT ACT ACA-3'
PrPV160Cr	5'-TGT AGT AGC ATT GGT TAG-3'
Sap-PrP(134)_hin	5'-CCT GTG CTC TTC GTG CAG G-3'
GFP-Nco-hin	5'-CTA GCT AGC CAT GGG GGT GAG CAA GGG CGA GG-3'
GFP-Sap-rev	5'-GCC AAA ACT GAG CTC TTC GGC AAT AAT CCG-3'

2.1.4 Medien zur Bakterienzucht

2YT-Amp-Medium	2YT-Medium 100 µg/ml Ampicilin
2YT-Amp-Platten	16 g/l Peptonhydrolysat 10 g/l Hefehydrolysat 5 g/l NaCl 16 g/l Select Agar 100 mg/l Ampicilin
2YT-Medium	16 g/l Tryptonhydrolysat 10 g/l Hefehydrolysat 5 g/l NaCl, pH 7,2
Minimalmedium	7,5 g/l Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 3,0 g/l KH ₂ PO ₄ 0,5 g/l NaCl 0,25 g/l MgSO ₄ *7H ₂ O 0,014 g/l CaCl ₂ *2H ₂ O, pH 7,1 1 g/l NH ₄ Cl 2 g/l D-Glucose 10 ml/l Spurenelementelösung

Spurenelementelösung	<p>100 mg/l ZnSO₄*7H₂O</p> <p>30 mg/l MnCl₂</p> <p>300 mg/l H₃BO₃</p> <p>200 mg/l CoCl₂*6H₂O</p> <p>10 mg/l CuCl₂*2H₂O</p> <p>20 mg/l NiCl₂*6H₂O</p> <p>30 mg/l Na₂MoO₄*2H₂O</p> <p>50 mg/l EDTA</p> <p>20 mg/l Fe(II)SO₄*7H₂O, pH 7,1</p>
Ampicilin-Stammlösung	100 mg/ml Ampicilin in Wasser
2TY-Amp-Cam-Medium	<p>2TY-Medium</p> <p>100 µg/ml Ampicilin</p> <p>30 µg/ml Chloramphenicol</p>
2TY-Amp-Cam-Platten	<p>16 g/l Tryptonhydrolysat</p> <p>10 g/l Hefehydrolysat</p> <p>5 g/l NaCl</p> <p>15 g/l Select Agar</p> <p>100 mg/l Ampicilin</p> <p>30 µg/ml Chloramphenicol</p>
Chloramphenicol-Stammlösung	30 mg/ml Chloramphenicol in Ethanol

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Zellanzucht

Die Anzucht von *Escherichia coli* XL1 (blue) erfolgte unter aeroben Bedingungen in autoklavierten LB- oder 2TY-Medium (mit dem entsprechenden Antibiotikum) im Schüttler (200 rpm, 37°C).

2.2.2 UV-photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde durch Messung der optischen Dichte bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm bestimmt. Der Nullabgleich wurde mit dem reinen Lösungsmittel durchgeführt. Dabei gilt für die Konzentration einer Lösung in einer Küvette der Schichtdicke 1 cm:

dsDNA: 1 OD₂₆₀ entspricht 50 µg/ml

Der Reinheitsgrad von DNA kann aus dem Verhältnis der beiden Absorptionen bei 260 nm und 280 nm abgeschätzt werden. Bei reiner DNA beträgt der Koeffizient aus OD₂₆₀/ OD₂₈₀ ~ 1,8.

2.2.3 Agarosegelelektrophorese zur DNA-Auftrennung

Die Kontrolle von DNA-Fragmenten erfolgte mittels elektrophoretischer Trennung in Agarosegelen (0,8 % (w/v) Agarose in 60 ng EtBr/ml 1 x TBE-Puffer) bei konstanter Spannung 100 – 120 V. Als Kammerpuffer diente 1 x TBE-Puffer mit 60 ng/ml EtBr.

Probenvorbereitung: 50 – 100 ng DNA + 5 µl 3 x Probenpuffer, ad 15 µl Wasser. Die Identifizierung der DNA-Banden erfolgte mit UV-Strahlung der Wellenlänge 302 nm.

2.2.4 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde die DNA-Bande unter UV-Strahlung mit einer Wellenlänge von 366 nm identifiziert, mit einem Skalpell ausgeschnitten

und in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Die Isolierung erfolgte mittels Qiagen Spin Column Gel Extraction Kit. Die Lagerung der extrahierten DNA erfolgt bei -20°C .

2.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Eine dicht gewachsene o/n-Bakterienkultur (1,5 ml) wurde zur Isolierung von Plasmid-DNA in einem Eppendorfreaktionsgefäß sedimentiert (1 min, 14000 rpm, RT). Das Bakterienpellet wurde in 100 μl Lösung 1 resuspendiert und nach leichtem Schwenken 5 min bei RT inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zugabe von 200 μl Lösung 2 lysiert. Zur Neutralisation der Suspension wurden 150 μl der Lösung 3 zugegeben, leicht geschüttelt, und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 14000 rpm, RT) wurde der die DNA enthaltende Überstand abgenommen und zur Entfernung von Proteinverunreinigungen mit 1 VÄ Roti-Phenol versetzt, gemischt, mit 1 VÄ Chloroform verdünnt, gemischt und zur besseren Phasentrennung zentrifugiert (2 min, 14000 rpm, RT). Die wässrige Phase wurde abgenommen und zur vollständigen Entfernung des Phenols nochmals mit 1 VÄ Chloroform extrahiert. Die DNA wurde mit 2,5 VÄ Ethanol gefällt (5 min, RT). Nach Zentrifugation (5 min, 14000 rpm, RT) wurde das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet.

2.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Eine dicht gewachsene o/n-Bakterienkultur (100 ml) wurde in 50 ml Falkontubes sedimentiert (SS34-Rotor, 20 min, 4000 rpm, 4°C). Die weitere Aufarbeitung wurde mit einem Midi/Maxi Plasmid/Cosmid Purification Kit der Fa. Qiagen durchgeführt. Die in EB-Puffer aufgenommene DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.7 Amplifikation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Mullis und Faloona, 1987) amplifiziert. In 50 μl Ansätzen werden 10 ng DNA-Matrize, 30 pmol Primer, 5 nmol jedes dNTP's und 0,5 U Pfu-Polymerase (Promega, Madison, USA) verwendet. Die Amplifikation der DNA im Thermocycler erfolgte durch „Hot-start“ PCR in zwei Schritten,

wobei fünf Zyklen mit 15 s bei 96°C, 30 s bei $T_m-5^\circ\text{C}$ und 45 s bei 72°C durchgeführt wurden und anschließend fünfzehn Zyklen mit 15 s bei 96°C, 30 s bei T_m , 45 s bei 72 °C.

2.2.8 Restriktion von DNA

Um zu einer Abschätzung bezüglich der benötigten Einheiten (Units) an Restriktionsenzym pro μg DNA zu gelangen, wurde folgende Formel verwendet:

$$\frac{U}{\mu\text{g} \cdot \text{h}} = \frac{\text{bp(Standard)}}{\text{bp(Plasmid)}} \cdot \frac{\text{Restriktionsstellen(Plasmid)}}{\text{Restriktionsstellen(Standard)}}$$

Mit: bp (Standard) = Aus Tabellenwerk zu entnehmen (z.B. λ -DNA = 48502 bp)

bp (Plasmid) = variabel

Restriktionsstellen (Plasmid) = variabel

Restriktionsstellen (Standard) = Aus Tabellenwerk zu entnehmen

Um die vollständige Restriktion der DNA sicherzustellen, wurde die oben genannte Enzymmenge generell verdoppelt. Restriktionspuffer sowie Dauer und Temperatur hängen jeweils von der verwendeten Endonuclease ab. Zur Inaktivierung der Restriktionenzyme wurden die Ansätze 10 min bei 65°C inkubiert.

2.2.9 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA wurde mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Ein Ligationsansatz enthält:

	Menge/ Volumen
Geschnittener Plasmidvektor	ca. 100 ng
Fragment	zweifacher molarer Überschuss gegenüber Plasmidvektor
T4-DNA-Ligase	1 μl
5 x Ligasepuffer	4 μl
	ad 20 μl Wasser

Als Negativkontrollen wurden durchgeführt:

- Ansatz ohne T4-DNA Ligase um evtl. Verunreinigungen des geschnittenen Vektors mit ungeschnittenem super-coiled Plasmid zu erkennen
- Ansatz ohne Fragment um den Hintergrund, welcher durch Religation von linearisierten Plasmid entsteht, zu detektieren.

2.2.10 Elektrotransformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

Ein Aliquot (~ 80 µl) tiefgefrorener, elektrokompetenter Zellen wurde kurz aufgetaut und in 15 µl des auf 0°C vorgekühlten Ligationsansatzes (Plasmidkonzentration etwa 25 ng/15µl) überführt. Nach Mischen wurde die DNA/Bakteriensuspension ohne Luftblasen zu erzeugen in eine kalte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) pipettiert und mit 1,5 kV bei einem Widerstand von 800 Ω und einer Kapazität von 25 µF elektrotransformiert. Anschliessend wurde die Suspension sofort in 1 ml 2TY-Medium aufgenommen und in ein Reagenzglas überführt. Es wurde 1 h bei 37°C geschüttelt und jeweils 10 %, 1 % und 0,1 % der Bakteriensuspension auf 2TY-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden auf dem Deckel liegend im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.11 Sequenzierung von DNA

Die automatische Sequenzierung von DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger et. al. (1977) ⁸⁸ mit Didesoxynukleotiden durchgeführt. Die DNA wird anhand fluoreszierender Didesoxynucleotidanaloga durchgeführt. Die für einen 20 µl Sequenzierungs-PCR-Ansatz benötigten Komponenten sind in nachstehendem Pipettierschema zusammengefasst:

Menge/Volumen

2 µl (500 ng)	DNA-Templat
1 µl	10 pmol/µl Sequenzierungsprimer
2 µl	5 x Sequenzierungspuffer
4 µl	Sequenzierungsmix
ad 20 µl H ₂ O	

Ein typischer Sequenzierungs-PCR-Zyklus lautet:

Denaturierung: 10 sec, 96°C

Hybridisierung: 5 sec, bei einer Temperatur etwa 7°C unterhalb der T_m des Sequenzierungsprimers (50°C)

Polymerisation: 4 min, 60°C

Der Zyklus wurde 25 x wiederholt.

Zur Reinigung des PCR-Ansatzes wurde der Ansatz mit 10 µl einer Lösung folgender

Zusammensetzung:

300 µl	3M NaOAc
50 µl	100 mM EDTA
650 µl	H ₂ O

Sowie mit 70 µl EtOH (abs.) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, RT, 14000 rpm) wurde mit 400 µl 70 % EtOH gewaschen und abermals zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet an der Luft getrocknet.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Proteinexpression in *E.coli* und Proteinreinigung

Die Expressionskultur wurde mit einer über Nacht gewachsenen Vorkultur ($OD_{578} \sim 5$) auf eine $OD_{578} \sim 0,06$ angeimpft und bis zur mittleren logarithmischen Phase ($OD_{578} \sim 0,6$) wachsen gelassen. Die Expression des Proteins wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG über einen Zeitraum von 4 Stunden induziert. Die Temperatur nach der Induktion lag bei 37°C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation isoliert und das Zellpellet wird in 10 ml Aufschlusspuffer (500 mM NaCl, 100 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 1 mM TCEP, bei pH 7,5) resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte im Mikrofluidizer.

Proteinreinigung unter denaturierenden Bedingungen:

Die Trennung der löslichen cytoplasmatischen Bestandteile von den aggregierten (Inclusion Bodies) erfolgte durch Zentrifugation (20 min, 34000 x g, SS-34, 4°C). Das erhaltene Pellet wurde mit dem Aufschlusspuffer und 0,5 % TritonX-100 (v/v) gewaschen und anschließend zentrifugiert (15 min; 46000 x g; 4°C). Zur Entfernung des Detergenz wurde das Pellet mit Aufschlusspuffer gewaschen und zentrifugiert (15 min; 46000 x g; 4°C). Die Solubilisierung der Inclusion Bodies erfolgte durch Rühren o/n in 8 M GdnHCl, 50 mM Tris bei pH 8. Die übrigen Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation von den im Puffer gelösten Proteinen getrennt (30 min, 40000 x g, 4°C). Die Aufreinigung der Proteine erfolgte mittels Ni-NTA Superflow. Das Säulenmaterial wurde mit 8 M GdnHCl, 50 mM Tris, 5 mM Imidazol bei pH 8 äquilibriert. Nach Auftragen des Solubilisats (Flussrate ~ 1 ml/min) wurde mit 10 Säulenvolumen 8 M GdnHCl, 50 mM Tris, 20 mM Imidazol bei pH 8 gewaschen und anschließend mit 8 M GdnHCl, 50 mM Tris, 200 mM Imidazol bei pH 8 eluiert. Zur Entfernung des Imidazols wurde das Eluat gegen 6 M GdnHCl, 50 mM Tris bei pH 8 (Verdünnung 1:100) dialysiert.

Proteinreinigung unter nativen Bedingungen:

Die Isolation der löslichen cytoplasmatischen Bestandteile erfolgte mittels Zentrifugation (20 min, 34 000 x g, SS-34, 4°C). Dem geklärten Überstand wurden 5 mM Imidazol zugefügt.

Die Aufreinigung erfolgte mittels IMAC (HiTrap™ Chelating HP, GE Healthcare) bei 4°C. Der Probenauftrag wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/min durchgeführt. Die Elution der Proteine erfolgte durch einen Stufengradienten, bei dem das beladene Säulenmaterial zunächst mit 10 SV des Aufschlusspuffers mit 30 mM Imidazol gewaschen wurde. Durch Erhöhung der Imidazolkonzentration auf 200 mM wurden die Proteine eluiert und anschließend gegen den Lagerpuffer dialysiert (500 mM NaCl, 100 mM Tris, 0,5 mM EDTA, 1 mM TCEP, bei pH 7,5).

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte unter nativen Bedingungen nach der von Bradford ⁸⁹ beschriebenen Methode. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffs Coomassie Blue G-250 verschiebt sich bei Bindung an ein Protein mit positiven Seitenketten von 465 nm nach 595 nm. In Abhängigkeit von der Proteinmenge wurden unterschiedliche Verdünnungen mit einem Endvolumen von 100 µl hergestellt und auf 1 ml mit dem Bradfordreagenz aufgefüllt. Die Messung der Absorption erfolgt nach 10 min. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt an Hand einer Eichgeraden mit dem Standard BSA.

2.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Proteinauftrennung

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte nach einer Methode von Lämmler (1987). Die Proteine wurden mittels elektrophoretischer Trennung in SDS-Polyacrylamidgelen bei einer Stromstärke von 50 mA etwa 30 min aufgetrennt. Der Ansatz für ein Gel ist in folgender Tabelle angegeben:

	Trenngel 18 %	Sammelgel 4 %
Acrylamid/Bisacrylamid (30 : 0,78)	4,5 ml	450 µl
SDS-Sammelgelpuffer	-	350 µl
SDS-Trenngelpuffer	1,95 ml	-
Wasser	0,55 ml	1,8 ml
APS 10 % (w/v)	78 µl	26,5 µl
10 % SDS	78 µl	26,5 µl
TEMED	2,4 µl	2,6 µl

Nach Zugabe von TEMED wurde der Ansatz kurz gemischt und das Gel sofort gegossen. Das Trenngel wurde ca. 1 cm unter dem Probenaschenkamm gegossen und mit Ethanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation wurde das Ethanol entfernt und das Sammelgel darüber gegossen. Probenvorbereitung: max. 1 mg Protein + 10 µl 2 x SDS-Probenpuffer auf insgesamt 20 µl auffüllen. Alternativ kann auch 15 min im Ultraschallbad inkubiert werden. Zur Abtrennung von störenden Salzen wurden die Proteine bei 0°C mit 10 % TCA gefällt. Das abzentrifugierte Präzipitat wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach der Gelelektrophorese bei konstanter Spannung wurden die Gele mit dem Farbstoff Coomassie gefärbt. Der nicht an die aufgetragenen Proteine gebundene Farbstoff wurde mit Entfärbelösung (20 % Essigsäure, 10 % Methanol, 70 % H₂O) entfernt.

2.3.4 Westernblot und Immunonachweis

Der Westernblot wurde anhand der Methode von Towbin et al. (1979) durchgeführt. Dabei wurden die Proteine auf Nitrocellulose (Schleicher & Schuell, Dassel/Germany) transferiert. Die freien Bindungsstellen der Membran wurden über Nacht mit 5 % Trockenmilchpulver in TBS Puffer blockiert. Anschließend wurde die Membran mit den entsprechenden Antikörpern nach Angaben des Herstellers inkubiert (1. Antikörper Kaninchen-Anti-SHaPrP-IgG (MPI für Biochemie, Martinsried)), 2. Antikörper Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-POD (Sigma) bzw. 1. Antikörper Kaninchen-Anti-GFP-IgG (Sigma), 2. Antikörper Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-POD (Sigma)). Die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz Western-Blotting-Kit (Boehringer, Mannheim, Germany) auf Röntgenfilm mit einer Belichtungszeit von 10 sec bis 60 min.

2.3.5 *Trans*-Spleißen des Fusionsproteins PrP(90-232)-DnaE^N-His

Zum Protein *trans*-Spleißen von rPrP(90-232)-DnaE^N-His mit den synthetischen palmitoylierten DnaE^C Varianten wurden beide Komponenten in Konzentrationen von 5 µM in 50 mM TrisHCl bei pH 8 in der Gegenwart von 50 mM MesNa und unter Zusatz von OG oder DOPC Liposomen verwendet. Die Reaktionen wurden entweder durch Zugabe von SDS

Probenpuffer für die SDS-PAGE Analytik oder durch Dialyse gegen 6 M GdnHCl, 50 mM TrisHCl bei pH 8 zu Aufreinigungszwecken abgestoppt. Die Reaktionsansätze wurden unter Verwendung von Ni-NTA Fast Flow Sepharose (Qiagen) zur Entfernung des nicht umgesetzten rPrP-DnaE^N und DnaE^N gereinigt. Anschließend Gelfiltration (Superdex 75, Pharmacia) ermöglichte die Isolation von rPrP^{Palm}.

2.3.6 Faltung der lipidierten Prion Protein Varianten rPrP^{Palm}

Die rPrP^{Palm} wurden mit 6 M GdnHCl, 50 mM TrisHCl bei pH 7,5 mit einem Redoxsystem bestehend aus 5 mM GSH und 0,5 mM GSSG für 1 h inkubiert. Die Entfernung der Chaotrope und des Redoxsystems wurde mittels Gelfiltration in 20 mM NaOAc bei pH 5,5 mit 20 mM OG erzielt.

2.3.7 Präparation von SUVs-Liposomen

Zur Darstellung von kleinen unilamellaren Vesikeln (SUVs) wurden 20 mg/ml DOPC in ~ 1 ml CHCl₃ in einem 25 ml Rundkolben vorgelegt. Die Entfernung des Lösungsmittels erfolgte unter Rotation im leichten Heliumstrom. Der zurückgebliebene Lipidfilm wurde 1 h im Hochvakuum getrocknet und anschließend für 1-2 h im entsprechenden Puffer hydratisiert. Die entstandene trübe Suspension multilamellarer Vesikel wurde so lange im Ultraschallbad inkubiert bis eine opaleszente Liposomenlösung entstand. Die entstandenen SUVs wurden von größeren Lipidaggregaten durch Zentrifugation (43000 rpm, Beckman Ti 100.4) bei 4 °C für 30 min abgetrennt.

2.3.8 Darstellung lipidierter SiO_x-Nanopartikel

Zur Lipidierung von SiO_x-Nanopartikeln (Evident Technologies, durchschnittlicher Partikel Querschnitt : 800 nm) wurden ein entsprechendes Volumen der Partikel aus der Stammlösung entnommen und für 3 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Partikel wurden in 1 ml Methanol resuspendiert und 5 min im Ultraschallbad inkubiert und wie oben beschrieben zentrifugiert. Nachdem die Partikel in 1 ml KOH resuspendiert wurden, erfolgte ein ausgiebiger Waschschrift (min 5 x) mit den entsprechenden Puffern. Zur Lipidierung wurden diese mit einem 16 x Überschuss an DOPC SUVs (Darstellung siehe 2.3.7) für min. 2 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken inkubiert.

2.3.9 *In vitro* Aggregation von rPrP und rPrP^{Palm}

Zur Darstellung der Prion Fibrillen wurden die gefalteten rPrP Varianten gegen einen Puffer aus 3 M Harnstoff, 1 M GdnHCl, 150 mM NaCl, 20 mM NaPi bei pH 6,8 dialysiert⁹⁰. Die Proben wurden bei Raumtemperatur 1 bis 4 Tage inkubiert. Der Fortschritt der Aggregation wurde entweder mittels Verdau mit Proteinase K oder durch die Thioflavin T Fluoreszenz beobachtet.

Proteolytischer Verdau mit Proteinase K

Zum proteolytischen Abbau der rPrP Varianten wurde Proteinase K (Sigma) in einem Substrat zu Enzym Verhältnis von 50 : 1 eingesetzt. Der Verdau wurde 1 h bei 37°C in 100 mM TrisHCl bei pH 7,5 durchgeführt und mit 2 mM PMSF vor der SDS-PAGE Analytik gestoppt.

ThT Fluoreszenz Assay

Während der Fibrillogenese von rPrP und rPrP^{Palm} wurden den Ansätzen Aliquots entnommen und auf eine Endkonzentration von 0,3 µM rPrP bzw. rPrP^{Palm} in 5 mM NaOAc (pH 5,5) verdünnt. Zu den Ansätzen wurden 10 µM ThT gegeben und die Emissionsspektren (von 460 bis 520 nm) mit einer Anregungswellenlänge von 445 nm auf einem LS 55 Spektrometer (PerkinElmer) aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität beim Emissionsmaximum (488 nm) wurden bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen.

2.4 Chemische Methoden

2.4.1 Festphasensynthese von Peptiden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden sowohl manuell als auch automatisiert an einem modifizierten 433 A Peptidsynthesegerät (Applied Biosystems) mittels Festphasensynthese hergestellt. Dabei wurde das *in situ* Neutralisations- und Aktivierungsprotokoll nach Schnölzer et al. (1992)⁹¹ verwendet. Es wurden Überschüsse von Boc und Fmoc geschützten Aminosäuren und Base verwendet, um hocheffiziente Kopplungen zu erreichen. Die funktionellen Seitengruppen der verwendeten Fmoc-Aminosäuren waren wie folgt geschützt: Cys(Trt), Lys(ivDde), Lys(Mtt), Lys(Mmt), Lys(Boc), Asp(OtBu), Gln(Trt), Ser(tBu), Asn(Trt), Glu(OtBu), Tyr(tBu). Die funktionellen Seitenketten der verwendeten Boc-Aminosäuren waren wie folgt geschützt: Arg(Tos), Asn(Xan), Asp(OcHxl), Cys(Acm), Cys(p-MeBzl), Glu(OcHxl), His(DNP), Lys(CLZ), Lys(Fmoc), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Tyr(2-Br-Z). Alle nicht aufgeführten Aminosäuren wurden ungeschützt verwendet. Die Synthesen wurden Maßstab 0,2 oder 0,4 mmol durchgeführt. Als Reaktionsgefäße dienten Glasfritten der Porengröße 2.

Boc-Chemie:

Alle mittels Boc-Chemie hergestellten Peptide wurden an speziellen Harzen, die nach Abspaltung ein Peptid mit C-terminalen Thioester generieren, hergestellt⁹².

Das Polystyrolharz wurde 30 min in DMF gequollen und für einen 0,2 mmol Ansatz wurden 2 mmol der zu koppelnden Aminosäure mit 3,6 ml einer 0,5 M HBTU Lösung in DMF für ca. 2 min aktiviert, dann erfolgte die Zugabe von 1 ml DIEA. Das Harz wurde 15 min mit der aktivierten Aminosäure inkubiert und dann für 1 min mit DMF gewaschen. Durch zweimaliges Behandeln des Harzes mit reiner TFA für jeweils 1 min wurde der N-Terminus entschützt. Das dabei entstehende Trifluoressigsäuresalz der freien Aminofunktion wird durch Zugabe der Base DIEA im folgenden Kopplungsschritt *in situ* neutralisiert. Nach der Kopplung eines Gln folgte sowohl vor als auch nach der Entschütung des N-Terminus ein Waschschriff von 1 min mit DCM. Durch die Wärmeentwicklung der Reaktion des DMFs mit der TFA tritt eine Zyklisierung mit dem Peptidrückrad auf.

Fmoc-Chemie:

Alle mittels Fmoc-Strategie hergestellten Peptide wurden an Fmoc-AS-Wang-Harzen synthetisiert.

Das Polystyrolharz wurde vor Beginn der Synthese 60 min in DMF gequollen. Der N-Terminus der ersten Aminosäure wurde durch Zugabe von 20 % (v/v) Piperidin in DMF für zuerst 3 und dann 7 min mit ca. 10 ml entschützt. Anschließend wurde das Harz zur Entfernung des Piperidins 1 min mit DMF gewaschen. Für einen 0,2 mmol Ansatz wurden 1 mmol der entsprechenden Fmoc geschützten Aminosäure mit 2,38 äq einer 0,5M HBTU Lösung in DMF versetzt und 2 min inkubiert. Anschließend wurden 5 äq DIEA zugegeben und 1 min inkubiert. Die aktivierte Aminosäure wurde für 30 min zum Harz gegeben. Nach jedem Kopplungsschritt wurde das Resin 1 min mit DMF gewaschen. Die Kopplung der Palmitoylreste an die Seitenkettenaminogruppe der Lysine erfolgte nach Abspaltung der ivDde Schutzgruppe durch Inkubation des Harzes mit dreimal 3 % (v/v) Hydrazin in DMF für je 10 min. Anschließend wurde das Harz mit 20 äq Palmitoylchlorid, 20 äq HOBT sowie 22 äq Triethylamin in DMF/DCM 1 : 3 versetzt und 3 h inkubiert. Die Kopplung des NBD-Fluoreszenzmarkers erfolgte ebenfalls an die Seitenkettenamniofunktion eines Lysinrestes. Die Mtt Gruppe wurde durch Waschen des Resin mit ca. 500 ml einer 1 %igen (v/v) TFA-Lösung in DCM Lösung und anschließendem Waschen mit ca. 500 ml einer 1 %igen (v/v) TFA-Lösung, die 2,5 % (v/v) TIS enthielt, in DCM entfernt. Die Kopplung erfolgte durch Zugabe von 15 äq DIEA und anschließender Zugabe von 10 äq NBD-Cl zum Resin. Das Harz wurde 30 min inkubiert.

2.4.2 Abspaltung der Peptide vom Harz

Die N-terminalen Fmoc- bzw. Boc-Schutzgruppen wurden unter den bereits beschriebenen Bedingungen abgespalten. Vor der Abspaltung wurde das Harz mit DCM gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Die durch Fmoc-Chemie synthetisierten Peptide wurden mit 5 % TIS und 2,5 % H₂O in TFA für 3 h bei RT abgespalten. Das Peptid wurde durch Zugabe von eiskaltem Diethylether gefällt und die Lösung 1 h auf Eis gekühlt. Das Rohpeptid wurde abzentrifugiert und dreimal mit kaltem Diethylether gewaschen. Das Pellet wurde in Puffer bestehend aus Wasser/Acetonitril 1 : 1 + 0,1 % (v/v) TFA aufgenommen und lyophilisiert.

Die durch Boc-Chemie synthetisierten Peptide wurden durch Behandlung 10 ml HF mit 5 % *p*-Kresol (ausreichend für 1 g Resin) für 1 h bei 0°C abgespalten. Die Abspaltung wird in einer abgeschlossenen Teflon-Apparatur vorgenommen, um einen Kontakt mit der hochtoxischen HF auszuschließen. Dabei wird *p*-Kresol als Abfangreagenz für entstehende reaktive Kationen zugegeben. Das HF wurde im Vakuum entfernt und das Rohpeptid in kaltem Diethylether resuspendiert. Das Peptid wurde abfiltriert und mit Diethylether gewaschen. Anschließend wurde es in Wasser/Acetonitril 1 : 1 + 0,1 % (v/v) TFA aufgenommen und lyophilisiert.

2.4.3 Aufreinigung der Peptide

Die Aufreinigung der Rohpeptide erfolgte im analytischen Maßstab entweder durch RP-HPLC mit C4-Säulen (125 x 4 mm) und im präparativen Maßstab entweder durch RP-HPLC mit C4-Säulen (250 x 10 mm bzw. 250 x 22 mm) bei Flussraten von 1-10 ml/min. Zur Aufreinigung wurden die Peptide in 50 % (v/v) Puffer A (Wasser + 0,1 % (v/v) TFA) und 50 % (v/v) Puffer B (Acetonitril + 0,08 % (v/v) TFA) bzw. in 6 M GdnHCl, 50 mM TrisHCl bei pH 8 aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Die Elution der hergestellten Peptide wurde mittels verschiedenen, dem jeweiligen Produkt angepassten, Gradienten durchgeführt. Die reinen Fraktionen wurden zusätzlich durch ESI-MS charakterisiert, durch einen Gradienten der zuvor angegebenen Laufpuffern A und B gereinigt und lyophilisiert.

2.4.4 Native chemische Ligation der Peptide

Die native chemische Ligation wurde nach zwei unterschiedlichen Protokollen durchgeführt. Zum einen wurde einer 5-6 mM Lösung des Peptids mit C-terminalen Thioester in 6 M GdnHCl, 300 mM NaPi und 1% (v/v) Thiophenol bei pH 7,2 1,1 Äquivalente des Peptids mit N-terminalen Cystein hinzugefügt.

Beim zweiten Protokoll wurden zu einer 2,5-3 mM Lösung des Thioesters in 8 M Harnstoff, 100 mM NaPi, 17 mg/ml DPC und 1% (v/v) Thiophenol bei pH 7,2 1,1 Äquivalente des Peptids mit N-terminalen Cystein hinzugefügt. Die Ansätze wurden 4-24 h unter Argon leicht gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 3 VÄ des Ligationspuffers und 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol für 1 h gestoppt. Die entstandenen Disulfide wurden vor der Aufreinigung durch Zugabe von einigen mg TCEP für 5 min reduziert. Die Aufreinigung der

Ligationsprodukte erfolgte mittels RP-HPLC über C4-Säulen (250 x 10 mm) unter Verwendung der in 2.4.3 angegebenen Puffer bei einer Flussrate von 3 ml/min. Die aufgereinigten Fraktionen wurden vereinigt und anschließend lyophilisiert.

2.4.5 Peptidanalytik

Die synthetisierten Peptide wurden mittels RP-HPLC über C4-Säulen (125 x 4 mm) bei einer Flussrate von 1 ml/min mit unterschiedlichen Gradienten analysiert. Die Kontrolle der Ligationsansätze erfolgte nach Aufarbeitung der entnommenen Proben mit β -Mercaptoethanol (BME) und TCEP wie in 2.4.4 beschrieben.

Die Bestimmung der Massen erfolgte über ESI-MS und MALDI-TOF. Als Matrix für die MALDI Proben diente eine gesättigte α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure-Lösung in 50 % Puffer A und 50 % Puffer B.

2.5 Biophysikalische Methoden

2.5.1 Dynamische Lichtstreuung

Die Bestimmung des hydrodynamischen Radius der dargestellten SUV's (Siehe 2.3.7) erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung an einem DynaPro System (Wyatt Technologie). Alle Messungen wurden in Quarzküvetten mit Schichtdicken von 0,1 cm durchgeführt.

2.5.2 CD-Spektroskopie

Die Aufnahme von CD-Spektren wurde an einem Jasco J-715 Spektropolarimeter durchgeführt. Dabei betragen die Proteinkonzentrationen 0,2 mg/ml in 20 mM NaOAc bei pH 5,5. Alle Spektren wurden in Quarzküvetten mit Schichtdicken von 0,1 cm durchgeführt und um die Pufferbeiträge korrigiert.

2.5.3 Fluoreszenzspektroskopie

Zur Aufnahme von Emissionsspektren in Lösung wurden Küvetten (Hellma) mit Schichtdicken von 10 mm verwendet. Alle Spektren wurden an einem LS55 Spectrometer (PerkinElmer) bei Raumtemperatur aufgenommen. Die Anregung erfolgte mit einer Xenon-Lampe.

2.5.4 Isotherme Titrations Kalorimetrie

Die Bestimmung der thermodynamischen Parameter der Interaktion von Molekülen wurde mittels isothermer Titrations Kalorimetrie durchgeführt.

Die entsprechenden Messungen fanden an einem VP-ITC-Gerät (MicroCal) statt. Das Volumen der Zelle betrug 1,5 ml und 250 μ l in der Spritze. Die Reaktanden in der Spritze wurden in 8 μ l Schritten zur Lösung in der Zelle titriert. Die Zeit zwischen zwei Injektionen, welche zum Äquilibrieren des Signals benötigt wurde, variierte von 240 bis 1400 sec. Vor Beginn der Messung wurden die Proben in identischen Puffern aufgenommen, entgast und auf die entsprechende Messtemperatur von 25°C bzw 37°C gebracht.

Die Bestimmung von Protein-Protein-Wechselwirkungen wurde in PBS durchgeführt. Dabei war die molare Konzentration der Komponenten in der Spritze 16-fach höher als die des Proteins in der Zelle.

Die Wechselwirkung von Protein mit kleinen Molekülen wurde in 50 mM TrisHCl, pH 8 mit einer ebenfalls 16-fach höheren Konzentration in der Spritze durchgeführt.

Die Auswertung der erhaltenen Spektren wurde mit dem Programm VP-ITC Origin 7.0 vorgenommen.

2.5.5 Rasterkraftmikroskopie (AFM)

Die Visualisierung der gebildeten rPrP bzw. rPrP^{Palm} wurde mittels Rasterkraftmikroskopie an einem MultiMode Mikroskop mit einem Nanoscope IIIa Controller von Digital Instruments (Santa Barbara, California, USA) erreicht. Die Probenvorbereitung und Aufnahme der Bilder wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Winter der Universität Dortmund durchgeführt.

2.5.6 FT-ATR-Spektroskopie

Die Anbindungskinetik der palmitoylierten PrP Varianten wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Gerwert an der Ruhruniversität Bochum mittels FT-ATR-Spektroskopie (IFS 66der Fa. Bruker) verfolgt.

2.5.7 NMR-Spektroskopie

Die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des rekombinanten Maus Prions erfolgte NMR spektroskopisch an einem Varian Inova 600-Spektrometer. Das Protein wurde für die heteronuklearen zweidimensionalen Experimente uniform ¹⁵N markiert. Zur Messung wurde das Protein in 20 mM NaOAc, pH 5,5 mit einer Konzentration von 100 µM aufgenommen. Die ¹H/¹⁵N-HSQC-Experimente wurden bei einer Temperatur von 30°C nach der Varian-NMR Pulsfolge mit 2048 x 512 Datenpunkten durchgeführt. Nach Umwandlung der erhaltenen Spektren in das Brukerformat wurden diese mit XWINNMR bearbeitet.

2.6 Zellkultur

2.6.1 Kultivierung von Zellen

Murine Neuroblastomzellen (N2a) wurden als adhärenter Einzelzellrasen in MEM (*Minimal Essential Medium*) unter Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und 1 % Antibiotika-Lösung (Endkonzentration: 1U/ml Penicillin G, 1 µg/ml Streptomycin und 2 mM Glutamin) in Zellkulturschalen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.6.2 Transfektion von rPrP^{Palm}

N2a Zellen wurden mittels Liposomen vermitteltem Transfer unter Verwendung des Protein Transfektions Reagenzes Pro-JectTM (Pierce) sowohl mit rPrP als auch mit rPrP^{Palm} transfiziert. Dazu wurden die Proteine mit einer Konzentration von 0,01 mg/ml in PBS und den Liposomen für 2 bzw 5 h zu den Zellen gegeben.

2.6.3 Zelluläre Aufnahme von rPrP^{Palm}

Zur Analyse der aufgenommenen Menge an rPrP^{Palm} wurden die Zellen zunächst 2x mit kaltem PBS Puffer gewaschen und anschließend in PBS von den Kulturschalen geschabt. Das nach Zentrifugation (1 min, 15000 rpm, Eppendorffzentrifuge) erhaltene Pellet wurde in 1 ml kaltem PBS mit 0,5 % Triton X-100 und 0,5 % DOC (Natriumdesoxycholat) lysiert. Das Lysat wurde 20 min bei 15000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand und das erhaltene Pellet wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min aufgeköcht. Die Analyse der in Detergenz löslichen und unlöslichen Fraktionen erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblotting mit dem Anti-Prion Antikörper A7⁹³.

2.6.4 Indirekte Immunofluoreszenz

Die murinen Neuroblastomzellen (N2a) wurden auf Deckgläsern mit 6 mm Radius analog zu 2.6.1 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 3 % Paraformaldehyd für 20 min fixiert

und anschließend mit 0,2 % Triton X-100 für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Der Erstantikörper (3F4) wurde für 45 min bei 37°C in PBS mit 1 % BSA zugegeben. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit kaltem PBS wurden sie mit dem Zweitantikörper (Cy3-Anti-Mouse Konjugat (Dianova) (Verdünnung 1:200)) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die gewaschenen Deckgläser wurden auf Objektträgern fixiert und mittels Fluoreszenz Mikroskopie (Axiovert 200 M, Zeiss) unter Verwendung der AxioVision 3.0 Software ausgewertet.

2.6.5 Flotations Untersuchung

Zur Lyse der murinen Neuroblastomzellen (N2a) wurden diese analog zu 2.6.3 geerntet und anschließend in 200 µl MBS Puffer (25 mM Mes, 150 mM NaCl, pH 6,5) mit 1 % TritonX-100 resuspendiert und 15 x auf Eis durch eine 1 ml-Einwegspritze mit einer 26G-Kanüle gezogen. Zur Entfernung von Zelltrümmern und anderen Präzipitaten wurden die Proben 5 min bei 500 x g und 4°C zentrifugiert. Zu dem erhaltenen Überstand wurden 200 µl MBS mit 8 0% Sucrose gegeben und gut durchmischt. Diese 400 µl wurden anschließend in einem silanisierten Zentrifugenröhren zunächst mit 3 ml MBS mit 30 % Sucrose und dann mit 1 ml 5 % Sucrose überschichtet. Der erhaltene Stufengradient wurde über Nacht bei 40000 rpm (MLS 50, 4°C) zentrifugiert. Die Probe wurde in 500 µl Fraktionen mittels Westernblotting mit dem mAb A7 analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Semisyntese von membranverankertem Maus Prion Protein

Zur Semisyntese von lipidierten Varianten des rekombinanten Maus Prion Proteins (rPrP) finden zwei unterschiedliche Strategien Anwendung. Zum einen die von Muir et al. ⁸¹ zum ersten Mal beschriebene Methode der *Expressed Protein Ligation* (EPL) und zum anderen der Prozess des Protein *trans*-Spleißens.

3.1.1 Darstellung von rPrP^{Palm} mittels EPL

Die *Expressed Protein Ligation* (EPL) beruht auf der Verwendung von Inteinen. Bei den dazu verwendeten Inteinen wurde das Cystein am N-Terminus des C-terminalen Exteins z. B. zu einem Alanin mutiert.. Dadurch kann das Protein lediglich die erste N→S Acylgruppen-Übertragung durchlaufen und dieses Intermediat kann anschließend durch die Zugabe von Thiolen wie z.B. MesNa abgespalten werden (Abb.8). Mit dem gebildeten Protein-C_α-Thioester können im Folgenden native chemische Ligationen mit synthetischen Peptiden durchgeführt werden.

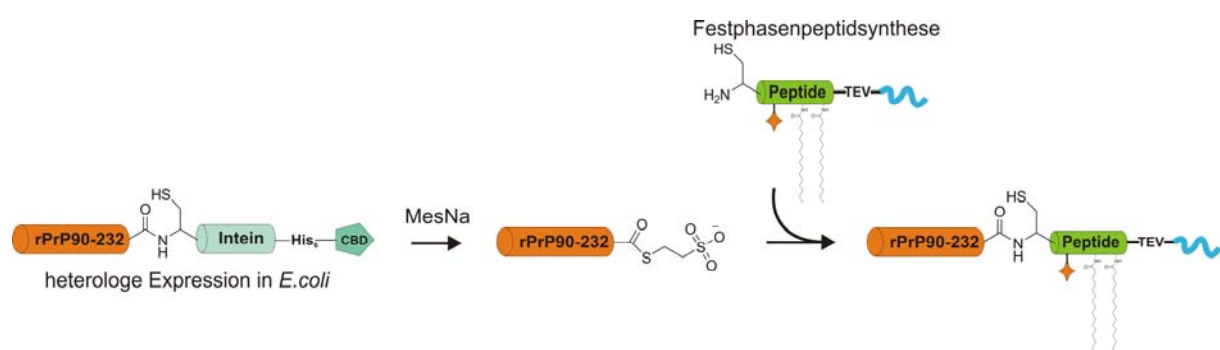


Abb. 8: Schema der Darstellung von rPrP^{Palm} mittels EPL

Bei der semisyntetischen Darstellung von rPrP^{Palm} unter Verwendung der EPL, wird das PrP als C-terminales Fusionsprotein mit dem GyrA Mini-Intein und zu Aufreinigungszwecken einem His-Tag und der Chitin-Binding-Domain (CBD) in *E. coli* exprimiert. Die Generierung des Thioesters erfolgt durch die Zugabe eines Überschusses an Alkylthiol. Die anschließende

Verknüpfung dieses Proteins mit synthetischen, lipidierten Peptiden wird durch native chemische Ligation (NCL) erreicht.

3.1.1.2 Festphasenpeptidsynthese der lipidmodifizierten Peptide

Das murine Prion Protein ist über einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker mit der Außenseite der Plasmamembran verbunden. Es wird vermutet, dass es dort in cholesterolreiche strukturierte Mikrodomäne der Membran segregiert²⁹. Diese Lokalisation scheint entscheidenden Einfluss auf die Konversion des zellulären PrP^C in seine pathogene Form PrP^{Sc} bei den TSE Erkrankungen zu haben³⁰. Im Gegensatz zur aufwendigen chemischen Darstellung des GPI-Ankers können bereits kommerziell erhältliche Fettsäurechloride direkt in der Festphasensynthese von Peptiden eingesetzt werden. Untersuchungen deuten darauf hin, dass natürlich vorkommende palmitoylierte Proteine ähnliche Präferenzen zur diesen geordneten Bereichen der Membran aufweisen, wie GPI verankerte Proteine⁹⁴, deshalb wurden für Membranverankerung des Prion Proteins zwei Palmitoylreste eingeführt. Zur gezielten Untersuchung des Einflusses dieser Membranverankerung auf die Konversion wurden im Rahmen der durchgeführten Festphasenpeptidsynthese demnach zwei Palmitoylreste als GPI Mimetikum eingeführt. Neben der Detektionsmöglichkeit des Proteins mittels Immunfluoreszenz, kann durch eine gerichtete Einführung von Fluoreszenzfarbstoffen die direkte Untersuchung des Proteins *in vivo* und *in vitro* ermöglicht werden.

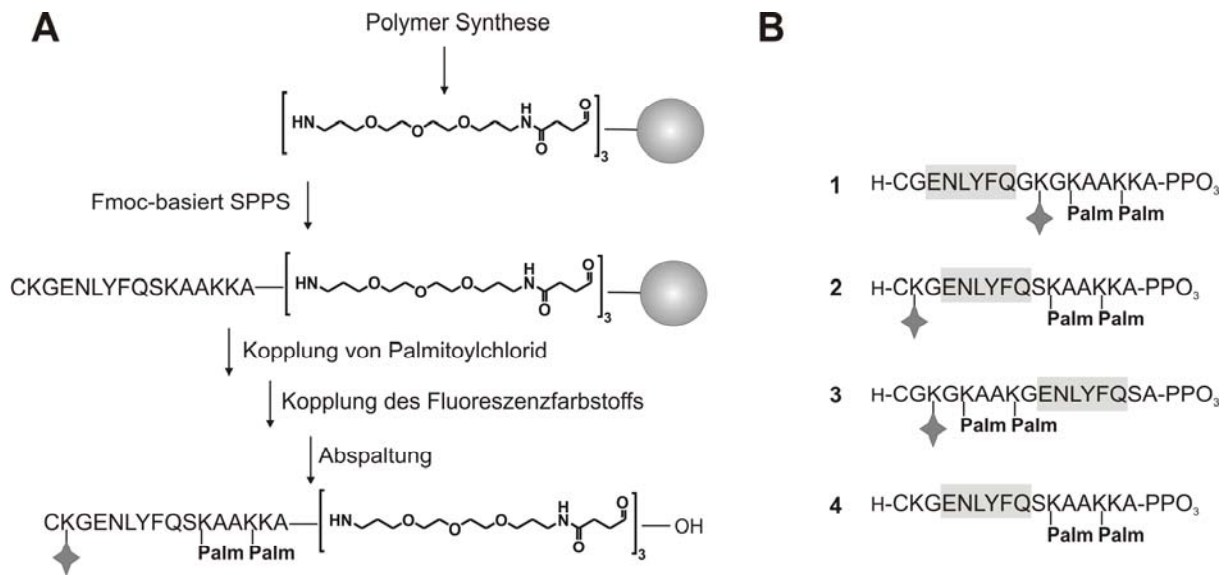


Abb. 9: A) Syntheschema zur Darstellung der lipidierten Peptide. Nach der Kopplung von drei (4,7,10)-trioxa-1,13-tridecanediamin Einheiten als Solubilisierungstag wird das Peptid mittels Fmoc-Strategie synthetisiert. Die Einführung der Modifikation wie Lipidierung und/oder Fluoreszenzmarkierung erfolgt am Harz. B) Verwendete lipidierte Peptide. In grau unterlegt ist die Erkennungssequenz der TEV-Protease zur selektiven Entfernung der Anker oder des Solubilisierungstags

Durch die eingeführte Erkennungssequenz der TEV-Protease können je nach Wahl der Inkorporationsstelle des Fluorophors entweder die Prozessierung des Prion Proteins (siehe Abb. 9 B (2)) oder die des Lipidankers (siehe Abb. 9 B (1)) verfolgt werden. Diese selektive Einführung unterschiedlicher Modifikationen in ein Peptid wird durch die Verwendung orthogonaler bzw. pseudoorthogonaler Schutzgruppen ermöglicht. Die Einführung hydrophober Gruppen, wie der beiden Palmitoylreste sowie des Fluorophors, führte jedoch zu einer sehr eingeschränkten Löslichkeit der Peptide in wässrigen Puffern sowie den in 2.4.3 beschriebenen HPLC-Puffer Systemen. Auf Grund dessen konnten die dargestellten Peptide auch ohne zuvorige Aufreinigung nicht für die Ligation mit den rPrP-C_α-Thioestern verwendet werden. Somit bestand die Notwendigkeit die Löslichkeit der Peptide zu erhöhen. Zu diesem Zweck wurde eine kurze Oligoethylen-Glycol Einheit an den C-Terminus des Peptids angefügt (siehe Abb. 9 A), was zu einer signifikanten Erhöhung der Löslichkeit in den verwendeten Puffersystemen für die Ligation mit dem rPrP Thioester führte.

3.1.1.3 Darstellung von NHS aktiviertem Cy5

Zur Fluoreszenzmarkierung der im Folgenden dargestellten Peptide wurde unter anderem der Farbstoff Cy5 verwendet. Da dieser als freie Säure vorlag, war zur Kopplung während der Festphasensynthese die Darstellung einer aktivierten Form des Cy5 erforderlich. In der vorliegenden Arbeit wurde dazu der N-Hydroxysuccinimid Aktivester des Cy5 generiert⁹⁵.

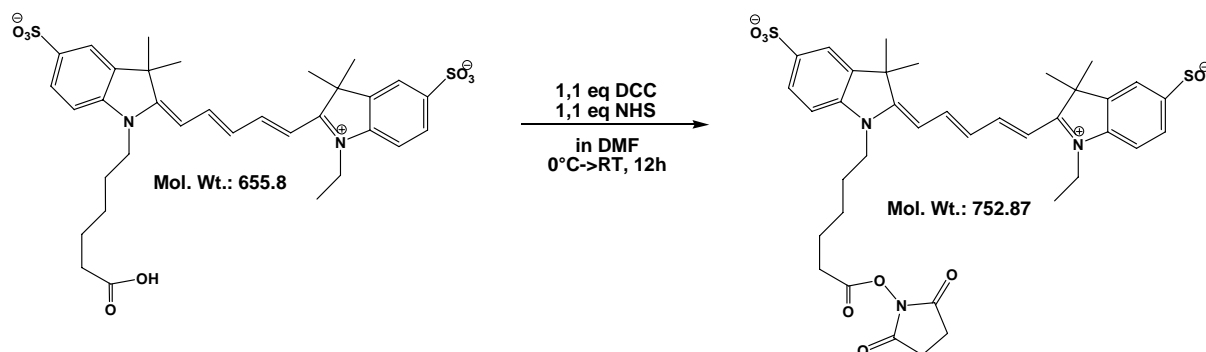


Abb. 10: Synthese von Cy5-NHS

Dazu wurde die freie Säure des Cy5 in wasserfreiem DMF aufgenommen und mit 1,1 äq Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 1,1 äq N-Hydroxysuccinimid (NHS) bei 0°C unter Argon gerührt, dabei wird in einem Zeitraum von ~12 h die Temperatur kontinuierlich von 0°C auf Raumtemperatur erhöht. Das Lösungsmittel wird im Vakuum evaporiert und das Rohprodukt ohne weitere Aufreinigungsschritte in der Festphasensynthese eingesetzt. Die Bildung des NHS-Esters wurde massenspektrometrisch mittels MALDI-TOF nachgewiesen.

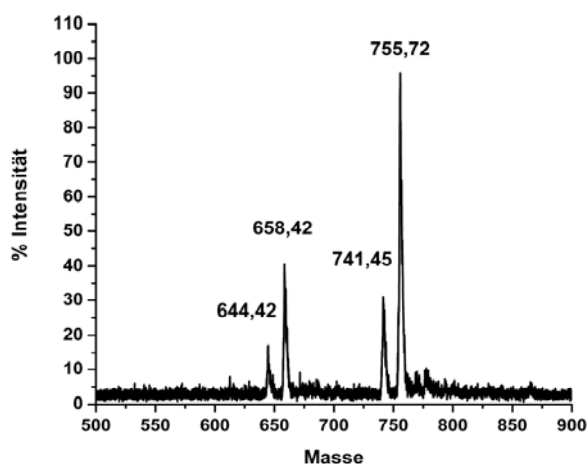


Abb. 11: MALDI-tof des Cy5-NHS Aktivesters unter Verwendung der Matrix α -Cyano-4-Hydroxymizimtsäure

Die Masse von 644,42 entspricht mit einer Massendifferenz von -10 der freien Säure. Die Abweichung der Massen lässt sich auf die fehlerhafte Kalibrierung des Gerätes zurückführen, da alle Massen um den gleichen Wert von -10 abweichen. So stellt die Masse 658,42 das Na⁺-Salz der Säure dar. Die Masse 741,45 entspricht somit dem NHS-Aktivester von Cy5 und 755,72 dem Na⁺-Addukt des NHS-Esters.

3.1.1.4 Synthese von Peptid 1

1 H-CENLYFQGK_(Cy5)GK_(Palm)AAK_(Palm)K-PPO₃-G-OH 16

M = 3765 g/mol [mit 2 x Palm und Cy5]

Die Synthese von **1** erfolgte manuell im 0,2 mmol Maßstab nach der Fmoc-Strategie an einem Wang-Harz. Dabei wurden die Fmoc-geschützten Aminosäuren in einem Überschuss von 5 äq bezogen auf den Synthesemaßstab eingesetzt. Zur selektiven Einführung der Fettsäurereste wurden K(11) und K(14) mit der Schutzgruppe ivDde geschützt. Auf Grund der Instabilität der Fmoc-Gruppe gegenüber den Abspaltbedingungen für ivDde war die Aminofunktion des N-terminalen Cysteins Boc geschützt. Zur Kopplung der Palmitoylreste wurden zunächst die ivDde-Schutzgruppen der Seitenkettenaminofunktion von Lys(11) und Lys(14) durch Inkubation des beladenen Harzes mit dreimal ca. 10 ml 3 % (v/v) Hydrazin in DMF für 10 min abgespalten. Die Palmitoylierung erfolgte durch Zugabe von 20 äq Palmitoylchlorid, 20 äq HOBT und 22 äq Triethylamin bezogen auf den Synthesemaßstab in DCM/DMF 3:1. Zur Kopplung des Fluorophors wurde die Mtt-Schutzgruppe an Lys(9) durch kontinuierliches Waschen des Harzes mit ~ 500 ml 3 % TFA in DCM entfernt. Die Neutralisation des Harzes erfolgte durch Inkubation mit 10 % DIEA in DMF, zur anschließenden Kopplung wurde das Harz mit dem Cy5-NHS Esters in DMF für mindestens 4 h behandelt. Das modifizierte Peptid wurde durch Behandlung mit 95 % TFA mit 2,5 % TIS und 2,5 % H₂O für 3 h von Harz abgespalten. Die Präzipitation des Peptids erfolgte durch Zugabe von eiskaltem Diethylether (siehe 2.4.2). Das erhaltene Rohpeptid wurde durch RP-HPLC über C4 (125 x 4 mm) mit einem Gradienten von 5 % (v/v) Puffer B nach 100 % (v/v) Puffer B in Puffer A über 30 min sowie durch ESI-MS analysiert (Abb. 12).

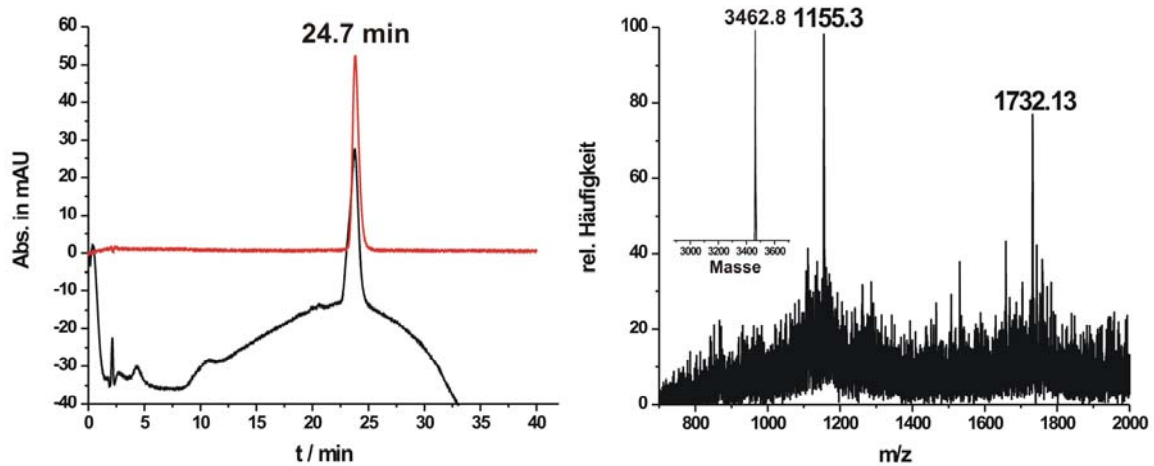


Abb. 12: RP-HPLC-Chromatogramm (links) und ESI-MS (rechts) mit dekonvolutiertem Spektrum des gereinigten Peptids **1**

Im ESI-MS treten die Ladungszustände von zwei (1732.12) und drei (1155,3) positiven Ladungen pro Peptid auf, die ermittelte Masse von 3463.8 g/mol weicht von der berechneten Masse von 3766 g/mol um 302 g/mol ab. Diese Abweichung stimmt genau mit der Masse einer PEG-Einheit überein, sodass lediglich ein Peptid mit zwei PEG-Einheiten isoliert werden konnte. Unter den gegebenen Abspaltbedingungen ist die Darstellung eines 3fach PEGylierten Peptids nicht möglich, was eine Modifikation der Synthese erfordert. Die vorgenommenen Veränderungen werden im folgenden Abschnitt erläutert. Der Hauptpeak des HPLC-Chromatogramms bei 24,7 min kann dem 2 fach pegylierten Produkt zugeordnet werden.

3.1.1.5 Synthese von Peptid 2

1 H-CK_(Cy5)GENLYFQSK_(Palm)AAK_(Palm) K-PPO₃-A-OH 16

M = 3806 g/mol [mit 2 x Palm und Cy5]

Zur Überwindung der Darstellungsprobleme von Peptid **1** wurde im folgendem die Synthese unter Verwendung des HMPB-Harzes durchgeführt.

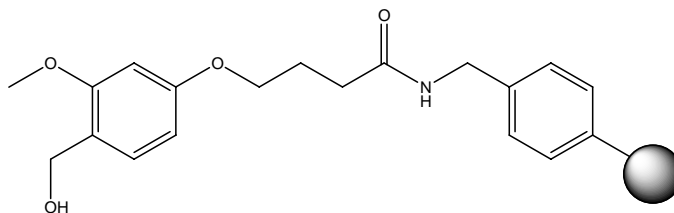


Abb. 13: 4-Hydroxymethyl-3-methoxyphenoxybutyric acid (HMPB) AM Harz

Der in Abb 13 dargestellte Linker ermöglicht die Abspaltung der Peptide unter milden Bedingungen (1-5 %TFA in DCM). Die Kopplung der Palmitoylreste erfolgte analog zur Darstellung von **1**. Die Kopplung des Fluorophors an der festen Phase erforderte einen Wechsel der Schutzgruppe zur Methoxy-methyl-trityl-(Mmt)-Schutzgruppe, da die Abspaltbedingungen für Mtt nicht orthogonal zum HMPB-Linker sind. Die Mmt-Schutzgruppe lässt sich durch Inkubation des Harzes mit 10 % AcOH, 20 % TFE in 70 % DCM für 3 mal 20 min quantitativ entfernen. Die Neutralisation des Harzes und Kopplung des Farbstoffes wurde wie bereits für **1** beschrieben durchgeführt. Die Abspaltung des Peptids erfolgte durch Inkubation mit 3 % TFA in DCM für 30 min. Nach Evaporation des Lösungsmittels im Argon-Strom erfolgte die Abspaltung der übrigen Schutzgruppen durch Zugabe von 5 % TIS, 5 % H₂O in 90% TFA für 2 h. Die Aufreinigung erfolgte mittels RP-HPLC über C4 (250 x 22 mm) mit einem Gradienten von 30 % (v/v) Puffer B nach 80 % (v/v) Puffer B in Puffer A über 60 min. Die Fraktionen wurden mittels analytischer RP-HPLC und ESI-MS analysiert

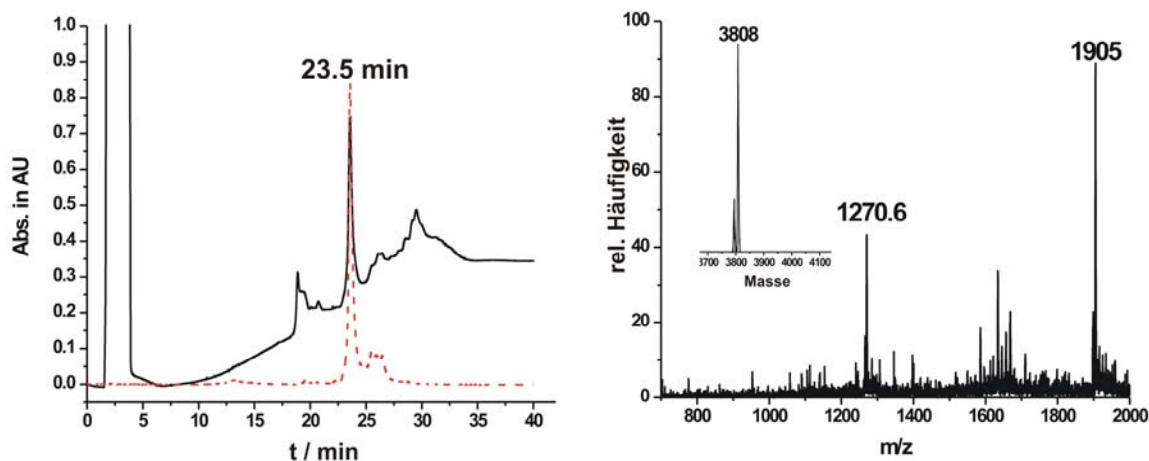


Abb. 14: ESI-MS (rechts) mit dekonvolutiertem Spektrum und analytisches RP-HPLC-Chromatogramm (links) vom gereinigten Peptid **2** mit einem Gradienten von 5 % Puffer B nach 80 % Puffer B in 30 min.

Der Hauptpeak des HPLC-Chromatogramms bei 23,5 min kann dem Produkt zugeordnet werden. Im ESI-MS treten die Ladungszustände des Peptids mit zwei (1905,0) und drei (1270,6) positiven Ladungen auf. Die ermittelte Masse von 3808 g/mol stimmt mit der berechneten Masse von 3806 g/mol gut überein. Dabei konnte unter Verwendung des HMPB-Harzes die Deletion einer PEG-Einheit verhindert werden. Eine mögliche Erklärung ist der Wechsel der C-terminalen Aminosäure von G nach A. Die Verwendung von Gly führte evtl. während der Abspaltung zu dieser Deletion und nicht die sauren Bedingungen, welche hier ebenfalls zur Entfernung der Seitenkettenschutzgruppen verwendet wurden.

3.1.1.6 Synthese von Peptid 3

1 H-CGK_(Dy505)GK_(Palm)AAK_(Palm)GENLYFQS-PPO₃-A-OH 16

M = 3624.4 g/mol [mit 2 x Palm und Dy505]

Die Synthese von **3** erfolgte analog zu **2** manuell an einem HMPB-Harz unter Verwendung der Fmoc-Strategie. Die Kopplung der Palmitoylreste sowie des Fluorophors Dy505, welcher als NHS-Ester vorlag, wurde wie bereits beschrieben durchgeführt. Die Aufreinigung erfolgte mittels RP-HPLC über eine C4 RP-Säule (250 x 22 mm) mit einem Gradienten von 30 % (v/v) Puffer B nach 80 % (v/v) Puffer B in Puffer A über 60 min. Die Fraktionen wurden mittels analytischer RP-HPLC und ESI-MS analysiert

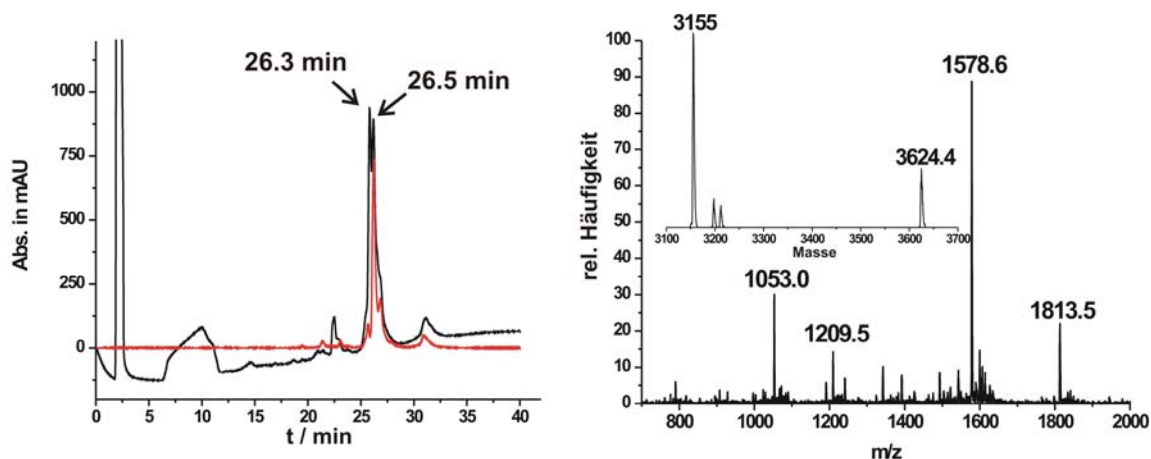


Abb. 15: ESI-MS mit dekonvolutiertem Spektrum (rechts) und analytisches RP-HPLC-Chromatogramm (links) des gereinigten Peptids **3** mit einem Gradienten von 5 % Puffer B nach 80 % Puffer B in 30 min

Im HPLC-Chromatogramm sind zwei Peaks mit ähnlicher Retentionszeit zu erkennen, von denen einer eine Absorption bei 505 nm aufweist. Der erste Peak kann dem 2-fach palmitoylierten Peptid zugeordnet werden, der zweite bei 26,5 min, auf Grund der spezifischen Absorption des Fluorophors bei 505 nm dem palmitoylierten und mit Dy505 modifizierten Peptid. Es konnte unter den gewählten Bedingungen keine Trennung der beiden Spezies unter Verwendung der RP-HPLC erreicht werden. Im ESI-MS tritt sowohl der Ladungszustand mit zwei (1578.6) und drei positiven Ladungen (1053.0) des palmitoylierten Peptids auf als auch die Ladungszustände zwei (1813.4) und drei (1209.5) des vollständig modifizierten Peptides. Aus dem dekonvolutierten Spektrum ergibt sich für das Peptid **3** eine Masse von 3624.4 g/mol, was in sehr guter Übereinstimmung mit der errechneten Masse von 3624.4 g/mol ist. Die zweite dekonvolutierte Masse von 3155 g/mol weist eine Differenz zur Masse von **3** von 470.4 g/mol auf. Dieser Unterschied entspricht genau der Masse des Fluorophors Dy505.

3.1.1.7 Synthese von Peptid **4**

1 H-CKGENLYFQSK_(Palm)AAK_(Palm)KA-PPO₃ 15

M = 3168 g/mol [mit 2 x Palm]

Die Synthese von **4** erfolgte analog zu **2** manuell an einem HMPB-Harz unter Verwendung der Fmoc-Strategie. Die Kopplung der Palmitoylreste wurde wie bereits beschrieben

durchgeführt. Das erhaltene Rohpeptid wurde durch RP-HPLC über C4-RP-HPLC (250 x 22 mm) mit einem Gradienten von 20 % (v/v) Puffer B nach 80 % (v/v) Puffer B in Puffer A über 60 min sowie über ESI-MS analysiert (Abb. 16).

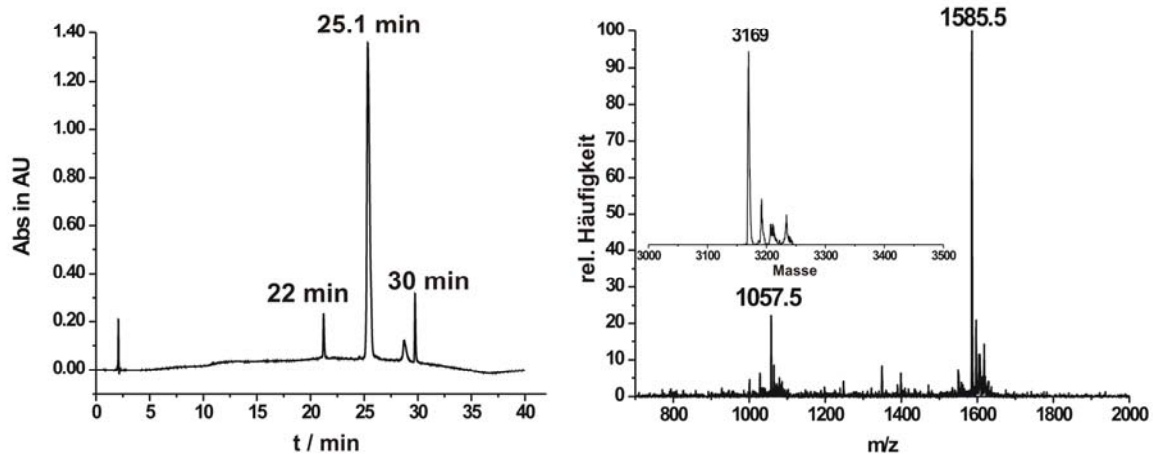


Abb.16: HPLC-Chromatogramm (links) und ESI-MS (rechts) mit dekonvolutiertem Spektrum des gereinigten Peptids 4

Der Hauptpeak des HPLC-Chromatogramms bei 25,1 min kann dem Produkt zugeordnet werden. Im ESI-MS treten die Ladungszustände des Peptids von zwei (1585.5) und drei (1057) positiven Ladungen auf, die ermittelte Masse von 3169 g/mol stimmt mit der berechneten Masse von 3168 g/mol gut überein. Bei den Signalen bei 22 und 30 min handelt es sich um Säulenartefakte.

3.1.1.8 Expression und Aufreinigung von rPrP-C α -Thioester

Zur heterologen Expression des murinen PrP(89-232) wurde das Gen in Fusion mit dem GryA Mini-Intein aus *Mycobacterium Xenopii* in einen modifizierten pTXB1 Vektor (New England Biolabs) kloniert. Die Modifikation des Vektors besteht in der Insertion eines Hexahistidin-Tags zu Aufreinigungszwecken zwischen dem GryA Intein und der Chitin bindenden Domäne (CBD) (siehe Abb. 17). Nach erfolgter Klonierung wurde der Vektor in einen *E.coli* Expressionsstamm transformiert. Das Gen für das Fusionsprotein befindet sich bei dem verwendeten Plasmid unter der Kontrolle des T7-Promotors, welcher über den lacI-Operator reguliert wird. Unter Verwendung des *E.coli* Stammes BL21(DE3)RIL, bei dem die T7 RNA

Polymerase genomisch unter der Kontrolle des lacUV5 Promotors integriert ist, lässt sich die Proteinexpression durch die Zugabe von IPTG, einem nicht hydrolysierbarem Analogon der Allolaktose, induzieren. Die Zugabe von IPTG erfolgte in der exponentiellen Phase des Bakterienwachstums. Die Expression des mPrP-Intein Fusionsproteins erfolgte in Einschlusskörperchen (Inclusion Bodies). Nach der Solubilisierung des aggregierten Materials in 8 M GdnHCl erfolgte die affinitätschromatographische Aufreinigung mittels Ni-NTA fast flow (Quiagen) unter denaturierenden Bedingungen wie unter 2.3.1 beschrieben.

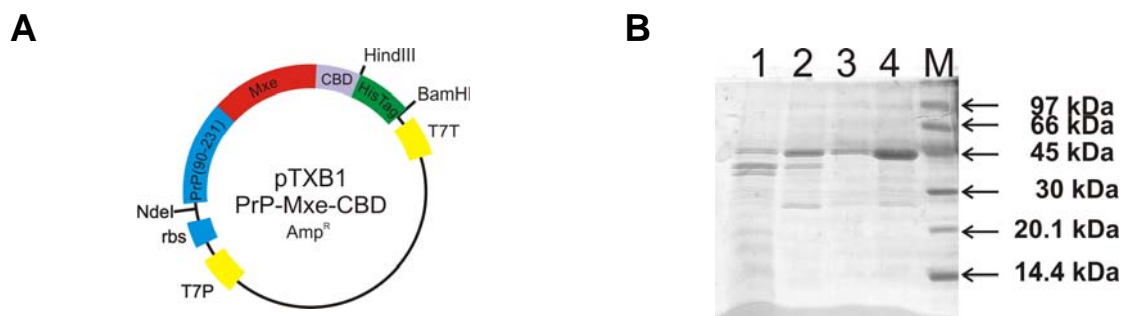


Abb. 17: rechts: Plasmidkarte für die Expression des PrP-GyrA-CBD Fusionsprotein
Links: SDS-Page der Ni-NTA Aufreinigung von PrP-GyrA-CBD. Spur 1 entspricht dem Ni-NTA Durchfluss, Spur 2 und 3 den Waschsritten und Spur 4 dem Eluat. Der LMW-Marker (Biorad) befindet sich in der mit M bezeichneten Spur.

Wie in dem SDS-Gel in Abb. 17 zu erkennen ist, konnte ein Protein mit dem apparenten Molekulargewicht von ~45 kDa isoliert werden. Diese Masse entspricht dem Fusionsprotein rPrP-GyrA-CDB. Zur Generierung eines C-terminalen Thioesters des murinen PrPs ist eine partielle Faltung des GyrA Inteins erforderlich, sodass die spontane N→S Acylgruppenübertragung durchlaufen werden kann. Unter Verwendung von GdnHCl konnte dies selbst nach Reduktion der Konzentration auf 2 M GdnHCl nicht erreicht werden. Eine weitere Verringerung der Konzentration führte zur vollständigen Präzipitation des Proteins. Die denaturierenden Eigenschaften des GdnHCl verhindern den zur Abspaltung des Thioestern benötigten N→S Acylgruppentransfer. Dies machte einen Wechsel des Chaotrops auf 8 M Harnstoff erforderlich. Durch Verringerung der Konzentration auf 4 M Harnstoff, 50 mM TrisHCl mittels Dialyse konnte eine partielle Faltung des GryA Inteins erzielt werden⁹⁶. Die Ausbildung des C-terminalen Thioesters des murinen PrPs wurde durch die Zugabe von 250 mM MesNa induziert, dabei wurden Spaltungsausbeuten von 50 % erreicht. Die Isolation des gebildeten Thioesters erfolgte mittels RP-HPLC unter Verwendung einer präparativen C4-RP-HPLC (250 x 22 mm) mit einem Gradienten von 20 % (v/v) Puffer B nach 60 % (v/v) Puffer B in Puffer A über 60 min.

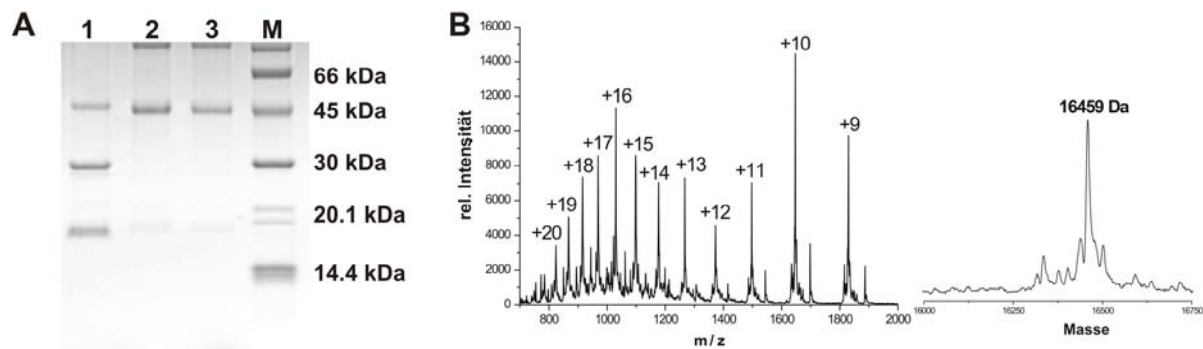


Abb. 18: A) SDS-Page des aufgereinigten rPrP-GyrA Fusionsprotein (Spur 2, 8 μ l und Spur 3, 4 μ l) und des Spleißens Ansatzes in 4 M Harnstoff (pH 8) mit 250 mM MesNa nach 20 h bei RT (Spur1). B) ESI-MS des isolierten rPrP-MesNa Thioesters.

In Abb. 18 A ist zu erkennen, dass nach Zugabe des Thiols MesNa zwei neue Proteinbanden entstehen. Dabei entspricht die Bande mit dem apparenten Molekulargewicht von 30 kDa dem abgespaltenen GryA Intein und die Bande mit \sim 16 kDa dem rPrP-MesNa Thioester. Die Masse des gebildeten Thioesters wurde mittels ESI-MS bestimmt (Abb. 18 B) und ergab sich zu 16459 g/mol, was mit der berechneten Masse von 16458 g/mol in guter Übereinstimmung ist.

3.1.1.9 Ligation von rPrP-C_α-Thioester mit Peptid 4

Die Darstellung der lipidierten rPrP^{Palm} Varianten erfolgte mittels nativer chemischer Ligation. Die Verknüpfung erfolgt dabei über den nukleophilen Angriff des N-terminalen Cysteins des lipidierten Peptids auf den C-terminalen Thioester des PrPs. Die Ausbildung einer nativen Amidbindung erfolgt durch einen anschließenden irreversiblen S \rightarrow N Acylshift. Die Reaktion wurde in 6 M GdnHCl, 300 mM NaPi, pH 7,8 mit 17 mg/ml Dodecylphosphocholin (DPC) (siehe 2.4.4.)⁹⁷ durchgeführt. Dazu wurden die einzelnen Komponenten in dem Ligationspuffer mit einer Konzentration von 5-6 mM angesetzt. Die hohe Chaotropkonzentration von 6M GdnHCl dient der vollständigen Denaturierung der einzelnen Komponenten und erhöht somit die Zugänglichkeit der funktionellen Gruppen. Zusätzlich wurde bei der Ligation das Lysophospholipid DPC in einer Konzentration von 17 mg/ml zugesetzt um die Löslichkeit des lipidierten Peptids zu steigern. Durch die Zugabe von 1 % Thiophenol wurde die Ligation gestartet. Durch die Umesterung des Thiols mit dem N-terminalen Peptid wird eine reaktivere Thioesterspezies gebildet, wodurch der nukleophile

Angriff des C-terminalen Peptids begünstigt wird. Nach einer Reaktionszeit von 48 h bei Raumtemperatur wurde die Ligation durch Zugabe von 3 VÄ des Ligationspuffer und 15 % (v/v) BME gestoppt. Dazu wurde die Lösung 20 bis 30 min unter leichtem rühren inkubiert, bis sich das entstandene Präzipitat bestehend aus dem Thiophenoldisulfid wieder gelöst hatte. Nach Zugabe von TCEP, zur Reduktion evtl. entstandener BME Addukte wurde der Ansatz unter Verwendung von C4 RP-HPLC mit einem Gradienten von 20 % B in Puffer A nach 80 % B in Puffer A in 60 min aufgereinigt. Die Identifikation erfolgt mittels ESI-MS.

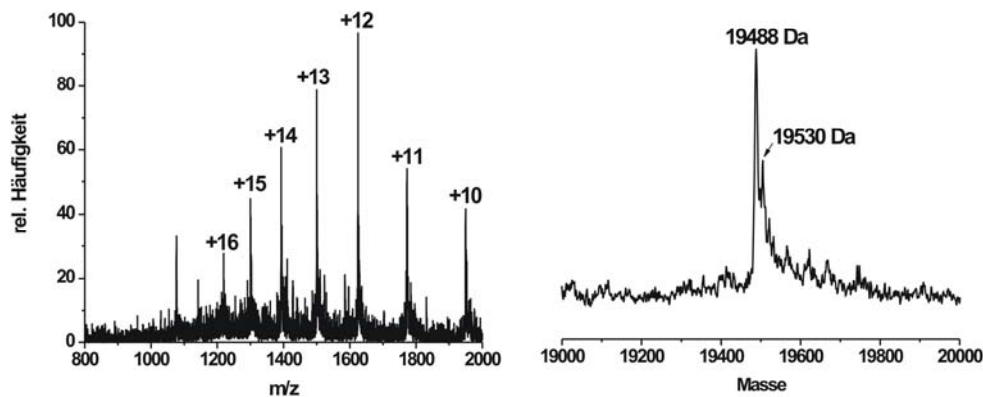


Abb. 19: ESI-MS mit dekonvolutiertem Spektrum des gereinigten rPrP^{Palm}

In Abb. 19 ist das erhaltene ESI-MS aus der Aufreinigung von rPrP-4 dargestellt. In dem Massenspektrum treten die Ladungszustände von 10 bis 16 positiven Ladungen pro Molekül auf. Daraus ergibt sich nach Dekonvolution eine Masse von 19488 g/mol, was mit der berechneten Masse von 19490 g/mol in guter Übereinstimmung ist. Bedingt durch die lange Lagerung der Proteine in harnstoffhaltigen Puffern während der Thioester Generierung wurde häufig eine Modifikation des Proteins um +42 g/mol detektiert. Dies ist höchst verscheinlich auf eine Carbamoylierung des N-Terminus zurückzuführen. Da bekannt ist, dass derartige Modifikationen des PrP zu veränderten Löslichkeitseigenschaften führen, wurde eine, auf dem Prozess des Protein *trans*-Spleißens beruhende, Möglichkeit der semisynthetischen Darstellung von Proteinen zur Lipidierung des Prion Protein etabliert ⁹⁸.

3.1.2 Darstellung von rPrP^{Palm} mittels Protein *trans*-Spleißen

Der Prozess des Protein *trans*-Spleißens zur semisynthetischen Darstellung von rPrP^{Palm} erfordert im Gegensatz zur EPL keine Generierung eines Thioesters. Er beruht darauf, dass einige Inteine in zwei oder mehr Teile (Split-Inteine) gespalten werden können, die individuell keinerlei Aktivität zeigen. Neben künstlichen Split-Inteinen wurden ebenfalls natürlich vorkommende, wie das hier verwendete DnaE aus *Synechocystis Ssp*, bereits charakterisiert ⁹⁹. Kombiniert man die Fragmente der Split-Inteine assoziieren diese und bilden in intaktes Protein Spleiß Element. Der Vorteil dieser Methode beruht auf seiner Anwendbarkeit *in vivo*, da die Semisyntese in diesem Fall nicht den Einsatz von überschüssigen Thiolen erfordert, sondern unter moderaten physiologischen Bedingungen durchgeführt werden kann. Ein weiterer Vorteil ist die Resistenz des DnaE Split-Inteins gegenüber geringen Chaotrop Konzentrationen, welches seine Anwendbarkeit bei der *in vitro* Darstellung semisynthetischer Proteine erhöht.

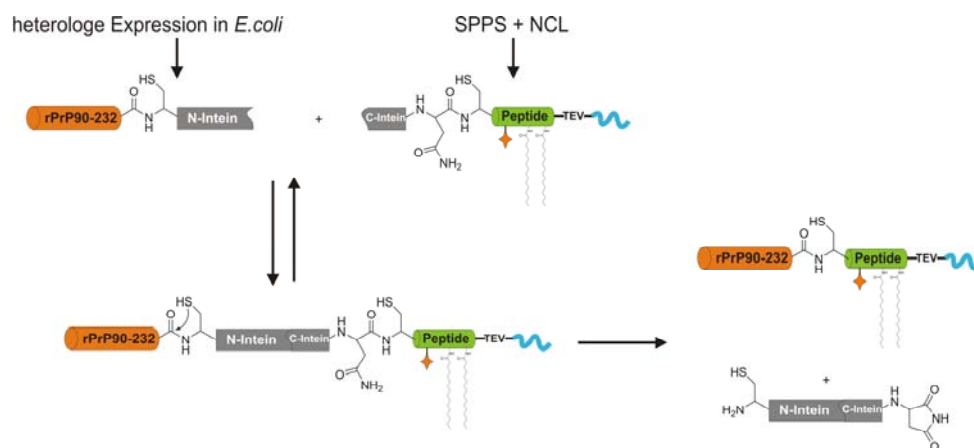


Abb. 20: Schema der *trans*-Spleiß Reaktion des rekombinanten rPrP-DnaE^N und der mittels Festphasensynthese und NCL darstellten lipidierten DnaE^{CPalm} Varianten.

Zu diesem Zweck wurde das murine Prion Protein in Fusion mit dem N-terminalen Fragment des natürlich vorkommenden Split-Inteins DnaE aus *Synechocystis Ssp* und einem C-terminalen His-Tag in *E.coli* exprimiert (Abb. 20). Die Synthese des C-terminalen Fragments von DnaE erfolgte mittels Festphasensynthese unter Verwendung der Boc-Chemie an einem speziellen Thioester-Harz. Diese Intein-domäne wurde im Folgenden mit den bereits beschriebenen lipidierten Peptiden ligiert. Durch die Kombination dieser beiden Fusionskonstrukte wird das Protein *trans*-Spleißens initialisiert und liefert rPrP^{Palm}.

3.1.2.1 Synthese und Ligation von lipidierten DnaE^C Varianten

Synthese DnaE^C:

1 H-MVKVIGRRSLGVQRIFDIGLPQDHNFLLANGAIAAN-SR 36

M = 4257 g/mol [mit His(DNP) und Thioester]

Die Festphasensynthese des C-terminalen Splitinteins DnaE aus *Synechocystis Ssp* wurde an einem ABI-Peptide-Synthesizer (433A, Applied Bioscience) unter Verwendung der Boc-Strategie an einem speziellen Thioesterharz durchgeführt^{75,91,100}. Nach Entschützung des N-Terminus wurde das Peptid mit HF vom Harz abgespalten. Das Rohpeptid wurde mittels C4 RP-HPLC (250 x 22 mm) mit einem Gradienten von 20 % (v/v) Puffer B nach 45 % (v/v) Puffer B in Puffer A in 60 min gereinigt.

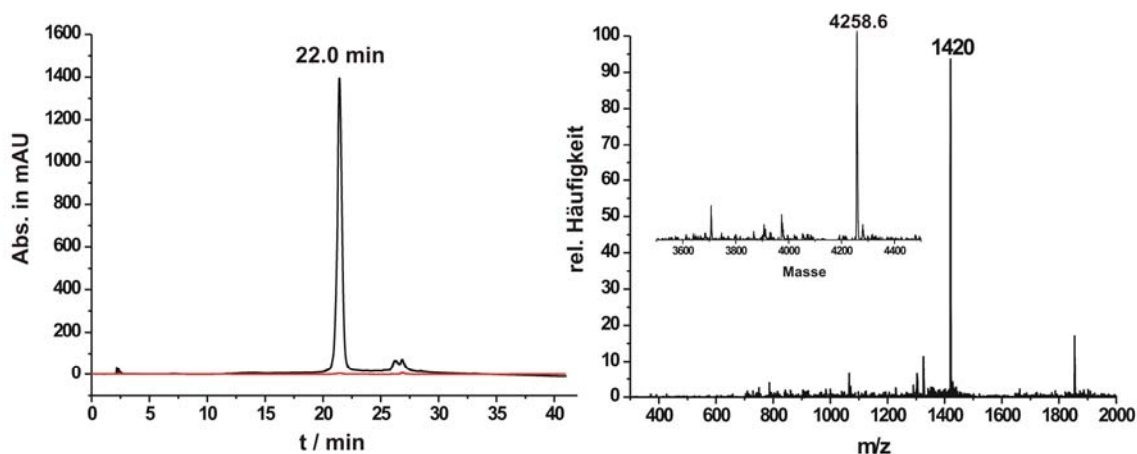


Abb. 21: RP-HPLC-Chromatogramm (links) mit analytischer C4-Säule und einem Gradienten von 5 % Puffer B nach 80 % Puffer B in 30 min, dabei wurde bei den Wellenlängen 214 nm und 280 nm detektiert. ESI-MS (rechts) mit dekonvolutiertem Spektrum von aufgereinigtem DnaE^C.

Das gereinigte DnaE^C entspricht im Chromatogramm dem Peak bei 22 min (Abb. 21).

Die Masse 1420 im ESI-MS (Abb. 21) entspricht dem dreifach positiv geladenen Zielmolekül. Die ermittelte relative Masse von 4258,6 g/mol stimmt mit der errechneten von 4257,2 g/mol gut überein. Die ermittelten Ausbeuten betragen nach HPLC chromatographischer Aufreinigung durchschnittlich 20 % bezogen auf den Synthesemaßstab von 0,4 mmol.

Synthese His-DnaE^C:

1_H-HHHHHHGMVKVIGRRSLGVQRIFDIGLPQDHNFLLANGAIAAN-SR 43

M = 4970 g/mol [mit Thioester]

Zu Aufreinigungszwecken wurde ferner ein N-terminaler His-Tag bestehend aus 6 Histidinen an das C-terminale Intein Segment synthetisiert. Diese Modifikation ermöglicht die Abtrennung des C-terminalen Inteins von rPrP^{Palm} nach dem Protein *trans*-Spleißen. Die Synthese erfolgte analog zu DnaE^C. Die Aufreinigung des Rohpeptids erfolgte mittels C4 RP-HPLC (250 x 22 mm) mit einem Gradienten von 20 % (v/v) Puffer B nach 45 % (v/v) Puffer B in Puffer A in 60 min.

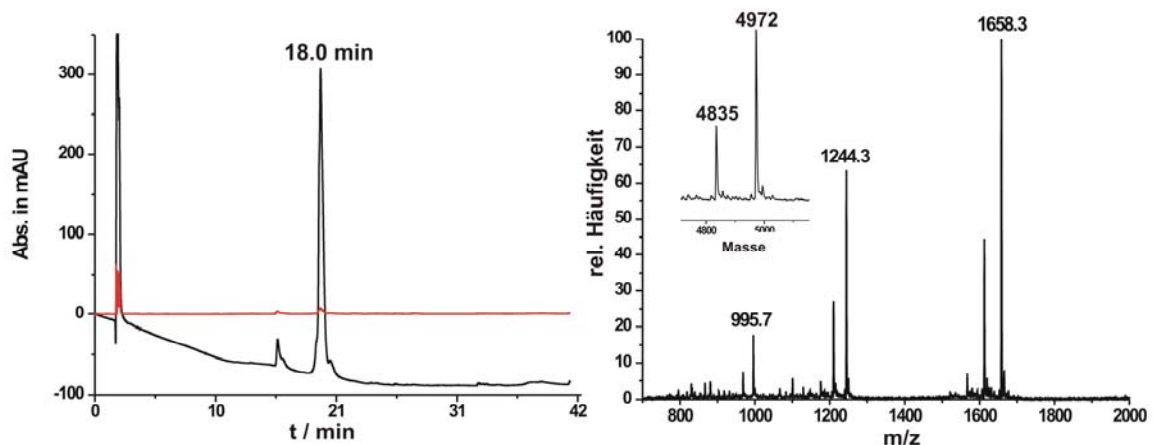


Abb. 22: RP-HPLC-Chromatogramm mit analytischer C4-Säule und einem Gradienten von 5% Puffer B nach 80 % Puffer B in 30 min, dabei wurde bei Wellenlängen von 214 nm und 280 nm detektiert (links). ESI-MS sowie dekonvolutierte Spektrum von aufgereinigtem His-DnaE^C (rechts).

Das gereinigte DnaE^C entspricht im Chromatogramm dem Peak bei 18 min (Abb. 22).

Im Massenspektrum traten neben dem 3 (1658,3); 4 (1244,3) und 5 fach (995,7) positiv geladenen Zielmolekül mit einer dekonvolutierte Masse von 4972 g/mol auch eine Masse von 4835 g/mol auf. Die Differenz von 137 g/mol entspricht genau der Deletion eines Histidins. Eine Abtrennung dieses Peptids von dem Zielprodukt war auf Grund des ähnlichen Elutionsverhaltens mittels RP-HPLC nicht möglich. Nach erfolgter Ligation mit den lipidierten Peptiden war jedoch eine Trennung der Spezies mit 5 bzw. 6 Histidinen möglich.

Native chemische Ligation von DnaE^C mit den lipidierten Peptiden:

Zur Darstellung der unterschiedlichen lipidierten C-terminalen Inteinsegmente wurde die native chemische Ligation (NCL) verwendet. Alle Ligationen der modifizierten Peptide mit DnaE^C-SR wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt, so dass im Folgenden lediglich der Verlauf der Ligation von DnaE^C mit dem Peptid **4** exemplarisch dargestellt wird. Zur Durchführung der Reaktionen wurden 5-6 mM Lösungen der einzelnen peptidischen Komponenten in 6 M GdnHCl, 300 mM NaPi, pH 7,8 eingesetzt, wobei das C-terminalen Peptid in Bezug auf den Thioester mit 1,1 mol äq eingesetzt wurde. Die native chemische Ligation wird durch die Zugabe von 1 % Thiophenol gestartet. Die Reaktionszeiten betragen 12 bis 48 h bei Raumtemperatur. Der Verlauf der Ligationen wurde mittels RP-HPLC verfolgt.

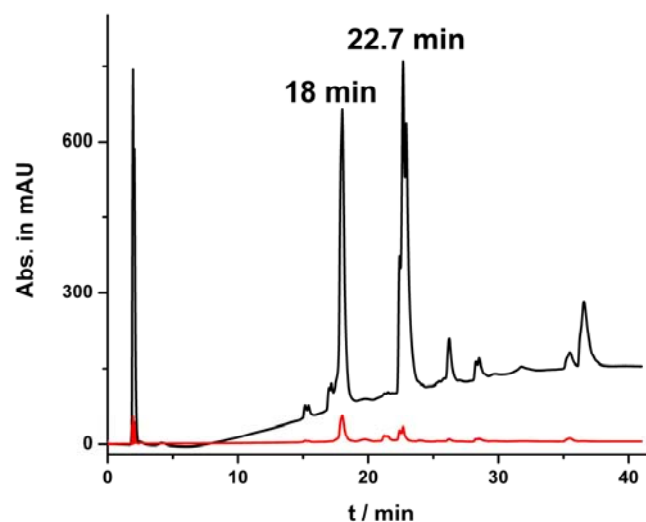


Abb. 23: HPLC-Chromatogramm unter Verwendung einer analytischen C4-Säule und einem Gradienten von 5 % Puffer B nach 100 % Puffer B in 30 min der Ligation von DnaE^C mit Peptid **4**, vor der Zugabe von Thiophenol.

Im Chromatogramm sind für die beiden eingesetzten Komponenten zwei Peaks zu erkennen. Das Signal bei 18 min entspricht hierbei DnaE^C und Signal bei 22,7 min dem Peptid **4**. Nach Zugabe von Thiophenol wurde der Fortschritt der Reaktion nach 7 h überprüft (Abb. 23).

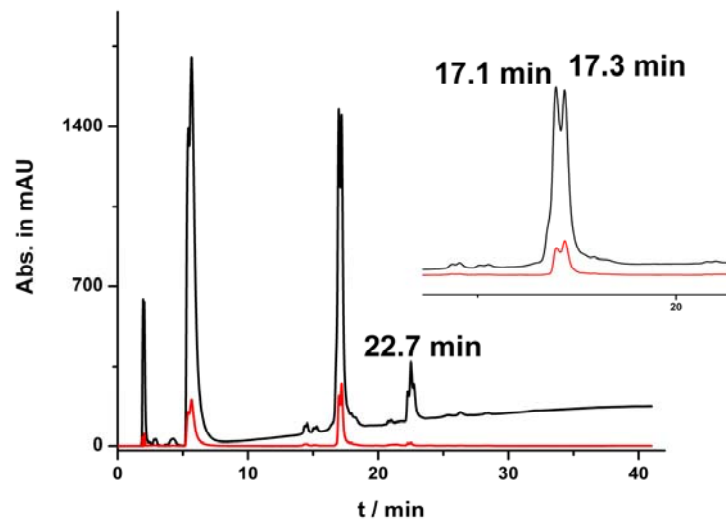


Abb. 24: HPLC-Chromatogramm unter Verwendung einer analytischen C4-Säule und einem Gradienten von 5 % Puffer B nach 100 % Puffer B in 30 min der Ligation von DnaE^C mit Peptid **4** nach 7 h Reaktionszeit

In dem Chromatogramm ist das Entstehen eines neuen Peaks bei 17.3 min mit ähnlicher Retentionszeit wie DnaE^C (17.1 min) zu verzeichnen. Wie unter 2.4.4 beschrieben, bilden sich bei der Ligation in wässrigen Lösungen unlösliche Disulfide des Thiophenols, welche eine HPLC Analytik stören würden. Zu diesem Zweck wurden den Ansätze für ~ 20 min 15 % (v/v) β -Mercaptoethanol (BME) zur Reduktion der Disulfide zugesetzt. Dies bewirkt zusätzlich eine Hydrolyse des DnaE^C-SR Thioesters zu DnaE^C. Bei Signal 1 handelt es sich demnach um DnaE^C und bei Signal 3 und das Peptid **4**. Der Peak bei 2 min entspricht dem Injektionspeak und enthält Guanidinium, der Peak bei 6 min enthält das eingesetzte Reduktionsmittels BME.

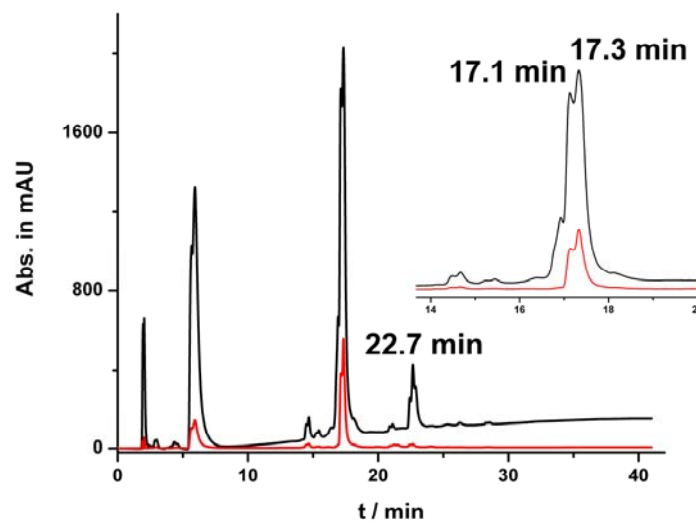


Abb. 25: HPLC-Chromatogramm unter Verwendung einer analytischen C4-Säule und einem Gradienten von 5 % Puffer B nach 100 % Puffer B in 30 min der Ligation von DnaE^C mit Peptid **4** nach 24 h

Nach 24 h wurde der weitere Fortschritt der Reaktion mittels RP-HPLC überprüft. Es ist eine geringe Zunahme des Peaks bei 17.3 min zu verzeichnen. Die leicht alkalischen Bedingungen (pH = 7,8) führen neben der Ligation auch als Konkurrenzprozess zur Hydrolyse des Thioesters. Dies verhindert eine quantitative Ligation der beiden Komponenten. Die massenspektrometrische Analyse des Peaks ergab, dass es sich dabei um das Ligationsprodukt zwischen DnaE^C und dem Peptid **4** handelt. Zur präparativen Aufarbeitung der Ligation wurde der Ansatz mit 3 VÄ des Ligationspuffers verdünnt und anschließend 15-20 % β -Mercaptoethanol hinzugefügt. Im Folgenden wurden dem Ansatz noch einige mg TCEP hinzugefügt. Die Aufreinigung des Gemisches erfolgte über C4 RP-HPLC (250 x 22 mm). Die gesammelten Fraktionen wurden mittels RP-HPLC und ESI-MS analysiert.

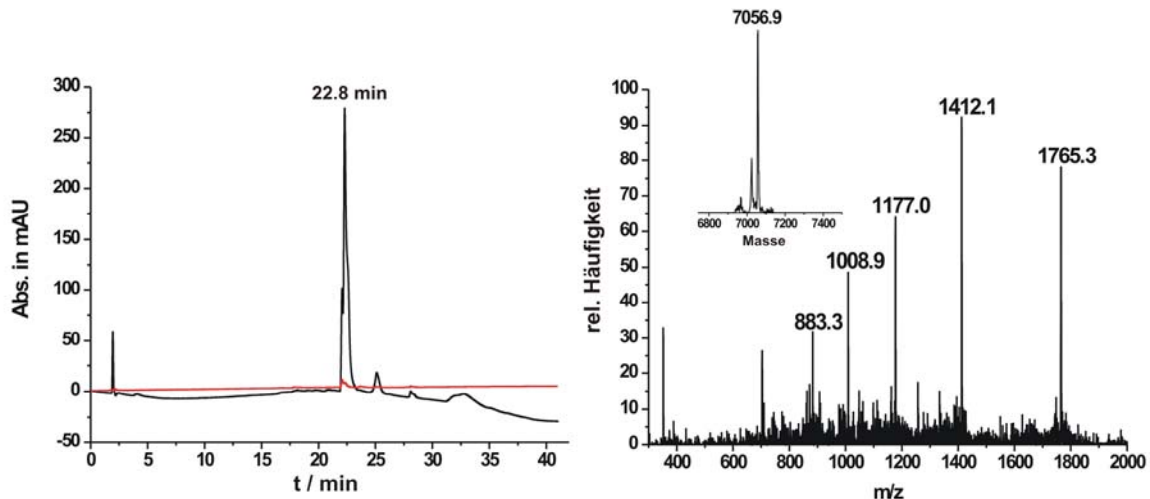


Abb. 26: HPLC-Chromatogramm unter Verwendung einer analytischen C4-Säule und einem Gradienten von 5 % Puffer B nach 80 % Puffer B in 30 min, dabei wurden die Wellenlängen 214 nm und 280 nm detektiert (links). ESI-MS sowie dekonvolutes Spektrum von aufgereinigtem DnaE^C-4 (rechts).

Das gereinigte DnaE^C-4 entspricht im Chromatogramm dem Peak bei 22.8 min (Abb. 26). Im ESI-MS treten die Ladungszustände des 4 bis 8 fach positiv geladenem Molekül bei 1765,3, 1412,1, 1177,8, 1008,9 und 883,3 m/z auf. Das entspricht im dekonvolutes Spektrum einer Masse von 7056,9 g/mol was mit der errechneten Masse von 7054 g/mol in guter Übereinstimmung ist.

Die im Folgenden dargestellten Ligationen wurden alle unter den angegebenen Reaktionsbedingungen durchgeführt. In Abb. 26 sind die korrespondierenden Massenspektren und HPLC-Chromatogramme der gereinigten Ligationsprodukte aufgeführt. Sind mit den berechneten Massen (siehe Abb 27) in guter Übereinstimmung.

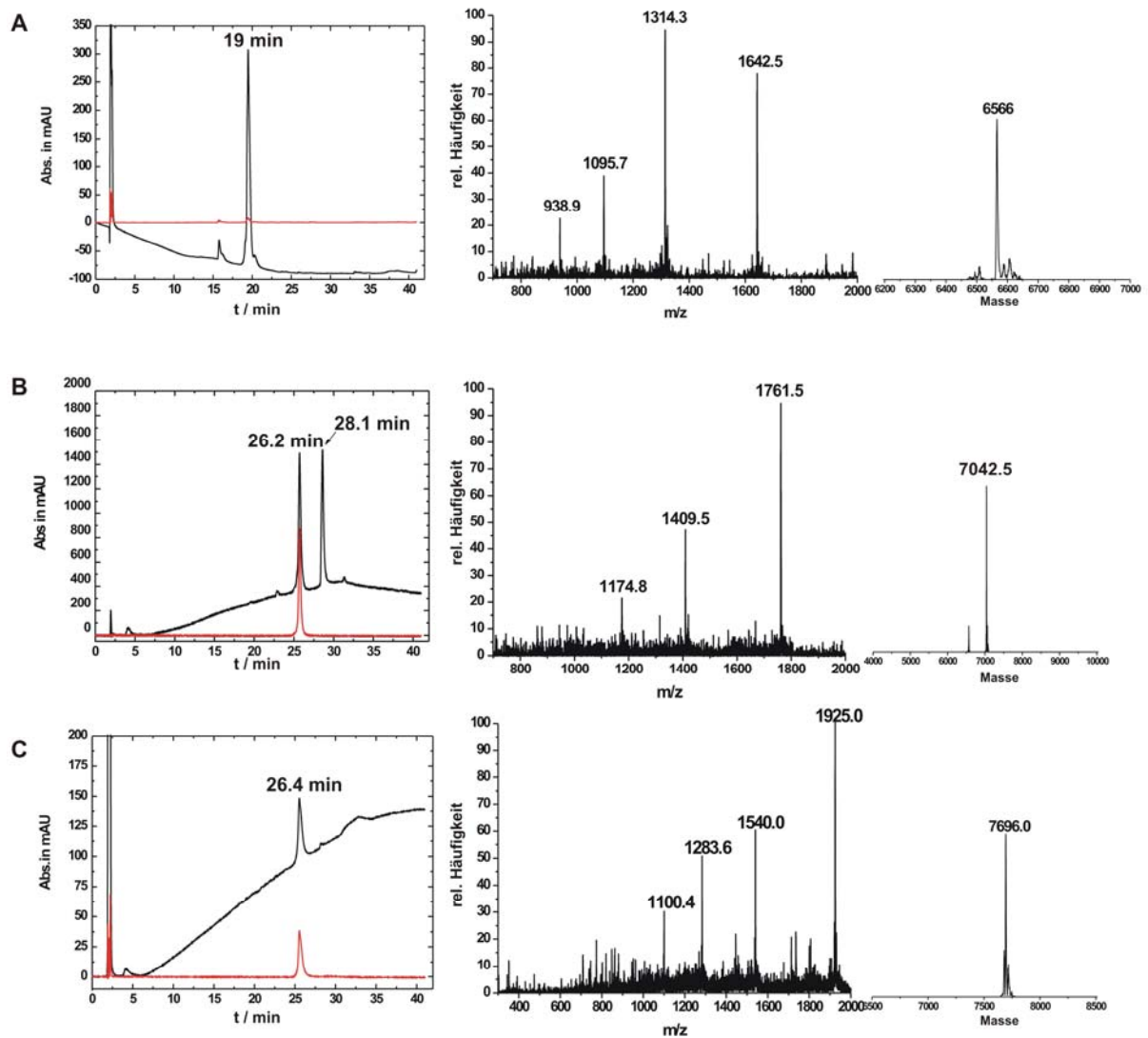


Abb. 27: HPLC-Chromatogramme (links) und Massenspektren (rechts) der gereinigten DnaE^C Varianten

A) Ligationsprodukt aus DnaE^C mit Peptid 3 ohne Lipidierung und Fluoreszenzmarkierung (berechnete Masse 6564 g/mol)

B) Ligationsprodukt aus DnaE^C mit Peptid 3 ohne Fluoreszenzmarkierung (berechnete Masse 7042 g/mol). Das Signal bei 28.1 min im HPLC-Chromatogramm konnte einem Säulenartefakt zugeordnet werden.

C) Ligationsprodukt aus DnaE^C mit Peptid 4 (berechnete Masse 7693 g/mol)

3.1.2.2 Expression und Aufreinigung von mPrP(89-232)-DnaE^N-His

Analog zur Expression des mPrP-Intein Konstruktes ist das Gen des murinen rPrP(89-232) in Fusion mit dem N-terminal Fragment des natürlich vorkommenden Split-Inteins DnaE aus *Synechocystis Ssp* und einem Hexahistidin-Tags in den Vektor pTXB3 (New England Biolabs) kloniert und wird im *E.coli* Stamm BL21(DE3)RIL als Inclusion Bodies exprimiert. Die Aufreinigung erfolgt unter denaturierten Bedingungen wie unter 2.3.1 beschrieben.

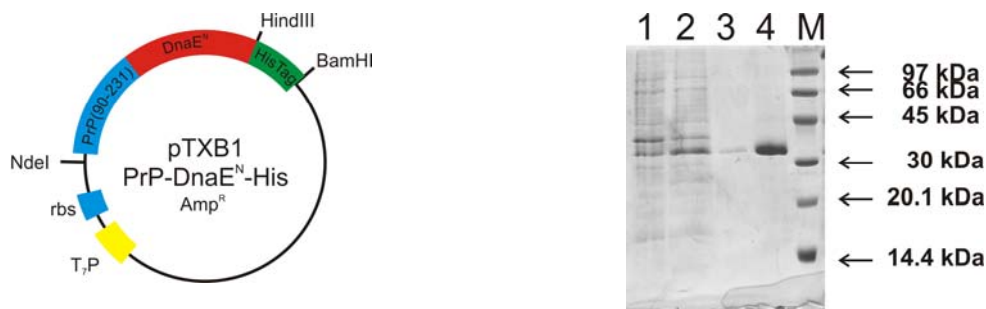


Abb. 28: links: Plasmidkarte für die Expression des PrP-DnaE^N-His Fusionsprotein
rechts: SDS-Page der Ni-NTA Aufreinigung von PrP-DnaE^N-His. Spur 1 entspricht dem Ni-NTA Durchfluss, Spur 2 und 3 den Waschschritten und Spur 4 dem Eluat. Der LMW-Marker (Biorad) befindet sich in der mit M bezeichneten Spur.

Nach affinitätschromatographischer Aufreinigung konnte ein Protein mit dem apparenten Molekulargewicht von ~32 kDa isoliert werden, dies entspricht mit der berechneten Masse von 31384,2 g/mol des Fusionsprotein rPrP-DnaE^N-His (Abb. 28). Das Auftreten des Zielproteins in den Waschschritten ist aus eine Überladung des verwendeten Ni-NTA Materials zurückzuführen. Die funktionelle Faltung der N-terminalen Domäne des Splitinteins DnaE^N kann wie bereits gezeigt¹⁰¹ unter leicht denaturierenden Bedingungen analog zu dem GryA Fusionskonstrukt erreicht werden. Da die große Vorteil des Prozesses des Protein *trans*-Spleißens jedoch auf seiner Anwendbarkeit *in vivo* beruht⁸⁶, wird im Rahmen der vorliegende Arbeit folgendes Rückfaltungsprotokoll (siehe Abb. 29) verwendet. Dazu wurde das aufgereinigte Protein zunächst 1 zu 10 in einen Arginin und Glutathion enthaltenden Puffer verdünnt, womit eine korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken gewährleistet wird. Anschließend erfolgt eine Dialyse gegen 50 mM Tris Puffer bei pH 8.

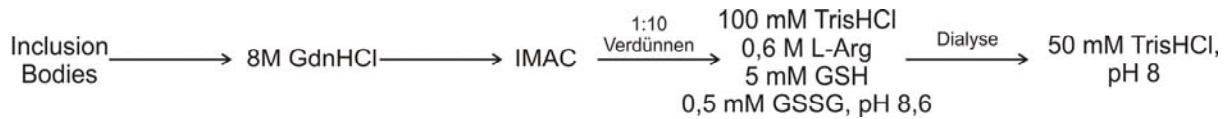


Abb. 29: Fließschema der Rückfaltung des Split-intein Konstruktes

Das so gefaltene PrP Split-Intein Fusionsprotein wurden im Folgenden zur Darstellung von rPrP^{Palm} mittels *trans*-Spleißen verwendet. Zur Erhöhung der Effizienz des Prozesses ist eine Addition von reduzierenden Agenzien wie MesNa, DTT oder TCEP in geringen Konzentrationen (5-10 mM) notwendig. Dabei erwies sich MesNa in Konzentrationen von 5 mM als effektivstes Agenz. Der Verzicht auf Chaotrope im Spleißen Ansatz bewirkt eine Beschleunigung der Reaktion um ein vierfaches ohne Verluste an Ausbeute (50-90 %) verglichen mit dem Ansatz in 4 M Harnstoff. Das Chaotrop bewirkt vermutlich eine Verringerung der Affinität der beiden Domänen, wodurch die ansonsten schnelle Assoziation zum limitierenden Schritt der Reaktion wird.

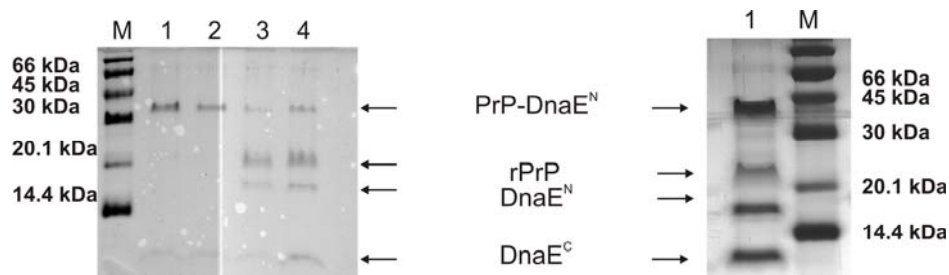


Abb. 30: *Trans*-Spleißen Ansatz von PrP-DnaE^N mit DnaE^C-4 in 4 M Harnstoff (links) oder unter chaotrop-freien Bedingungen (rechts).

In Abb. 30 sind vergleichend die Ansätze in 4 M Harnstoff (links) nach 4 Tagen und unter chaotropfreien Bedingungen nach einem Tag dargestellt. Beide Ansätze zeigen den gleichen Fortschritt der Reaktion. Neben der Beschleunigung der Reaktion haben die chaotropfreien Bedingungen ferner den Vorteil, dass es nicht zur unerwünschten Carbamylierung des Proteins kommen kann. Jedoch ist auf Grund der eingeschränkten Löslichkeit der lipidverankerten DnaE^C Varianten in wässrigen Puffern ohne solubilisierende Agenzien zur Darstellung von rPrP^{Palm} der Zusatz von Detergenzien (Abb. 31) erforderlich.

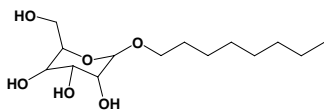
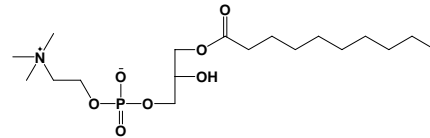
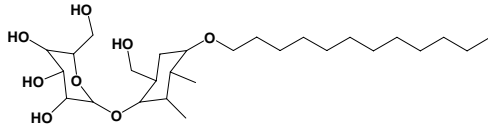
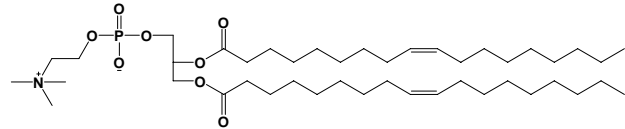
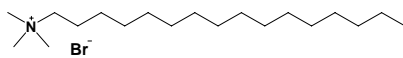
OG (n-Octyl-β-D-glucopyranosid)**DPC (Dodecylphosphocholin)****DDM (N-Dodecyl-β-D-maltosid)****DOPC (C18:1-Dioleoylphosphatidylcholin)****CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid)**

Abb. 31: Strukturformeln der getesteten Detergenzien und Lipide

Um den Einfluss des verwendeten Detergenz auf der Effizienz des Spleißens zu untersuchen, wurden zunächst verschiedene Additive mit einem nicht palmitoylierten Referenzsystem getestet, welches zu einfacheren Detektion mit NBD Fluoreszenz markiert ist¹⁰¹.

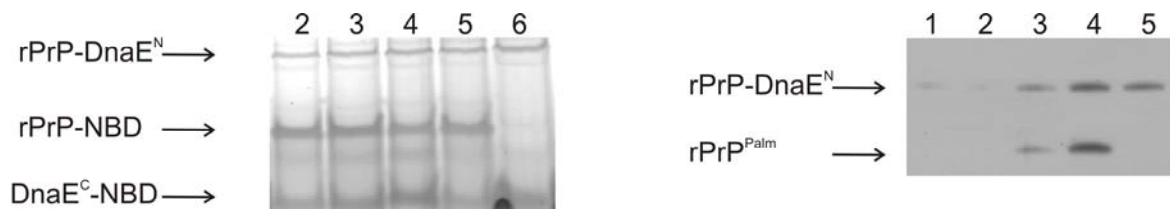


Abb. 32: Fluoreszenzscan eines SDS-Gels mit einer Anregungswellenlänge von 460 nm mit einem *trans*-Spleißen Ansatz mit DnaE^C-NBD (links) und Westernblotting eines *trans*-Spleißen Ansatzes mit DnaE^C-4. Dabei ist in Spur 1 der Ansatz ohne MesNa, Spur 2 mit 10 mM MesNa, Spur 3 mit 1 mM DDM, Spur 4 mit 20 mM OG, Spur 5 mit 2 mM CTAB und Spur 6 mit 43 mM DPC.

Dazu wird zunächst das modifizierte C-terminale Fragment DnaE^C-4 in dem detergentenhaltigen Puffer aufgenommen und dann in das 10 fache Volumen der PrP-DnaE^N-Lösung gegeben. Wie in Ab. 32 zu erkennen ist, hat der Zusatz der nicht ionischen Detergenzien DDM und OG, sowie Dodecylphosphocholin keinen Einfluss auf die entstandene Menge an Produkt. Die Verwendung des kationischen Detergenz CTAB führt jedoch zu einer vollständigen Inhibition des Prozesses. Dabei werden alle Additive oberhalb ihrer kritischen Mizellen Konzentration (CMC) zugesetzt. Zur analogen Herstellung von rPrP^{Palm} wurden die gleichen Bedingungen verwendet, jedoch ohne den Ansatz mit CTAB.

Die Analyse der Ansätze erfolgte mittels Westernblotting unter Verwendung des PrP spezifischen Antikörpers A7 (Siehe 2.3.4). Es ist zu erkennen, dass im Fall von DnaE^C-4 sowohl ohne Additive (Abb. 32 Spur 2) als auch unter Verwendung von DPC (Abb. 32 Spur 5) kein Spleißen stattfindet. Wohingegen unter Verwendung von DDM (Spur 3) und OG (Spur 4) Ausbeuten von bis zu 50% erreicht werden. Auf Grund der bekannten Sensitivität des Prion Proteins gegenüber hoher Ionenstärke¹⁰² wird in den oben beschriebenen Ansätzen auf die Zugabe von Salzen wie NaCl verzichtet, um die Wahrscheinlichkeit der Aggregation des Proteins zu verhindern. Zur Darstellung von rPrP^{Palm} mittels Protein *trans*-Spleißen *in vivo* ist jedoch die Verwendung physiologischer Pufferbedingungen notwendig. Im Folgendem ist deshalb zum einem schrittweise die Ionenstärke erhöht worden und zum andern wurde das lipidierte DnaE^C in kleine unilamelare DOPC Liposomen (DOPC SUVs) rekonstituiert (siehe Abb. 33). Da im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich SUVs verwendet wurden, werden in Folgenden die Begriffe SUV und Liposom synonym verwendet. Die Lipid-Doppelschicht der verwendeten SUV's ist der Zellmembran ähnlich. Somit lässt sich an Hand der erhaltenen Ergebnisse eine erste Abschätzung des Verhaltens des Proteins *in vivo* treffen.

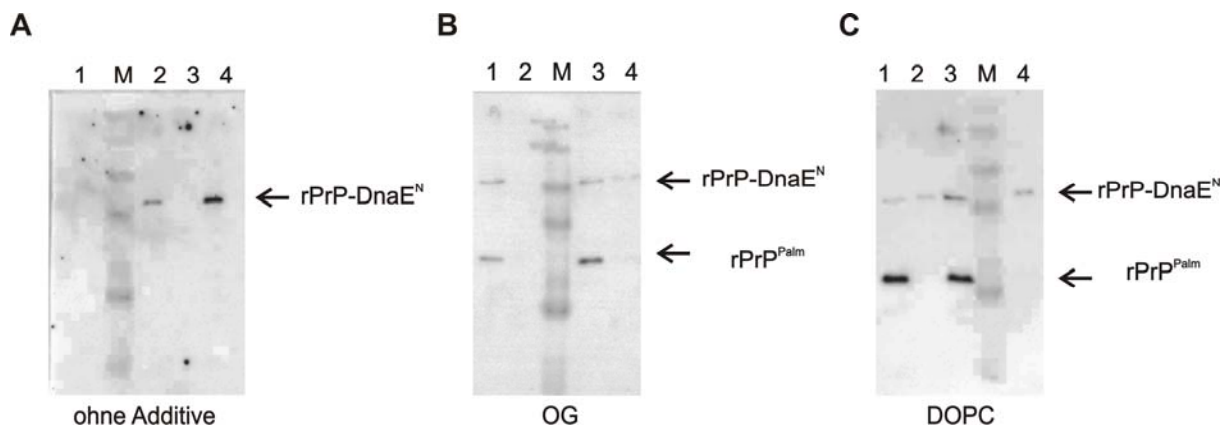


Abb. 33: Westernblotting unter Verwendung des A7 Antikörpers der *trans*-Spleißen Ansätze mit DnaE^C-4 A) Ohne Zusätze, dabei ist Spur 1 der Überstand des Ansatzes mit 50 mM NaCl, Spur 2 ist das Pellet, Spur 3 ist der Überstand mit 150 mM NaCl und Spur 4 das Pellet. B) Ansatz unter Verwendung von 20 mM OG, Auftragung analog zu A C) In DOPC Liposomen mit einer Konzentration von 2 mg/ml rekonstituierter Ansatz, Auftragung analog zu A.

Es ist zu erkennen, dass die Erhöhung der Ionenstärke durch die Zugabe von NaCl bis auf physiologische Bedingungen ($c = 150 \text{ mM}$) keinerlei Einfluss auf die Effizienz des Protein *trans*-Spleißens hat. Ferner bewirkt sowohl die Zugabe des Detergenz OG, als auch die Rekonstitution in DOPC Liposomen, dass das gebildete rPrP^{Palm} in Lösung verbleibt. Des

Weiteren konnte die Ausbeute durch die Verwendung von DOPC SUVs noch von 50 % bis auf 80-90 % gesteigert werden.

Unter Anwendung der so etablierten Methode können nun verschiedene Varianten des lipidierten murinen Prion Proteins dargestellt werden. Zur quantitativen Aufreinigung dieser, werden die Ansätze zunächst gegen GdnHCl haltigen Puffer dialysiert. Die Entfernung des nicht umgesetzten Fusionsprotein sowie des N-terminalen Fragmentes des Splitinteins DnaE^N erfolgt mittels IMAC, der letzte Schritt der Aufreinigung wird durch eine Gelfiltration (Sephadex S75) vorgenommen (siehe Abb. 34).

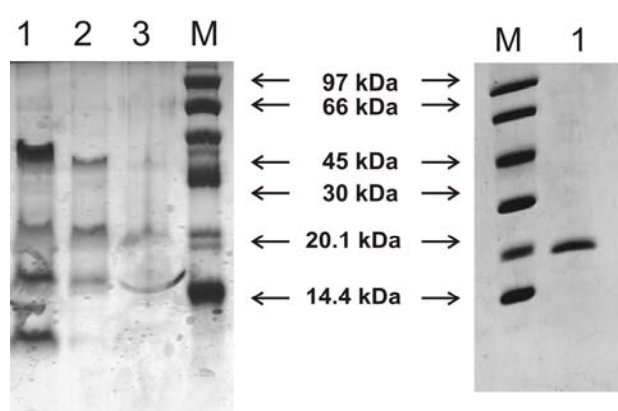


Abb. 34: SDS/PAGE (Coomassie-Färbung) eines *trans*-Spleißen Ansatzes mit DnaE^C-4 in DOPC SUVs. Spur 1 vollständiger Ansatz nach 1 Tag, Spur 2 ist der Ansatz nach Dialyse gegen 6M GdnHCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8, Spur 3 ist der Ansatz nach IMAC (linke SDS/PAGE). Spur 1 der rechten SDS/PAGE zeigt nach SEC aufgereinigtes rPrP-4. Mit M wird jeweils der Low molecular weight marker von Biorad bezeichnet.

Wie aus Abb. 34 zu entnehmen ist, lässt sich nach den beschriebenen Aufreinigungsschritten ein Protein mit dem apparenten Molekulargewicht von ~20 kDa isolieren, was mit dem berechneten MW der lipidierten PrP Varianten von ~19500 (anhängig von der Modifikation) in guter Übereinstimmung ist. Die erzielten Spleißausbeuten der einzelnen rPrP^{Palm} Varianten sind in folgender Liste ausgeführt.

rPrP Varianten	Spleißausbeuten
rPrP-1	~ 20 %
rPrP-2	~ 40-50 %
rPrP-3	~ 30-40 %
rPrP-4	~ 80-90 %

Tab. 2: Auslistung der erzielten *trans*-Spleißen Ausbeuten zur Darstellung von rPrP^{Palm} Varianten

Im Allgemeinen führte die Inkorporation eines zusätzlichen hydrophoben Restes, durch den bei den Peptiden **1** bis **3** enthaltenen Fluorophor, zu einer Verringerung der Löslichkeit des Peptids, was zu schlechteren Ausbeuten an rPrP^{Palm} führt. Im Fall von Peptid **1** ist zu

bemerken, dass hier lediglich zwei PEG Einheiten zur Erhöhung der Löslichkeit vorhanden sind. Diese reichen nicht aus, um eine ausreichende Zugänglichkeit des DnaEC-1 in wässrigen Puffern zu gewährleisten. Die besten Ausbeuten wurden unter Verwendung von Peptid **4** erzielt, welches nur über die Lipidmodifikation und nicht über einen zusätzlichen Fluorophor verfügt. Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse wurden unter Verwendung dieser Variante erzielt.

3.1.2.3 Faltung des rekombinanten PrP

Zur Faltung des rekombinanten murinen Prion Proteins wird das Protein zunächst in 6 M GdnHCl, 50 mM TrisHCl, pH 8 vollständig denaturiert. Durch den Zusatz von GSH/GSSG sollte die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken gewährleistet werden, welche für die Faltung des Prion Proteins in eine α -helikale Form benötigt wird¹⁰³. Zur Ausbildung der nativen Struktur wird das Chaotrop schnell mittels Gelfiltration (Sephadex G25) in 20 mM NaOAc, pH 5,5 entfernt. Die rapide Ausdünnung der denaturierenden Agenzien ist notwendig, da bei langsamen Methoden wie der Dialyse partiell ungefaltete Intermediate entstehen, welche zur Fehlfaltung und damit verbunden zur Aggregation des Proteins führen⁹⁰. Die korrekte Faltung des unmodifizierten rPrP wird zuerst mittels Zirculardichroismus (CD)-Spektroskopie überprüft.

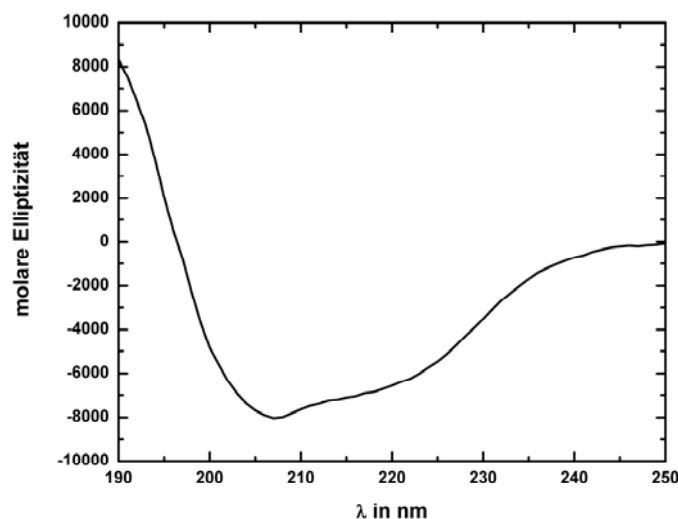


Abb. 35: CD-Spektrum des zurückgefalteten rPrP ($c = 0,2$ mg/ml) in 20 mM NaOAc, pH 5,5

Das CD-Spektrum zeigt zwei Minima bei 222 nm und bei 208 nm. Dies ist charakteristisch für α -helikale Strukturen. In seiner nativen Form weist PrP einen α -helikalen Anteil von 43

%. Unter Verwendung der Jasco Software konnte wurde der α -helikale Anteil des aufgenommenen Spektrums ebenfalls zu ca. 45 % bestimmt. Diese ersten Ergebnisse lieferten gute Hinweise darauf, dass rPrP durch die beschriebene Methode korrekt gefaltet werden kann.

Weitere Analysen der genauen Faltung des Proteins wurden mittels NMR-Spektroskopie vorgenommen. Dazu wurde das Protein mit dem Isotop ^{15}N während der Expression durch Zugabe von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ zum synthetischen Medium uniform markiert. Zur Strukturaufklärung werden $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Experimente bei 30°C durchgeführt ²⁵. Über die Dauer von 2 Tagen blieb das Protein bei einer Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ stabil. Die hochfeldverschobenen ^1H -Resonanzen (7,7-8ppm) deuten analog zum CD-Spektrum ebenfalls auf eine überwiegend α -helikale Struktur and somit auf die native Faltung des Proteins hin. Im Vergleich zu bereits veröffentlichten Spektren (Abb. 36 B) des murinen Prion Protein in seiner nativen Struktur sind keine signifikanten Änderungen in der Lage der einzelnen Signale der Aminosäuren zu erkennen ²⁶.

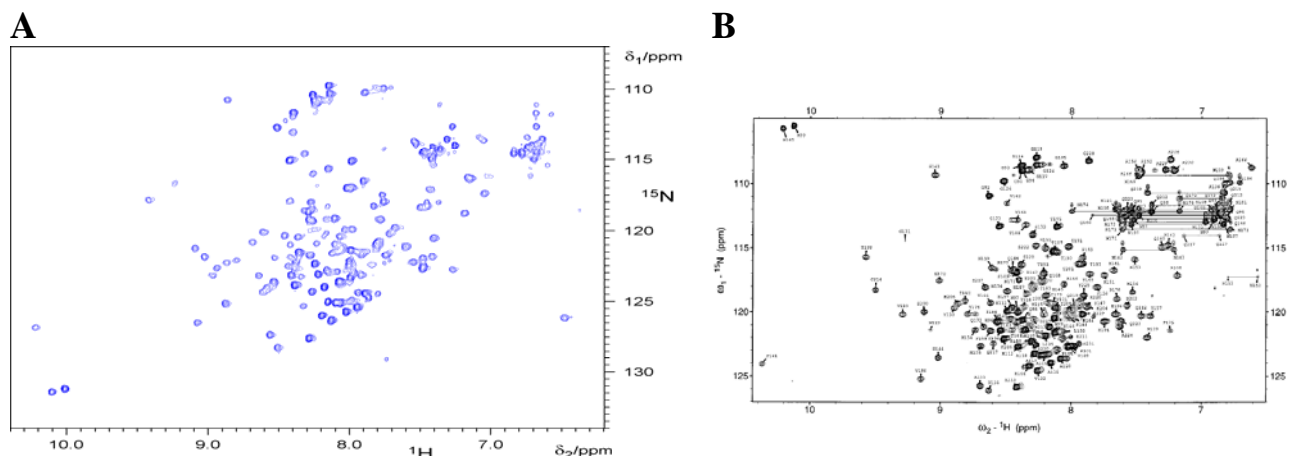


Abb. 36: $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des gefalteten rPrP mit einer Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ in $20\ \text{mM}$ NaOAc, pH 5,5 mit einem Zusatz von 10 % (v/v) D_2O (A). Literatur $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum des SHaPrP ²⁶ (B).

Die Rückfaltung von $\text{rPrP}^{\text{Palm}}$ erfordert den Einsatz von Detergenzien. Eine Einführung von zwei Palmitoylresten in das Protein wirkt, dass sich dessen Tendenz zur Aggregation in detergenz- bzw. lipidfreier Umgebung erhöht. Zur Untersuchung von $\text{rPrP}^{\text{Palm}}$ in seiner löslichen Form ist eine Stabilisierung des Proteins nötig. Diese wird im vorliegenden Fall durch die Rekonstitution in DOPC Liposomen erreicht. Die Assoziation von $\text{rPrP}^{\text{Palm}}$ mit der Lipid Doppelschicht der Liposomen entspricht ferner eher der natürlichen Zellmembran als Detergenzmizellen. Die Pufferbedingungen wurden ansonsten ähnlich zu denen des

unmodifizierten Proteins verwendet, mit dem Unterschied, dass dem NaOAc-Puffer 20 mM das Detergenz OG zugesetzt wurde. Zur anschließenden Entfernung des Detergenz wird das Protein 1 zu 10 in 2 mg/ml DOPC Liposomen in 20 mM NaOAc, pH 5,5 verdünnt. Die resultierende OG Konzentration von 2 mM lag unterhalb der angegebenen CMC und ermöglichte somit eine quantitative Entfernung des Detergenz durch Dialyse gegen Detergenz adsorbierende Partikel (BioBeads, Biorad). Das in SUV's rekonstituierte membranassoziierte PrP wird CD-spektroskopisch untersucht.

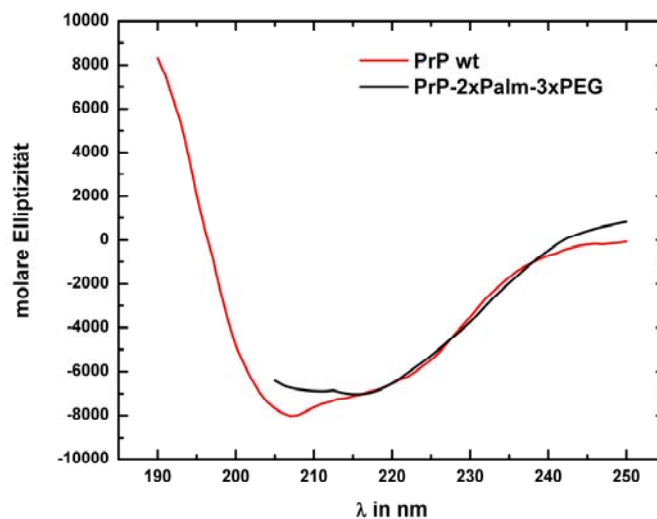


Abb. 37: CD-Spektrum des gefalteten nicht modifizierten rPrP (rote Linie) und des lipidierten rPrP in DOPC Liposomen (schwarze Linie) in 20 mM NaOAc, pH 5,5.

Durch die erhöhte Dispersität der verwendeten Liposomen Lösung ist die Messung der molaren Elliptizität lediglich in einem Wellenlängenbereich von 205 bis 250 nm möglich. Bei niedrigen Wellenlängen führen, durch die Liposomen verursachte, Streueffekte des eingestrahlten Lichtes zu einer Sättigung des Detektors. Es ist zu erkennen, dass auch rPrP^{Palm} eine überwiegend α -helikale Struktur aufweist und somit ebenfalls in seiner nativen zellulären Form vorliegt. Die Aufnahme von NMR-Spektren war auf Grund der eingeschränkten Stabilität des Proteins in für NMR Spektroskopie erforderlichen Konzentrationen von $\sim 100 \mu\text{M}$ in Liposomen freier Umgebung nicht möglich und führte die Präzipitation von rPrP^{Palm}. Eine Möglichkeit zur Überwindung dieses Problems ist die Verwendung von Festkörper NMR. Dabei könnten in Liposomen rekonstituierte Proben, welche durch Ultrazentrifugation pelletiert werden, verwendet werden.

3.1.2.4 Aggregation der Prion Protein Varianten

Ein essentieller Prozess in der Pathogenese der Prionen Erkrankungen ist die Umfaltung des α -helikalen zellulären PrP^C in seine infektiöse Form PrP^{Sc}. Diese fehlgefalteten Proteine weisen einen hohen Anteil an β -Faltblatt auf und bilden fibrilläre Strukturen, welche eine erhöhte Resistenz gegenüber proteolytischem Verdau mit Proteinase K aufweisen. Die Generierung solcher amyloiden Strukturen aus rekombinanten Prionen *in vitro* wird durch Inkubation der Proteine in leicht denaturierenden Bedingungen erreicht. Die dabei gebildeten Strukturen sind jedoch im Gegensatz zum PrP^{Sc} kaum bis gar nicht infektiös. Für den Mechanismus der Umfaltung geht man im allgemeinen von der Bildung eines partiell entfalteten Intermediates aus, welches zunächst lösliche Oligomere bildet, die im Folgendem zu Fibrillen assemblieren ⁴².

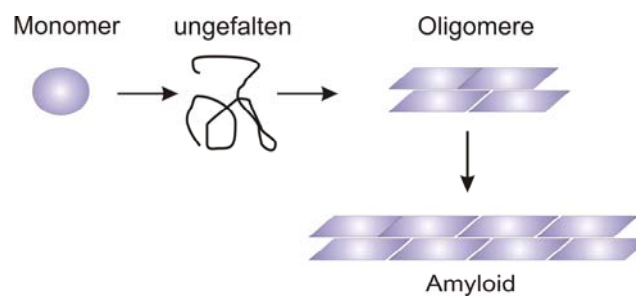


Abb. 38: Postulierter Mechanismus der induzierten Fibrillogenese *in vitro*

Zur Fibrillogenese des im Rahmen dieser Arbeit dargestellten murinen Prion Proteins wird, wie bereits beschrieben eine Konzentration von 30-50 μ M des Proteins in 3 M Harnstoff, 1 M GdnHCl, 150 mM NaCl, 20 mM NaPi bei pH 6,8 eingestellt ⁹⁰. Diese Lösung wird bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln bei 600 rpm für 1 bis 3 Tage inkubiert.

Der Nachweis der Bildung amyloider Strukturen erfolgt durch zwei unterschiedliche Methoden. Zum einen werden während der Umfaltungsreaktion Proben entnommen und diese mit einem Molekül Proteinase K zu 50 Molekülen PrP umgesetzt. Die Entstehung von PK-resistenten Partikeln ist ein Indiz für die Formation von Fibrillen. Die Zusammenlagerung β -Faltblatt reicher Strukturen führt dazu, dass die Protease keinen Zugang mehr zu den internen Bereichen der Fibrillen hat. Zur Detektion dieser amyloiden Strukturen existieren Farbstoffe welche durch eine spezifische Interaktion ihre Eigenschaften verändern. Der am häufigsten in der Diagnostik von Amyloidosen verwendete Farbstoff ist das Thioflavin T (ThT).

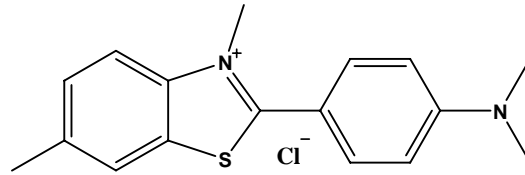


Abb. 39: Strukturformel von Thioflavin T (ThT)

Dabei assoziiert ThT schnell mit Fibrillen, was dazu führt, dass sich das Maximum des Excitationsspektrums bathochrom auf 450 nm und das Emissionsspektrum auf 482 nm verschiebt. Im Gegensatz dazu liegen die Werte für den freien Farbstoff bei 385 nm (ex) bzw. 445 nm (em) ¹⁰⁴. An Hand dieser beiden etablierten Methoden wurde im Folgenden die Fibrillogenease der rPrP Varianten untersucht.

Die entsprechenden Aggregationsversuche wurden zunächst mit dem unmodifizierten rekombinanten PrP durchgeführt.

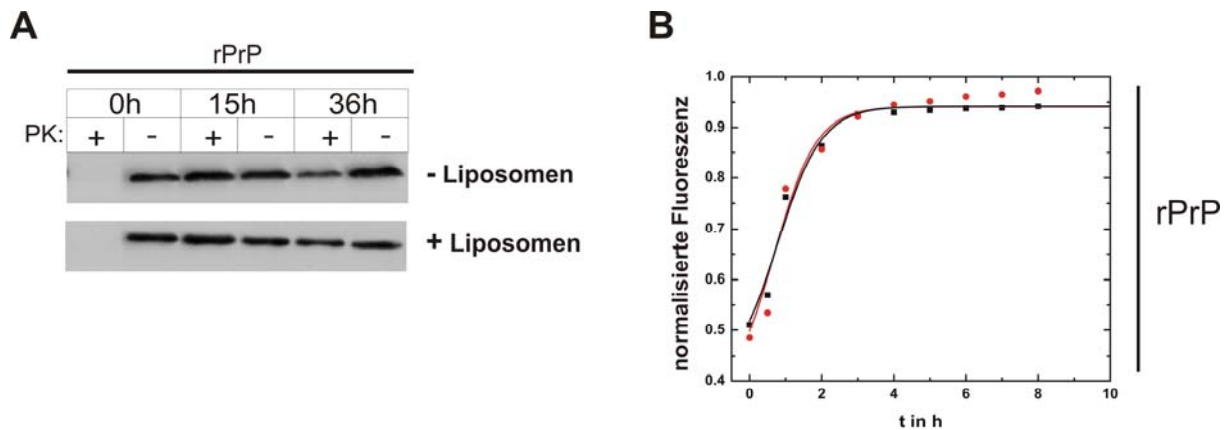


Abb. 40: A) Westernblotting Analyse der Proteinase K Resistenz nach Inkubation von rPrP mit 3 M Harnstoff, 1 M Gdn-HCl, 150 mM NaCl, 20 mM NaPi, pH 6,8 bei 37 °C zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Dabei wurde die Reaktion sowohl mit als auch ohne Zusatz von DOPC-Liposomen durchgeführt.

B) Thioflavin T Assay der analog durchgeführten Reaktion. Die schwarze Linie stellt das Aggregationsverhalten ohne DOPC SUVs dar, die rote Linie in Gegenwart von DOPC.

Da die lipidierten rPrP Varianten durch ihre Modifikation sehr hydrophob sind, müssen diese Reste in wässrigen Puffern durch den Zusatz von Detergenzien maskiert werden. Aus diesem Grund musste zunächst überprüft werden, ob das unmodifizierte PrP eine unspezifische Interaktion mit den verwendeten Vesikeln eingeht und somit eine lipidinduzierte Veränderung des Aggregationsverhaltens zu beobachten ist. Zur Ermittlung des Einflusses von DOPC Liposomen wird die Fibrillogenease sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von

Liposomen durchgeführt. Der Gehalt an PK resistentem Material wird direkt nach Beginn der Konversionsreaktion sowie nach 15 h und nach 36 h bestimmt. Bereits nach 15 h lässt sich der Großteil des eingesetzten Proteins nicht mehr proteolytisch abbauen. Dabei ist bei dem unmodifizierten PrP kein Unterschied zwischen den Ansätzen mit oder ohne Liposomen zu erkennen. Zur Aufnahme der Kinetik dieser Konversionsreaktion wurde der bereits beschriebene ThT Assay verwendet. Als Anregungswellenlänge wurde dabei Licht mit 445 nm verwendet. Die Emission wurde in dem Wellenlängenbereich von 460 bis 510 nm detektiert. Anschließend erfolgte die Auftragung der jeweiligen Maxima gegen Zeit. Die daraus resultierende Kinetik der Fibrillogenese ist in Abb. 40 B dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Ausbildung amyloider Strukturen in dem verwendeten Konzentrationsbereich bereits nach 1 h einsetzt und nach 4 h abgeschlossen ist. Ferner unterscheiden sich die Kinetik in Anwesenheit von Liposomen (schwarze Line) nicht von der in Gegenwart von DOPC SUV's (rote Linie). Somit kann ausgeschlossen werden, dass das murine PrP durch eine Lipidinteraktion bereits amyloide Strukturen bildet. Der analoge Versuch wurde im folgendem mit den lipidierten PrP Varianten durchgeführt (siehe Abb. 41).

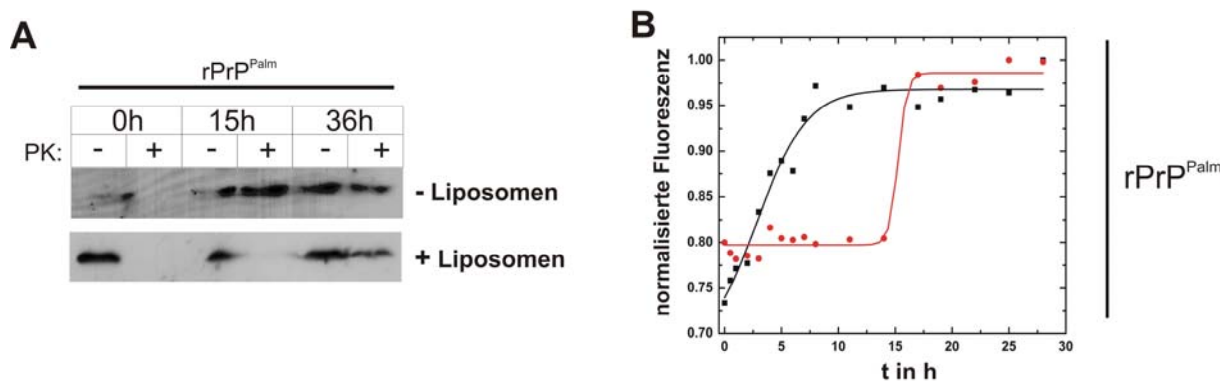


Abb. 41: A) Westernblotting Analyse der Proteinase K Resistenz nach Inkubation von rPrP^{Palm} mit 3 M Harnstoff, 1 M Gdn-HCl, 150 mM NaCl, 20 mM NaPi, pH 6,8 bei 37 °C zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Dabei wurde die Reaktion sowohl mit als auch ohne Zusatz von DOPC-Liposomen durchgeführt. B) Thioflavin T-Assay der analog durchgeführten Reaktion. Die schwarze Linie stellt das Aggregationsverhalten ohne DOPC SUVs dar, die rote Linie in Gegenwart von DOPC.

Dazu wurden ebenfalls Proben nach 15 h und 36 h aus der Konversionsreaktion entnommen und hinsichtlich der Bildung von Proteinase K resistentem Material untersucht. Im Gegensatz zu den unmodifizierten Varianten unterscheidet sich das Verhalten der Proteine im Bezug auf den Zusatz von Liposomen. In Abwesenheit dieser war analog zu dem unmodifizierten Prion Protein bereits nach 15 h eine quantitative Ausbildung von proteolytisch nicht abbaubaren

Aggregaten zu detektieren. Die Zugabe von DOPC Liposomen während der Reaktion hingegen hat eine Verzögerung der Fibrillogenese zur Folge. So wies die nach 15 h entnommene Probe noch keinerlei PK-resistentes Material auf, erst nach 36 h wiesen ~ 50 % (siehe Abb. 41 A) des eingesetzten Proteins eine Resistenz gegenüber Proteinase K auf. Dieses Ergebnis sollte nun mit Hilfe des ThT Assays verifiziert werden. Die Konversion in Abwesenheit von Liposomen begann ebenfalls nach 1 h, verlief im Vergleich zu dem unmodifizierten Protein jedoch langsamer und erreicht ihr Plateau nach 10 h. Die Addition unilamellarer Vesikel hat eine ausgeprägte Verzögerung der Aggregation zur Folge. Die Lag-Phase bis zum Beginn der Fibrillogenese beträgt 15 h im Gegensatz von 1 h in Abwesenheit von Liposomen. Auch hier zeigte sich, dass die Zugabe der Liposomen einen direkten Einfluss auf das Aggregationsverhalten der lipidierten Prion-Proteine hat. Auf Grund des unterschiedlichen Aggregationsverhaltens von rPrP und rPrP^{Palm} ist zu vermuten, dass sich die gebildeten Strukturen auch in ihrer Morphologie differenzieren. Dazu wurden die erhaltenen Aggregate mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM) in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Winter an der Universität Dortmund untersucht.

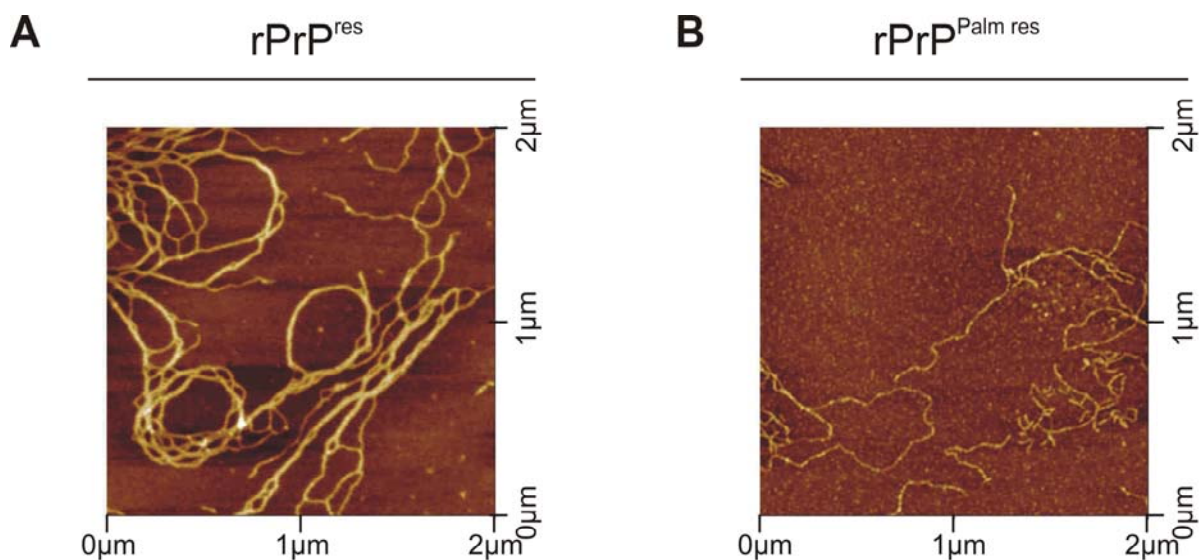


Abb. 42: AFM Aufnahmen der PrP-Fibrillen, A) Probe des nicht modifizierten rPrP, B) Probe des lipidierten rPrP^{Palm}

Zur Analyse des aggregierten PrPs wurden die Proben aus dem chaotrophhaltigen Umfaltungspuffer im Verhältnis 1 zu 100 gegen 20 mM NaOAc, pH 5,5 mit 2 mM NaN₃ dialysiert. Dies ist erforderlich, da das Trocknen der Probe unter Hochsalzbedingungen für die AFM Vorbereitung zur Kristallisation der Salze führen würde und somit eine Verfälschung des Ergebnisses zur Folge hätte. Die Fibrillen des unmodifizierten Proteins wiesen eine Höhe von 1,5 -2,5 nm auf. Ferner befinden sich in der Probe lediglich geringe Mengen an nicht

fibrillären Aggregaten. Im Gegensatz dazu liegt die detektierte Höhe der Fibrillen des palmitoylierten Proteins lediglich bei 1 – 1,5 nm. Ferner sind eine Vielzahl von kleinen Partikeln mit einer Höhe von ~ 0,5 nm zu detektieren, bei denen es sich vermutlich um kleine nicht amyloide Aggregate handelt.

3.1.2.5 Insertion des lipidierten Prion Proteins in Membranen

Die Verankerung des Prion Proteins an der Außenseite der Plasmamembran ist entscheidend bei Entwicklung von TSEs in Säugetieren. Im Mausmodell wurden bereits PrP Varianten untersucht, die auf Grund des fehlenden C-terminalen Signalpeptids, unvollständig prozessiert wurden und nicht über einen GPI Anker verfügten. Im Nervengewebe dieser Mäuse bildeten sich zwar PrP Aggregate, jedoch blieben die typischen klinischen Symptome einer Prionen Erkrankung aus³⁰. Zur Nachahmung des natürlichen biologischen Systems ist demnach eine stabile Membraninsertion des rPrP^{Palm} erforderlich. Die Stabilität der Verankerung wurde zunächst über einen Sucrose-Gradienten bestimmt. Dazu wurde ein kontinuierlicher Gradient von 5 bis 20 % Sucrose in 20 mM NaOAc, pH 5,5 erstellt. Unmodifiziertes, sowie lipidiertes PrP wurden gleichermaßen, wie bereits beschrieben, in DOPC Vesikel rekonstituiert. Um abermals eine unspezifische Wechselwirkung des Proteins mit der Lipid-Doppelschicht auszuschließen, wurde die Sequenz des C-terminal lipidierten Peptids so gewählt, dass eine gezielte Entfernung der beiden Palmitoylketten durch Inkubation mit TEV-Protease ermöglicht wird (Siehe Abschnitt 3.1.1.2). Dazu wurde das in Liposomen rekonstituierte rPrP^{Palm} für 6 h bei RT mit TEV-Protease zur Entfernung der Lipidierung inkubiert. Der Gradient wurde mit diesen drei Protein Proben und einer unbehandelten DOPC Liposomen Präparation überschichtet und anschließend über Nacht bei 100000 x g zentrifugiert.

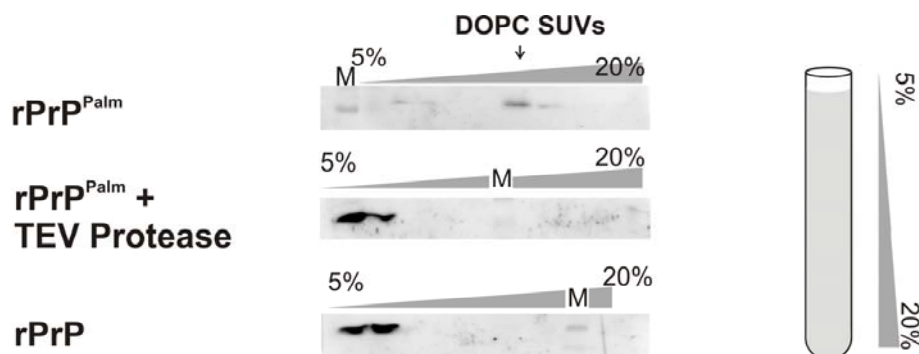


Abb. 43: Westernblotting Analyse des Sucrose-Gradienten mit dem rPrP spezifischen Antikörper A7

Anschließend wurde der Gradient mittels Westernblotting analysiert. Die Lokalisation der SUVs innerhalb des Gradienten wurde durch dynamische Lichtstreuung (DLS) bestimmt. Dabei befand sich der Großteil der Vesikel in den Fraktionen mit ~15 % Sucrose. Die Analyse der PrP-Proben ergab, dass rPrP^{Pal} im Gradienten mit den Liposomen kolokalisieren und sich ebenfalls bei ~15 % Sucrose befinden. Das unmodifizierte Protein migrierte nicht in den Gradienten sondern verblieb bei 5 % Sucrose. Die mit TEV-Protease behandelte Probe wies das gleiche Migrationsverhalten auf wie das nicht verankerte PrP, somit ist eine unspezifische Interaktion durch das murine Prion Protein mit den DOPC Liposomen auszuschließen. Ferner zeigt der Gradient, dass die zweifache Palmitoylierung des Proteins eine quantitative Assoziation des Proteins an die Lipid-Doppelschicht bewirkt.

Eine Möglichkeit der kinetischen Auflösung der Anbindung von rPrP^{Pal} bietet die Infrarot Spektroskopie (FT-IR) unter Verwendung der Attenuated Total Reflectance (ATR)-Technik. Bei dieser FT-IR Variante wird das IR-Licht in einem bestimmten Winkel in einen Kristall eingestrahlt. Dieser Strahl wird auf der Innenseite des Kristalls total reflektiert, was zur Erzeugung einer evaneszenten Welle führt. Diese dringt üblicherweise einige μm in die an der Oberfläche des Kristalls immobilisierte Probe ein¹⁰⁵.

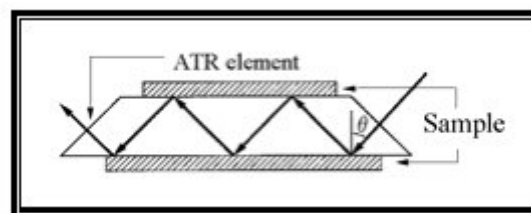


Abb. 44: Schematische Darstellung einer ATR-Zelle¹⁰⁵.

Die folgenden ATR-Studien wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Gerwert an der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt. Zur Anbindungsanalyse wurde ein Ge-Kristall verwendet, dessen Oberfläche durch die Behandlung mit konz. H_2SO_4 zunächst hydrophil gemacht wurde. Über diesen Kristall wurde dann eine frische DOPC-Liposomen Präparation in D_2O geleitet. Die Detektion Lipidanbindung erfolgte über die C-H-Streckschwingung bei 2924 cm^{-1} . Sobald eine Absättigung des Signals beobachtet wurde, wurden die Proteinproben über den Kristall geleitet und die Anbindung über die Zunahme der Amid I-Bande bei 1642 cm^{-1} detektiert.

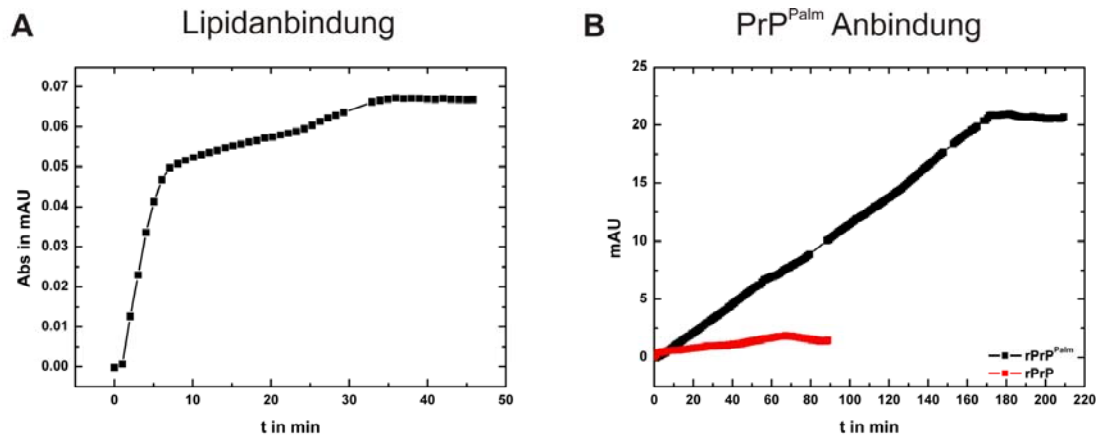


Abb. 45: A) Kinetik der Lipidanbindung unter Verwendung von DOPC SUVs in 20 mM NaOAc in D₂O, pD 5; B) Kinetik der Insertion in die Lipid-Doppelschicht von rPrP (rote Linie) und rPrP^{Palm} (schwarze Linie)

Es ist in Abb. 45 A zu erkennen, dass die Ausbildung einer Lipid-Doppelschicht auf dem Ge-Kristall unter Verwendung von 0,5 mg/ml DOPC SUVs in D₂O bereits nach 10 min ihre Sättigung erreicht. Nachdem die Lipidschicht mit Puffer (20 mM NaOAc in D₂O) gewaschen wurde, wurden 50 µg rPrP^{Palm} in 1 ml Puffer über den beschichteten Kristall zirkuliert. Die Zunahme der Amid I Bande wurde über die Zeit verfolgt. Diese beruht ausschließlich auf der Assoziation von rPrP^{Palm} mit der immobilisierten Lipid-Doppelschicht, da die Reichweite der evaneszenten IR-Welle lediglich auf die Oberfläche des Kristalls begrenzt ist. Hier ist ein linearer Anstieg des Signal zu verzeichnen, welches nach ~ 3 h in seine Sättigung übergeht. Im Vergleich dazu wurde nicht modifiziertes rPrP in gleichen Konzentrationen über den mit DOPC beschichteten Kristall geleitet. Dort ist über den beobachteten Zeitraum keine Zunahme des Amid I Signals zu verzeichnen. Somit ist die Zunahme der Amid I Signals für rPrP^{Palm} auf eine spezifische Assoziation des Proteins, auf Grund seiner Palmitoylmodifikation, mit der DOPC-Doppelschicht auf dem Ge-Kristall zurückzuführen.

3.1.2.6 Zelluläre Aufnahme

Die Untersuchungen der Lipidassoziation des palmitoylierten Prion Proteins über den Sucrose-Gradienten zeigten bereits eine starke Interaktion von rPrP^{Palm} mit den verwendeten DOPC Liposomen. Ob diese Verankerung jedoch ebenfalls *in vivo* zu einer effektiven Insertion in die Membranen lebender Zellen führt, musste ebenfalls gezeigt werden. Zu diesem Zweck wurden murine Neuroblastomzellen (N2a) mit einer Suspension von 0,01 mg/ml rPrP^{Palm} und Liposomen in PBS inkubiert. Als Kontrolle wurden die analogen Experimente mit nicht modifizierten Prion Protein durchgeführt. Dabei unterschied sich die Effizienz mit der rPrP^{Palm} in die Membran insertiert wurde in Abhängigkeit von den verwendeten Liposomen. Unter Verwendung von Detergenzien wie OG und DDM konnte keinerlei Transfer des Proteins nach Extraktion mit Triton X-100 und DOC, welche membranassoziierte Proteine solubilisieren, in die Zellmembran detektiert werden. Ferner führte der Einsatz von diesen Substanzen zu einer eingeschränkten Lebensfähigkeit der N2a-Zellen von maximal 1 bis 4 h. Die Inkubation der Zellen mit in reinen DOPC-Liposomen rekonstituierten rPrP^{Palm} führte ebenfalls nicht zur Insertion des Proteins. Zur Gewährleistung eines effektiven Transfers, mussten Agenzien gefunden werden, welche den Transfer auf die Zellmembran begünstigen ohne dabei die Überlebensfähigkeit der Zellen einzuschränken. Um das zu erreichen, wurde im Folgenden das kationische Liposomen bildende Transfektions Reagenz Pro-Ject (Pierce) verwendet, welches auf Grund von elektrostatischen Interaktionen eine Fusion mit der Zellmembran begünstigt. Die murinen Neuroblastomzellen wurden dazu in PBS für 2 bzw. 5 h mit 0,01 mg/ml von palmitoylierten und nicht modifizierten rPrP bei 37°C in Petrischalen mit dem Transfektionsagenz inkubiert. Zur Westernblotting Analyse wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen anschließend geerntet und in PBS mit 0,5% Triton X-100 und 0,5% DOC lysiert. Die Verwendung dieses Detergenzgemisches ermöglicht die Unterscheidung zwischen aggregiertem Material und membranverankertem, da es eine gezielte Extraktion der Membranfraktion ermöglicht und endogenes PrP^C effizient solubilisiert. Das erhaltene Zelllysat wurde durch Zentrifugation in unlösliche Bestandteile und das solubilierte Material sowie Membranbestandteile fraktioniert. Zur Analyse der erhaltenen Bestandteile wurde der monoklonale Antikörper 3F4 verwendet, welcher spezifisch mit dem hinzugefügten murinen PrP wechselwirkt und keinerlei Kreuzreaktion mit endogenem PrP aufweist. Wie in Abb. 46 zu erkennen ist, ist kein rPrP im Überstand zu finden, sondern ausschließlich in der in Detergenz unlöslichen Fraktion. Dieses Ergebnis

deutet auf eine schnelle Aggregation des rPrP nach Zugabe zu den Zellen in PBS und Pro-Ject hin.

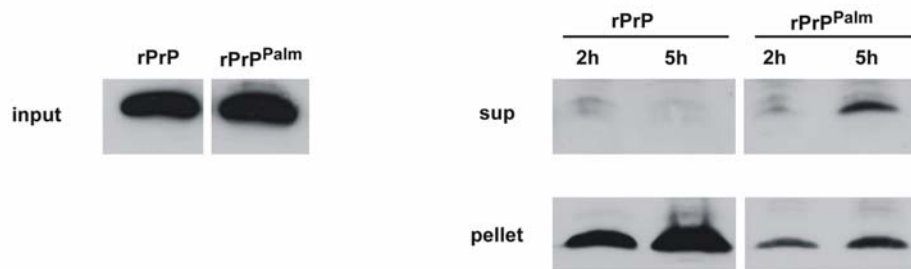


Abb. 46: Westernblotting Analyse der zellulären Aufnahme der rPrP Varianten. Links ist die Ausgangslösung der beiden Proteine dargestellt um identische Konzentrationen zu gewährleisten. Die Zellen wurden nach 2 bzw. 5 stündiger Inkubation lysiert und die lösliche Membranfraktion (sup) von aggregiertem Material (Pellet) getrennt. Die TCA Fällung der Proben wurde mittels SDS/PAGE analysiert.

Im Gegensatz dazu zeigt sich für rPrP^{Palm} eine Zunahme des löslichen Anteils über die Zeit. Nach einer Inkubationszeit von 5 h befanden sich ca. 50 % des Proteins in der solubilisierten Membranfraktion. Dies deutet darauf hin, dass rPrP^{Palm} unter den verwendeten Bedingungen löslich blieb und sich in die Membran der N2a-Zellen inserierte. Für das GPI-verankerte PrP^C wird vermutet, dass es in cholesterol-reiche strukturierte Mikrodomänen der Zellmembran segregiert. Da diese Lokalisation für den Umfaltungsprozess während der Pathogenese der TSEs entscheidenden Einfluss zu haben scheint, wurde überprüft, ob die beiden Palmitoylreste eine ähnliche Lokalisation des Proteins bewirken. Zu diesem Zweck wurden die wie zuvor beschrieben transfizierten N2a-Zellen mit kaltem Triton X-100 MES-Puffer lysiert. Das entstandene Präzipitat über einen Zentrifugationsschritt abgetrennt und die solubilisierten Bestandteile über einen Sucrose-Gradienten analysiert.

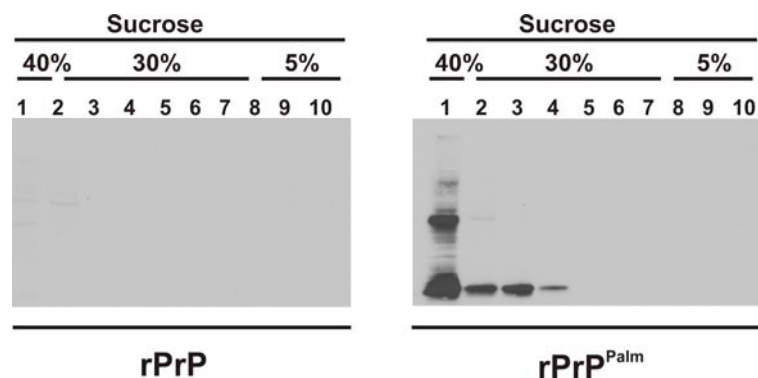


Abb. 47: Westernblotting Analyse des Sucrose Stufen Gradienten

Das nicht modifizierte rPrP wurde im Rahmen dieses Assays bereits im low spin Schritt abgetrennt und geht damit nicht in die Flotationsuntersuchungen mit ein, wohingegen rPrP^{Palm} in die ersten vier Fraktionen mit einem Sucrose Gehalt von 40-30 % migriert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die beiden Palmitoylreste eine andere Lokalisation des Proteins in der Zellmembran im Vergleich zu endogenem PrP, welches zu 5 % Sucrose migriert, bewirkt. Ferner wurden im Rahmen dieser Arbeit Immunfluoreszenz Experimente durchgeführt, die weiteren Aufschluss über die Lokalisation der transfizierten rPrP Varianten bringen sollten. Dazu wurden die murinen Neuroblastomzellen auf Objektträgern kultiviert und wie zuvor bereits beschrieben mit den Proteinen inkubiert. Nach anschließender Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd und Permeabilisierung mit 0,2 % Triton X-100, wurden sie zunächst mit den 3F4 Antikörper inkubiert. Die Detektion wurde mittels Immunfluoreszenz über einen mit Cy3 (ex.: 550 nm, em.: 570 nm) markierten sekundären Antikörper vorgenommen.

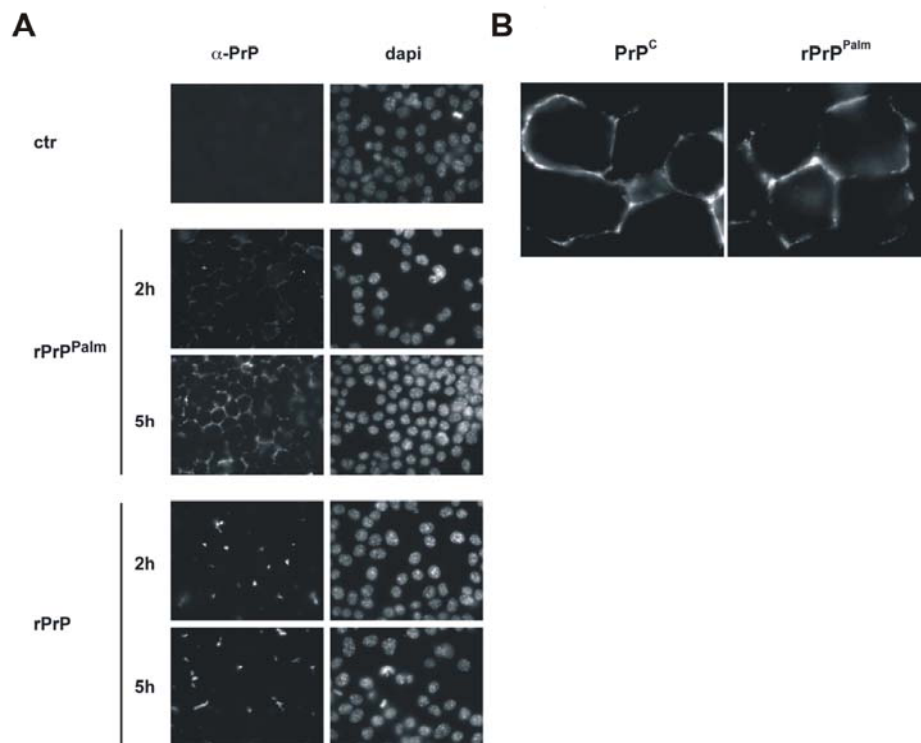


Abb. 48: Immunfluoreszenzuntersuchung der inkubierten N2a-Zellen. Die Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert, anschließend fixiert und permeabilisiert. Das rekombinante Prion Protein wurde durch Inkubation mit dem 3F4 Antikörper detektiert.

Nach Inkubation der Zellen mit rPrP^{Palm} sind nach 5 h (siehe Abb. 48 A) die Zellgrenzen klar zu erkennen. Dies deutet somit ebenfalls auf eine Insertion des rPrP^{Palm} in die Plasmamembran hin. Bei der Immunfluoreszenzaufnahme des analogen Versuchs mit nicht modifizierten rPrP waren kleine helle Punkte zu detektieren, bei denen es sich vermutlich um

aggregiertes Material handelt. Anders als bei rPrP^{Palm} ist keine weitere Zunahme der Signale von 2 h nach 5 h Stunden Inkubationszeit zu beobachten. Eine schnelle Aggregation unter den verwendeten Pufferbedingungen des rPrP war bereits bei der Westernblotting Analyse beobachtet worden. Die rechten Bilder in Abb. 48 A zeigen die Dapi Färbung des Zellkerns der im linken Bild dargestellten Zellen und belegen somit, dass die Zellen auf Grund der Inkubation mit rPrP^{Palm}/rPrP und Pro-Ject nicht geschädigt worden sind. Ferner wurden als Kontrolle nicht transfizierte N2a-Zellen aufgenommen um zu zeigen, dass mit den verwendeten Antikörpern kein endogenes PrP^C visualisiert werden kann. In Abb. 48 B ist rechts zunächst ein hochauflösendes Bild der mit rPrP^{Palm} inkubierten N2a-Zellen zu sehen. Die auf der linken Seite dargestellten Zellen wurden transient mit DNA, welche PrP^C mit dem 3F4 Epitop kodiert und zu vollständig prozessiertem PrP^C führt, transfiziert. Der Vergleich ergibt dasselbe Lokalisationsverhalten des semisynthetisch dargestellten lipidierten Prion Proteins und das zellulären GPI-verankerten PrP^C.

3.2 Protein Immobilisierung auf lipidierten SiO_x-Nanopartikeln

Die Assoziation einer Vielzahl zellulärer Proteine mit Zellmembranen wird durch deren posttranslationale Lipidierung erreicht. Typische Lipidierungsmuster sind dabei der bereits beschriebene GPI Anker, aber auch Palmitoylthioester sowie GeranylGeranyl- und Farnesylierung von Cysteinresten. Diese unterschiedlichen Modifikationen führen neben der stabilen Verankerung dieser Proteine in Membranen auch zu bestimmten Präferenzen der Proteine in verschiedene Bereiche der Membranen innerhalb der Zelle zu segregieren. Die im Folgenden beschriebene Methode der Immobilisierung lipidierte Proteine auf Nanopartikeln basiert auf dem bereits beschriebenen Prozess des Protein *trans*-Spleißens. Dabei wird wie in Abb. 49 ersichtlich, dass zunächst das C-terminale Inteinsegment auf den zuvor lipidierten Partikeln verankert und anschließend das Fusionsprotein mit dem N-terminalen Segment hinzugefügt wird. Dies führt schließlich zur Immobilisierung des Proteins auf der lipidierten Oberfläche der Nanopartikel. Der Vorteil dieser Methode gegenüber herkömmlichen Immobilisierungsstrategien ist die Diversität der zu verwendenden Proteine. Anstatt dass, wie bei EPL oder der Staudingerligation, eine chemische Modifikation des Proteins notwendig ist, muss das Protein hierbei lediglich als Fusionsprotein exprimiert werden.

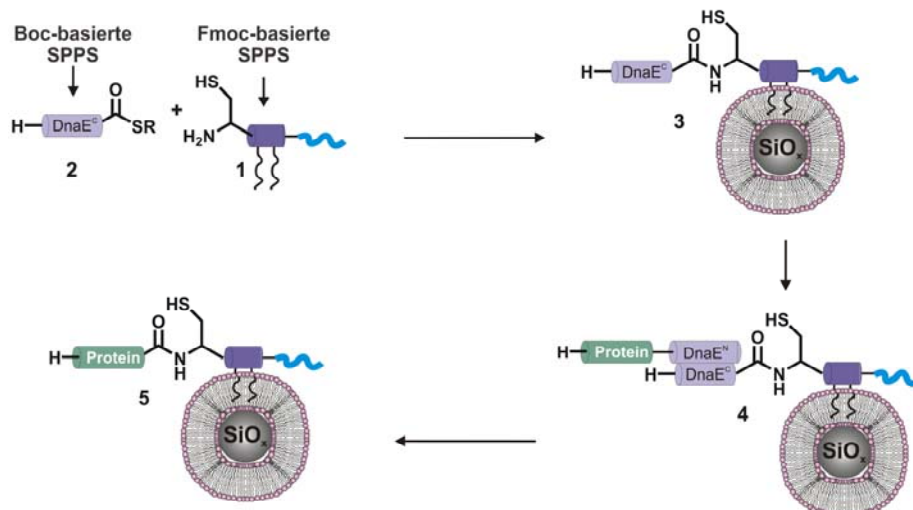


Abb. 49: Schematische Darstellung der Immobilisierung von Proteinen auf lipidierten Nanopartikeln mittels Protein *trans*-Spleißen

Die Immobilisierung lipidierte Proteine auf Nanopartikeln ermöglicht eine umfassende biophysikalische Charakterisierung der ansonsten häufig unlöslichen Proteine.

3.2.1 Expression und Aufreinigung von eGFP-DnaE^N-His

Die Entwicklung einer generellen Strategie der Immobilisierung lipidierter Proteine auf SiO_x-Nanopartikeln wurde an Hand eines Modellsystems etabliert. Die Anforderungen an dieses System waren eine hohe Stabilität unter variablen Bedingungen und eine einfache Detektionsmöglichkeit des immobilisierten Proteins. Diesem Anspruch wird das grün fluoreszierende Protein (eGFP) gerecht, dessen Stabilität über einen weiten Bereich an Bedingungen bereits untersucht worden ist ¹⁰⁶.

Zur heterologen Expression von eGFP in *E.coli* wurde das Gen zunächst auf dem Vektor pEGFPN1 (Clonotech) mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

GFP-NcoI-for: 5'-CTA GCT AGC CAT GGG GGT GAG CAA GGG CGA GG -3'

GFP-SapI-rev: 5'-GCC AAA ACT GAG CTC TTC GGC AAT AAT CCG -3'

Nach Restriktion des resultierenden Fragmentes mit NcoI und SapI, wurde das Gen in einen modifizierten pTXB3 Vektor (New England Biolabs), welcher bereits das Gen für das DnaE^N Intein Segment, sowie einen C-terminalen His-Tag zu Aufreinigungszwecken enthält, kloniert (Abb. 50).

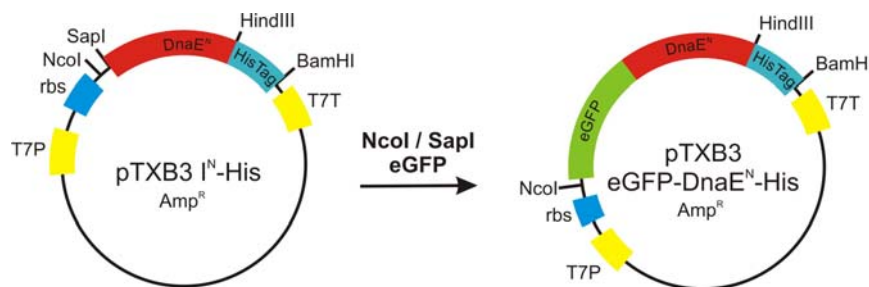


Abb. 50: Klonierungsstrategie für eGFP-DnaE^N-His

Die Expression des Fusionsproteins erfolgte im *E.coli* Stamm BL21(DE3) zur Verbesserung der Ausbeute auf Minimalmedium. Es zeigte sich, dass, durch im Vollmedium enthaltene Spuren von Allolaktose, eine Expression des Proteins vor Zugabe von IPTG erfolgte. Diese unkontrollierte Expression führte zu einem hohen Gehalt des Proteins in Inclusion Bodies. Diese unerwünschte Hintergrundexpression konnte unter Verwendung von Minimalmedium unterdrückt werden. Dabei wurde die Expressionskultur bei 37°C bis auf eine optische Dichte von 0,6 kultiviert und die Expression durch Zugabe von 0,2 mM IPTG bei 20°C über Nacht induziert. Unter diesen Bedingungen konnten 0,5 mg funktionelles eGFP-DnaE^N-His

Fusionsprotein pro Liter Kultur isoliert werden. Die Aufreinigung mittels IMAC erfolgt unter nativen Bedingungen wie unter 2.3.1 beschrieben (Abb. 51 A). Das dabei isolierte Fusionsprotein mit einem apparenten Molkulargewicht mit ~ 40 kD wurde im Folgenden spektroskopisch untersucht (Abb. 51 B). Dabei ergab sich das in Abbildung 51 B dargestellte Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 484 nm. Die exakte Konzentrationsbestimmung erfolgt über den für eGFP spezifischen Extinktionskoeffizienten. Somit wird nur die Menge an fluoreszierendem Protein bestimmt.

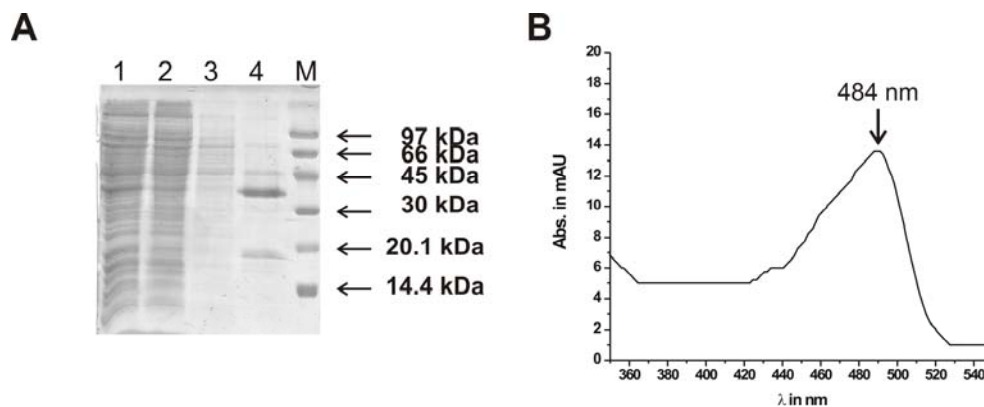


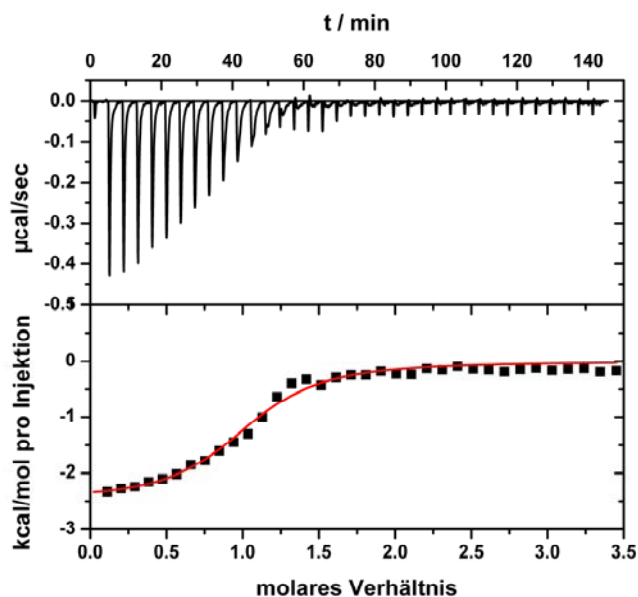
Abb. 51: A) SDS-PAGE der Ni-NTA Aufreinigung von eGFP-DnaE^N-His. Spur 1 entspricht dem Ni-NTA Durchfluss, Spur 2 und 3 den Waschschritten und Spur 4 dem Eluat. Der LMW-Marker (Biorad) befindet sich in der mit M bezeichneten Spur. B) Absorptionsspektrum des isolierten eGFP-DnaE^N-His mit dem typischen Maximum bei 484 nm

Der molekulare Extinktionskoeffizient von eGFP liegt bei einer Wellenlänge von 484 nm bei $56000 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Unter Verwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes erhält man aus der gemessenen Absorption die Konzentration der Proteinlösung. Neben der Fluoreszenz des eGFP ist auch die Funktionstätigkeit des N-terminalen Split-Inteins entscheidend für die Effizienz der späteren Immobilisierung des Proteins auf Nanopartikeln. Zu diesem Zweck wurden im Folgenden Bindungsstudien durchgeführt.

3.2.2 Bestimmung der Bindungskonstante der Inteinsegmente

Zur Bestimmung der Affinität der beiden Inteinsegmente des DnaE Split-Inteins aus *Synechocystis Ssp.* wurde isotherme Titrationskalorimetrie verwendet. Als C-terminales Segment wurde das unter 3.1 beschriebene DnaE^C verwendet, welches in 8 M Harnstoff, 50

mM TrisHCl bei pH 8 denaturierend aufgenommen wurde. Zur Rückfaltung von DnaE^C wurde das Segment gegen 0,5 M NaCl, 100 mM TrisHCl, 2 mM EDTA und 1 mM TCEP, pH 7,5 dialysiert. Die eGFP-DnaE^N Konzentration in der Zelle betrug 50 μM, die des C-terminalen Fragments in der Spritze 800 μM und wurde in 8 μl Injektionen zu einem Volumen von 1,8 ml des GFP-Fusionskonstruktes titriert.

A**B**

N	1
K (M ⁻¹ × 10 ⁵)	2.9
ΔH (kJ mol ⁻¹)	-2.5
ΔS (J mol ⁻¹ K ⁻¹)	16.6
ΔG (kJ mol ⁻¹)	-7.4
K _D (μM)	3.5

Abb. 52: A) ITC-Messung von eGFP-DnaE^N-His mit DnaE^C bei 25°C in 0,5 M NaCl, 100 mM TrisHCl, 2 mM EDTA und 1 mM TCEP, pH 7,5. B) Aus der Messung erhaltene Parameter

Die Zeit zwischen den Injektionen, welche zur Equilibrierung des Systems benötigt wurde, betrug 200 sec. Aus der erhaltenen Titrationskurve (Abb. 52 A) konnten unter Verwendung eines Modells für eine Bindungsstelle die in Abbildung 52 B dargestellten Parameter entnommen werden. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, ergab sich bei 25°C eine Bindungsstöchiometrie von 1 und eine Dissoziationskonstante von 3,5 μM. Im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten Werten von 42 nM, ist die erhaltene Konstante um einen Faktor von 80 geringer. Dies resultiert vermutlich aus der C-terminalen Deletion der drei Aminosäuren CFN aus dem ursprünglichen Extein des DnaE. Die nach der Rückfaltung erhaltene Konformation ohne diese drei flankierenden Aminosäuren entspricht evtl. nicht der nativen und führt zu einer geringeren Affinität. Zur genaueren Analyse müssten die Bindungsstudien mit der Konstrukten, welche CFN beinhalten, durchgeführt werden.

3.2.3 Insertion des lipidierten eGFP in Membranen

Zur Darstellung des zweifach palmitoylierten eGFP^{Palm} wurde das C-terminale Inteinsegment (DnaE^C-4) in Lagerpuffer (Zusammensetzung siehe 2.2.4) und dann in die Proteinlösung aus eGFP-DnaE^N-His gegeben. Zur Durchführung des Protein *trans*-Spleißens wurden die beiden Komponenten in äquimolaren Mengen eingesetzt (siehe Abb.XXX). Die *trans*-Spleißen Effizienz zur Darstellung von eGFP^{Palm} lag bei ca. 50 %. Die Aufreinigung des Ansatzes erfolgte analog zu 3.1.2 über Ni-NTA und anschließende Größenausschlusschromatographie (Sephadex S75, Amersham). Ferner wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für die Lipidierung des Prion Proteins ebenfalls eine Verbesserung der *trans*-Spleiß Effizienz durch Zugabe von Reduktionsmitteln wie MesNa beobachtet (Siehe Abb. 53).

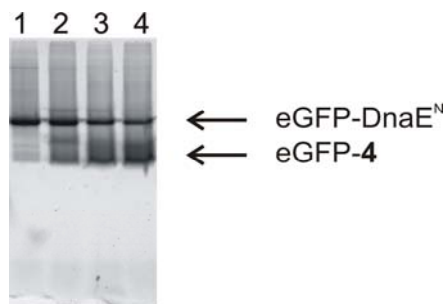


Abb. 53: Fluoreszenzscan der SDS/PAGE verschiedener *trans*-Spleißen Ansätze

Spur 1: eGFP-DnaE^N-His

Spur 2: eGFP-DnaE^N-His mit DnaE^C-4

Spur 3: eGFP-DnaE^N-His mit DnaE^C-4 mit 5 mM MesNa

Spur 4: eGFP-DnaE^N-His mit DnaE^C-4 mit 50 mM MesNa

Ferner ist zu verzeichnen, dass im Fall von eGFP keine Addition von Detergenzien zur Darstellung von eGFP^{Palm} erforderlich ist. Dennoch wurde überprüft, ob vergleichbar zu den Resultaten für rPrP^{Palm} eine weitere Steigerung der Ausbeute durch die Zugabe von Detergenzien erreicht werden konnte. Dazu wurde die Reaktion wie zuvor beschrieben in Gegenwart von 20 mM OG, 1 mM DDM, 43 mM DPC oder 2 mM CTAB durchgeführt. Es ist zu verzeichnen, dass die Zugabe von nicht ionischen Detergenzien wie OG und DDM keine eine weitere Steigerung der Spleiß Effizienz bewirkt. Sowohl das kationische Detergenz CTAB sowie das Lysophospholipid DPC hatten eine vollständige Inhibition des Prozesses zur Folge.

Des Weiteren wurde DnaE^C-4 in einem 25-fachen molekularen Überschuss in Bezug auf das Lipid an DOPC Liposomen rekonstituiert. Dieser Überschuss sollte eine quantitative Assoziation von DnaE^C-4 mit den Liposomen bewirken. Nach Inkubation der so beladenen Liposomen mit einem 5 fachen Überschuss von eGFP-DnaE^N, bezogen DnaE^C-4, für 12 h bei Raumtemperatur, konnte ebenfalls nach densitometrischer Auswertung (siehe Abb. 54) eine Ausbeute von ~50 % beobachtet werden.

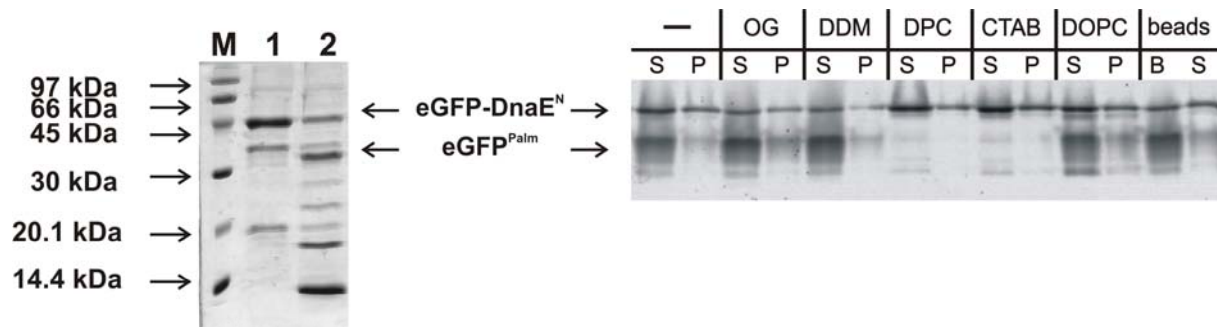


Abb. 54: Links: SDS/PAGE eines *trans*-Spleißen Ansatzes ohne Zusätze
 Rechts: SDS/PAGE der Ansätze unter Verwendung unterschiedlicher Detergenzien. Dabei wurden jeweils zwischen Überstand (S) bzw SiO_x-Beads (B) und Pellet (P) unterschieden. Die Detergenzien wurden in den Konzentrationen OG (20 mM), DDM (1 mM), DPC (43 mM), CTAB (2 mM) und DOPC (2 mg/ml) eingesetzt.

Die stabile Assoziation von DnaE^C-4 mit artifiziellen Membranen wurde unter Verwendung von lipidierten SiO_x-Nanopartikeln überprüft. Die Herstellung der Partikel erfolgt gemäß 2.3.8. Zur Immobilisierung von DnaE^C-4 wurden die lipidierten SiO_x-Beads über Nacht mit dem Inteinsegment inkubiert. Anschließend wurden die Partikel dreimal mit dem Lagerpuffer gewaschen, um überschüssiges, nicht immobilisiertes DnaE^C-4 zu entfernen. Die Zugabe von eGFP-DnaE^N-His erfolgte ebenfalls in einem 5 fachen molaren Überschuss, bezogen auf die immobilisierte Menge an DnaE^C-4. Nach 12 h Reaktion bei RT unter leichtem Schwenken, wurden die Nanopartikel abzentrifugiert und sowohl der Überstand als auch die Partikel mittels SDS/PAGE analysiert. Im Überstand der Partikel befand sich lediglich das Intein Fusionsprotein, wohingegen auf den Beads sowohl eGFP^{Palm} als auch der Komplex aus DnaE^C-4 und eGFP-DnaE^N-His immobilisiert war. Zur weiteren Analyse der Membraninsertion wurde isoliertes eGFP^{Palm} in DOPC SUVs rekonstituiert wie bereits für DnaE^C-4 beschrieben. Anschließend wurde ein linearer Sucrose-Gradient von 5-20 % in Lagerpuffer unter Verwendung eines Gradientenmischers erstellt und dieser zum einen mit eGFP^{Palm}, eGFP-DnaE^N-His sowie unbeladenen Liposomen überschichtet. Nach Zentrifugation bei 100000 x g für 15 h wurde der Gradient analysiert. Die Detektion der eGFP enthaltender Fraktionen erfolgte mittel SDS/PAGE über einen Fluoreszenzscan, die Gegenwart von DOPC Liposomen wurde durch dynamische Lichtstreuung (DLS) festgestellt.

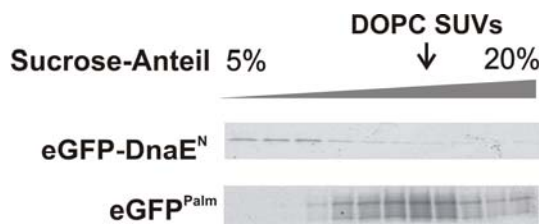


Abb. 55: Fluoreszenzscan des Sucrose-Gradienten. Anregungswellenlänge war 460 nm, Detektion der Fluoreszenz oberhalb von 520 nm

In Übereinstimmung mit den für rPrP^{Palm} erhaltenen Ergebnissen verbleibt das nicht palmitoylierte eGFP-Fusionsprotein auf der Deckschicht und migriert nicht in den Gradienten. Die lipidierte Variante eGFP^{Palm} hingegen zeigt Colokalisation mit den SUVs bei ~15 % Sucrose. Ferner wurde eGFP^{Palm} wie zuvor für DnaE^{C-4} beschrieben auf lipidierten Nanopartikeln immobilisiert. Wie in 3.1.1.2 beschrieben, befand sich bei dem verwendeten Peptid die Erkennungssequenz für die TEV-Protease zwischen den Lipidankern und dem Protein. Dies ermöglichte eine selektive Abtrennung des eGFP von den Liposomen, sofern die Assoziation auf einer spezifischen Wechselwirkung der Lipidanker mit der Doppelschicht beruht.

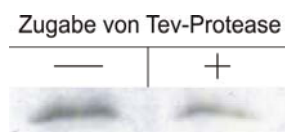


Abb. 56: Westernblotting Analyse mit Anti-GFP der mit eGFP^{Palm} beladenen SiO_x-Beads
 (-) ohne Zugabe von TEV-Protease
 (+) nach 12h Inkubation mit TEV-Protease

Dazu wurden die SiO_x-Partikel dreimal mit 50 mM TrisHCl, 5mM MesNa, 0,5mM EDTA, pH 8 gewaschen und anschließend TEV-Protease zugegeben. Dabei lag Verhältnis von immobilisiertem eGFP^{Palm} zur TEV-Protease bei 50 : 1. Nach einer 12 stündigen Inkubation der Partikel bei Raumtemperatur, wurden diese erneut dreimal mit Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Menge an immobilisierte eGFP^{Palm} mittels SDS/PAGE und Westernblotting ermittelt. Zur Kontrolle wurde ein Aliquot der Beads nicht mit TEV-Protease inkubiert aber ansonsten identisch behandelt. Die densitometrische Auswertung der erhaltenen Bandenintensitäten aus Abb. 56 wurde unter Verwendung der Aida Image Analyzer v.3.22 Software durchgeführt. Wie in Abb. 56 dargestellt konnte auf diese Weise ~50 % des immobilisierten Proteins durch spezifische Proteolyse wieder entfernt werden. Vermutlich ist die Erkennungssequenz auf Grund der Immobilisierung des Proteins nicht mehr gut zugänglich. Durch den Zusatz von mehr Protease und eine längere Inkubationszeit könnte dieses Problem überwunden werden.

Analog zu den Versuchen mit rPrP^{Palm} wurde das lipidierte eGFP^{Palm} auch auf die Membranen von Zellen transferiert. Im Gegensatz zu dem aggregationsanfälligen rPrP erforderte dies

nicht den Einsatz spezieller Transfektionsreagenzien, sondern gelang bereits zu Zugabe des mit DOPC SUV's assoziierten Proteins.

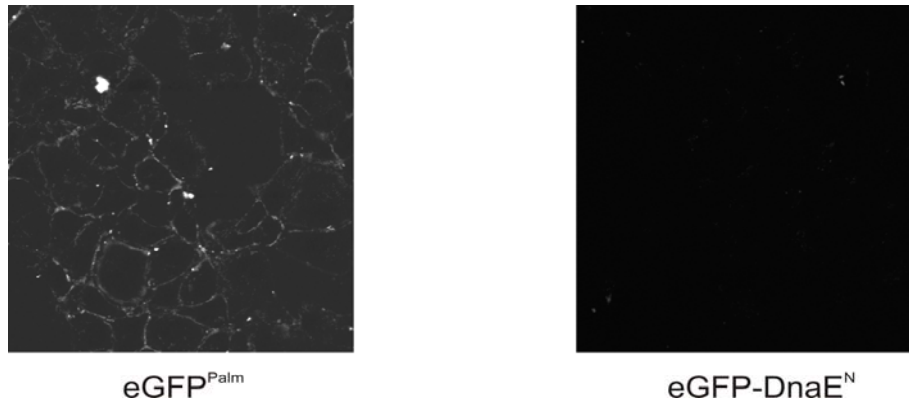


Abb. 57: Bilder (aufgenommen an einem Leica Konfokalen Mikroskop) von den COS-7 Zellen nach 2 stündiger Inkubation mit eGFP^{Palm} (links) und eGFP-DnaE^N (rechts). eGFP wurde bei 475 nm angeregt die Fluoreszenzemission wurde bei einer Wellenlänge von < 500 nm detektiert.

Dazu wurden die Cos-7 Zellen als Referenzsystem auf Objektträgern kultiviert und mit 0,05 mg/ml eGFP^{Palm} und eGFP-DnaE^N in Liposomen für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit serumfreien Medium gewaschen und das eGFP Fluoreszenzsignal detektiert. Unter Verwendung des lipidierten eGFP^{Palm} sieht man klar den Umriss der Zellen, wohingegen nach Inkubation mit eGFP-DnaE^N keine Membranumrisse zu detektieren sind. Somit konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Immobilisierung auf SiO_x-Partikel, als auch die Insertion in die Zellmembran auf die beiden Palmitoylreste des semisynthetischen eGFP^{Palm} zurückzuführen sind.

3.2.4 Kinetik der Spleißreaktion auf Nanopartikeln

Die Analyse der bisherigen Immobilisierung auf SiO_x-Partikel wurde jeweils zu einem fixen Zeitpunkt durchgeführt. Um detailliertere Informationen über die Kinetik des *trans*-Spleißens und der damit verbundenen Verankerung des lipidierten Zielproteins auf dem Nanopartikel zu erhalten, wurde im Folgenden die Bildung von eGFP^{Palm} auf Nanopartikeln untersucht.

Das C-terminale Intein-Fragment wurde wie bereits beschrieben auf den Partikeln immobilisiert, anschließend wurden 5 äq des eGFP-DnaE^N Fusionsproteins, bezogen auf DnaE^C-4, zu den Beads gegeben. Der zeitliche Verlauf der Reaktion wurde mittels SDS/PAGE und Westernblotting verfolgt. Dazu wurde jeweils der Überstand der Partikel

sowie die Beads analysiert. Das immobilisierte Protein kann durch Inkubation der SiO_x-Beads mit SDS-haltigem Puffer aus seiner Verankerung gelöst werden. Es ergab sich folgende die in Abb xx dargestellte Kinetik des *trans*-Spleißens bzw. Immobilisierens:

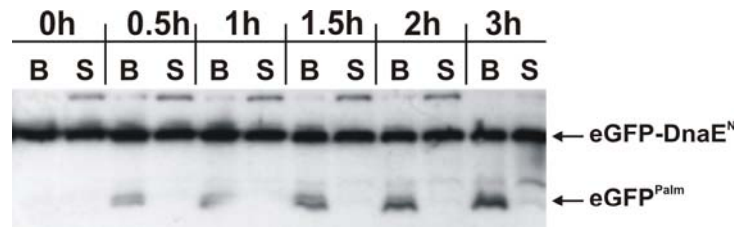


Abb. 58: Westernblotting Analyse der *trans*-Spleiß Reaktion auf den Nanopartikeln. Dabei wird zwischen auf den Beads immobilisiertem Protein (B) und den im Überstand befindlichen Proteinen (S) unterschieden.

In Abb. 58 ist zu erkennen, dass sich im Überstand (S) der Beads lediglich das Fusionsprotein befindet, wohingegen auf den Partikeln (B) sowohl der Komplex aus eGFP-DnaE^N und DnaE^C-4 zu detektieren ist sowie die Ausbildung von eGFP^{Palm} zu verzeichnen ist. Die Immobilisierung von DnaE^C-4 bewirkt vermutlich eine verminderte Zugänglichkeit der Intein-Domäne, was zu einer Verringerung der Effizienz des Prozesses führt. Ferner kommt es evtl. zu einer partiellen Denaturierung des Komplexes auf der Oberfläche der Partikel, wodurch kein *trans*-Spleiß mehr stattfinden kann. Eine densitometrische Analyse der Bandenintensität des entstandenen lipidierten eGFP wurde unter Verwendung der Aida Image Analyzer v.3.22 Software durchgeführt. Die Auftragung der erhaltenen Intensitäten gegen die Zeit ergab die folgende zeitliche Zunahme von eGFP^{Palm}.

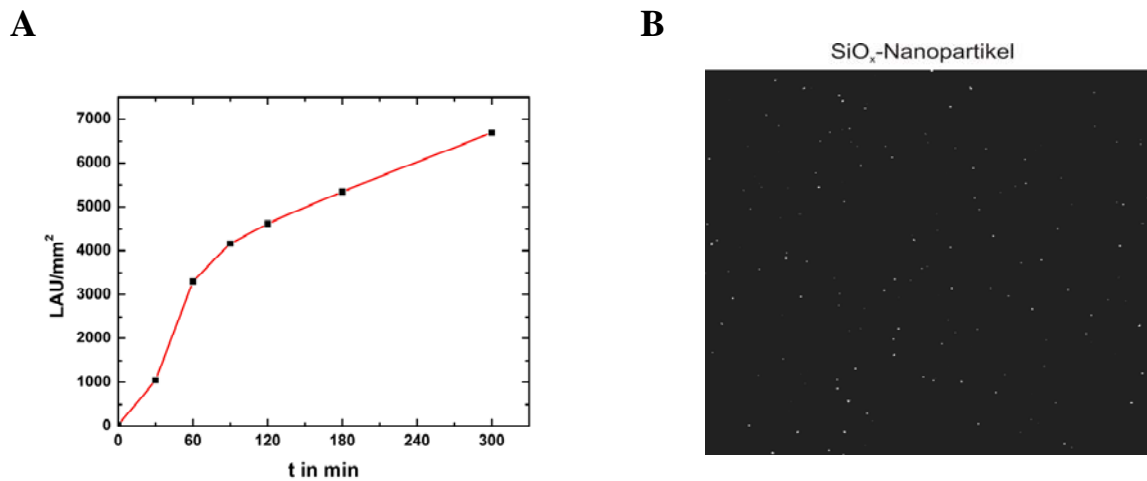


Abb. 59: A) Auftragung der erhaltenen aus der densitometrischen Analyse erhaltenen Werte für die Bildung von eGFP^{Palm} gegen die bestimmten Zeitpunkte.
 B) Bilder (aufgenommen an einem Leica konfokalen Mikroskop) der SiO_x-Nanopartikel nach 2 stündiger Inkubation mit eGFP^{Palm}. eGFP wurde bei 475 nm angeregt die Fluoreszenzemission wurde bei einer Wellenlänge von < 500 nm detektiert.

Die dargestellte Zunahme von eGFP^{Palm} erreichte nach 60 min ihren halbmaximalen Wert und ging nach 3 h in die Sättigung über. Auf Grund der multiplen Prozesse, welche zur Bildung von eGFP^{Palm} führen, lassen keine kinetische Interpretation an Hand der vorliegen Daten zu. Ferner wurde mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie überprüft, ob die immobilisierten Proteine auf den SiO_x-Nanopartikeln noch in ihrer nativen Form vorliegen. Im Fall von eGFP geschieht diese Analyse über die spezifische eGFP Fluoreszenz, welche das Protein ausschließlich im nativen Zustand aufweist.

Zur Durchführung der konfokalen Fluoreszenzspektroskopie wurden die SiO_x-Nanopartikel zunächst in 0,8 % low melting point agarose auf Objektträgern fixiert. In den aufgenommenen Bildern ist zu erkennen, dass sie Partikel homogen fluoreszieren und somit eGFP nativ auf dem Trägermaterial, unter Verwendung von Protein *trans*-Spleißen, immobilisiert worden ist.

3.3 N-terminale Fluoreszenzmarkierung von mPrP(90-232)

Die molekulare Basis der proteinkonformationellen Erkrankungen ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht im Detail verstanden. Im Fall der TSEs wird beispielsweise eine mögliche Konversion der Helix A in eine β -Faltblatt Struktur diskutiert. Eine genaue Analyse der entstehenden Strukturen durch klassische Verfahren wie Kristallographie oder NMR ist jedoch auf Grund der Unlöslichkeit und Heterogenität der gebildeten dreidimensionalen Strukturen nur eingeschränkt möglich. Durch Einführung von Umgebungssensitiven Reportermolekülen an verschiedenen Positionen innerhalb des Proteins erhofft man sich genauere Einblicke in die strukturellen Änderungen während der Konversion. Studien dieser Art wurden zum Teil bereits durch das Einbringen von ESR sensitiven Molekülen durchgeführt¹⁰⁷. Der große Nachteil der beschriebenen Methode besteht in der Markierung von durch Mutagenese eingeführten Cysteinen, was voraussetzt, dass die Disulfidbrücke zwischen Helix B und C intakt ist und keine Markierung dieser Cysteine erfolgt. Eine selektivere Darstellungsmöglichkeit derartig modifizierter Proteine ist die Semisynthese, wie bereits in der Einleitung beschrieben.

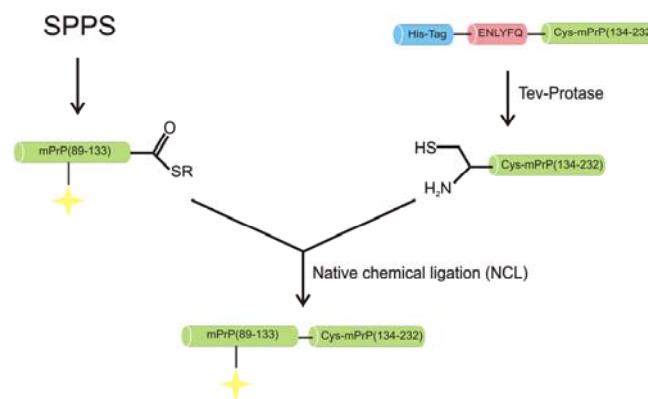


Abb. 60: Schematische Darstellung der Semisynthese von rPrP(90-232) mit N-terminaler Modifikation.

Dazu wird wie in Abb xx dargestellt der N-Terminus des murinen Prion Proteins mittels Festphasensynthese als C_{α} -Thioester hergestellt. Dabei wird selektiv die Einführung von Fluorophoren an beliebigen Positionen ermöglicht. Zum anderen wird das C-terminale Fragment mit einem N-terminalen Histidin-Tag und der Erkennungssequenz für die TEV-Protease heterolog in *E.coli* exprimiert. Die Generierung des für die nachfolgende NCL benötigten N-terminalen Cysteins erfolgt durch Proteolyse. Die Kombination der beiden Fragmente liefert das semisynthetische mPrP(90-232).

3.3.1 Expression und Aufreinigung von rPrP(134-232)S134C

Zur heterologen Expression von rPrP(134-232) wurde das Gen zunächst von dem Vektor in 3.1 beschriebenen mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer verwendet:

Sap-PrP(134)_hin 5'-CCT GTG CTC TTC GTG CAG G-3'
RPS09 5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG TGG-3'

Nach Restriktion des resultierenden Fragments mit SapI und BamHI, wurde das Gen in den Vektor pRSNCys (zur Verfügung gestellt von Ralf P. Seidel), welcher nach einem N-terminalen His-Tag auch für die Erkennungssequenz der TEV-Protease kodiert ist. Somit ist nach der Expression eine vollständige Entfernung des Affinitätstags möglich.

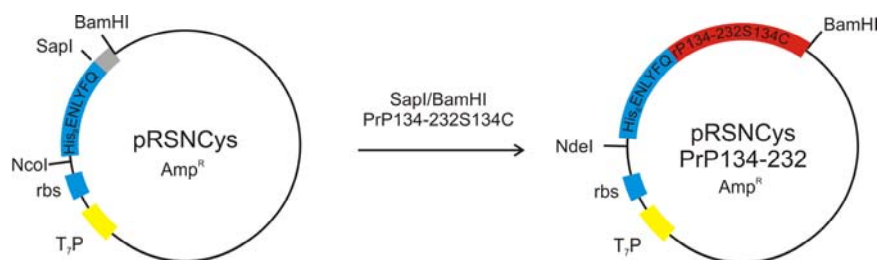


Abb. 61: Klonierungsstrategie des PrP(134-232) Fragmentes in den Vektor pRSNCys

Die Expression des N-terminal verkürzten Prion Proteins wird analog zur Darstellung des rPrP-Inteins Konstruktes durchgeführt. Unter Verwendung des *E.coli* Stammes BL21(De3)RIL wurde das Protein in Inclusion Bodies mit einer Ausbeute von 4 mg/L Expressionskultur isoliert. Die Aufreinigung erfolgt unter denaturierten Bedingungen wie unter 2.3.1 beschrieben.

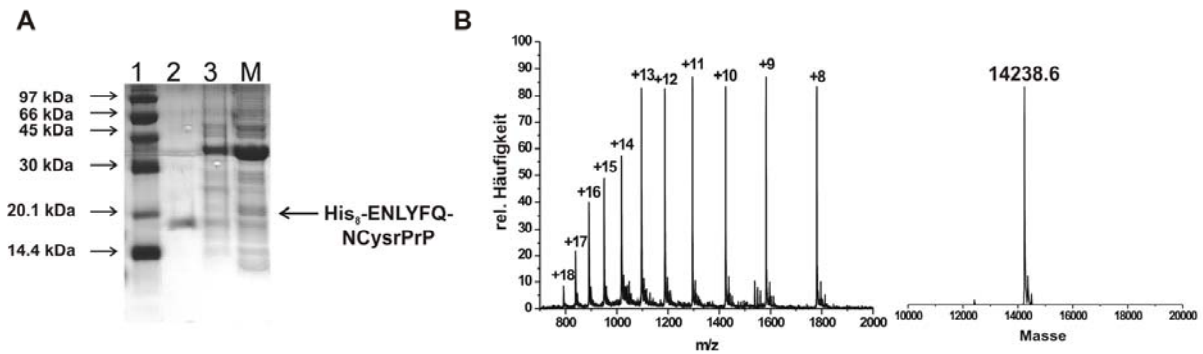


Abb. 62: A) SDS-Page der Ni-NTA Aufreinigung von His₈-ENLYFQ-PrP(134-232). Spur 1 entspricht dem Ni-NTA Durchfluss, Spur 2 dem Waschschriff und Spur 4 dem Eluat. Der LMW-Marker (Biorad) befindet sich in der mit M bezeichneten Spur
B) ESI-MS des aus der IMAC Aufreinigung erhaltenen Eluates

Wie in Abb. 62 A zu erkennen ist, konnte mittels Ni-NTA ein Protein mit dem apparenten Molekulargewicht von ~17 kDa isoliert werden. Die exakte Bestimmung der Masse erfolgte durch ESI-MS. Die detektierte Masse von 14238,6 Da weist eine Differenz von der berechneten Masse von 14227 Da um +11 auf, welche bis jetzt noch nicht näher charakterisiert werden konnte. Zur Entfernung des Affinitätstags wurde das erhaltene Protein mit der TEV-Protease umgesetzt. Dazu wurde das denaturierte Protein zunächst mittels Ultrafiltration auf 4 M Harnstoff, 50 mM Tris-HCl, 5 mM MesNa, 0,5 mM EDTA bei einem pH von 8 umgepuffert. Die Zugabe der Protease erfolgt in diesem Puffer in einem Verhältnis von Protein zu Protease von 10 zu 1. Diese Lösung wird über Nacht gegen Chaotrop freien Puffer der ansonsten identischen Zusammensetzung dialysiert. Der Fortschritt des Verdaus wird mittels SDS/PAGE kontrolliert.

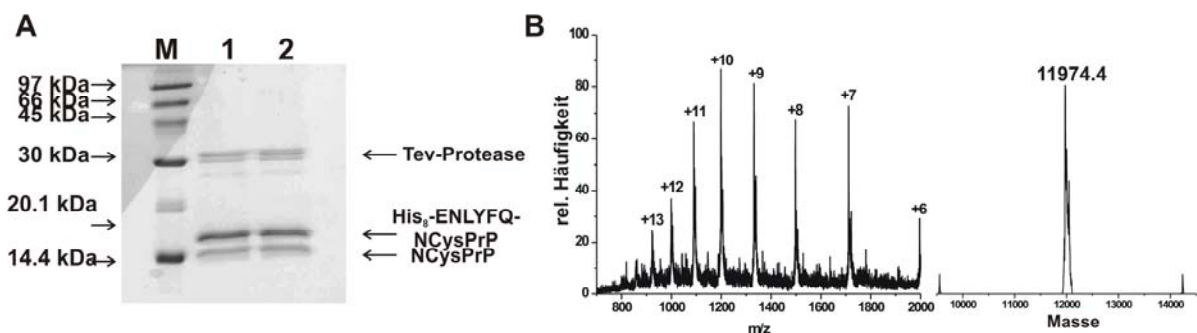


Abb. 63: A) SDS/PAGE der Proteolyse mit TEV. Spur 1 und 2 enthalten jeweils parallel geführte Ansätze des Verdaus. Mit M ist der LMW-Marker von Amersham bezeichnet.
B) ESI-MS des aufgereinigten NCys-PrP(134-232)

Unter den gewählten Bedingungen wird das Protein zu ca. 40% von der TEV-Protease umgesetzt (Abb 63 A). Dabei weist rPrP(134-232) ein apparentes Molekulargewicht von ~ 14 kDa auf. Diese geringen Ausbeuten lassen sich mit der Unlöslichkeit des Konstruktes erklären, welches die Pufferbedingungen für die Proteolyse nicht uneingeschränkt toleriert und stark zur Präzipitation neigt. Der gesamte Ansatz wurde zur Solubilisierung der entstandenen Präzipitate gegen 6 M GdnHCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8 über Nacht dialysiert. Da sowohl der abgeschnittene N-Terminus, das unverdaute Edukt und die TEV-Protease über einen His-Tag verfügen, erfolgt die Entfernung dieser mittels Ni-NTA. Das gewünschte rPrP(134-232) bindet nicht an das Säulenmaterial und befindet sich im Durchfluss. Das entstandene Proteinfragment wurde ferner massenspektrometrisch charakterisiert (Abb 63 B). Dabei weicht die detektierte Masse von 11974,4 Da von der berechneten (11964,4) erneut um +10 Da ab, was bedeutet, dass diese Modifikation innerhalb von rPrP(134-232) auftritt.

3.3.2 Synthese von mPrP(90-133)-SR

1 NBD-GQGGGTHNQWNKPSKPKTNMKHMAGAAAAGAVVGGLGGYMLGSAM-SR 44
M = 5078 g/mol [mit Gly(NBD)]

Die Aminosäuren 90-133 sind entscheidend für die Pathogenese der TSEs. Insbesondere die palindromische Sequenz AGAAAAGA ist bei der Konversion des Proteins in Zellversuchen essentiell. Aus diesem Grund wird auch vermutet, dass die größten strukturellen Änderungen im Protein diese Region betreffen. Um mittels Fluoreszenzspektroskopie eine Analyse dieser Konformationsänderung vorzunehmen, wurde dieser Teil des Proteins synthetisch dargestellt, was die spezifische Inkorporation umgebungssensitiver Fluorophore ermöglicht.

Die Festphasensynthese des N-terminalen Fragments des murinen Prion Proteins (90-133) wurde an einem ABI-Peptid-Synthesizer (433 A, Applied Bioscience) unter Verwendung der Boc-Strategie an einem speziellen Thioesterharz durchgeführt¹⁰⁰. Nach Entschützung des N-Terminus wurde das Peptid mit HF vom Harz abgespalten. Das Rohpeptid wurde mittels C4 RP-HPLC (250 x 22 mm) mit einem Gradienten von 20 % (v/v) Puffer B nach 60 % (v/v) Puffer B in Puffer A in 60 min gereinigt

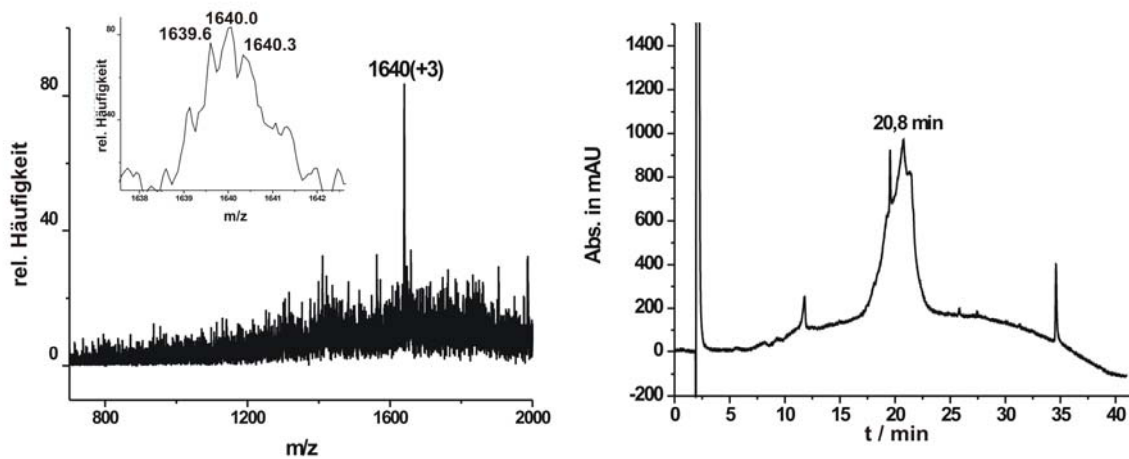


Abb. 64: ESI-MS des Rohpeptids PrP(90-133)-SR (links) und RP-HPLC-Chromatogramm (rechts)

Im ESI-MS tritt der Ladungszustand des Peptids mit drei (1640) positiven Ladungen auf, daraus ergibt sich eine Masse von 4917 g/mol, welche mit der berechneten Masse von 4915 g/mol in guter Übereinstimmung ist. Auf Grund der eingeschränkten Ionisierbarkeit des Peptids konnten die Ladungszustände mit 4 oder 5 positiven Ladungen nicht beobachtet werden. Das Isotopenmuster der detektierten Masse weist jedoch ebenfalls auf ein Signal mit drei positiven Ladungen hin, da der Abstand der Massen jeweils 0,3 beträgt. Auf Grund der natürlichen Häufigkeit der Kohlenstoffisotope treten im Massenspektrum neben der Hauptmasse mit dem Isotop ^{12}C auch Spezies der anderen Isotope auf, welche zueinander jeweils eine Differenz von ± 1 aufweisen. Bei mehrfach positiv geladenen Spezies wird diese Isotopenaufspaltung durch das Verhältnis aus Masse zu Ladung (m/z) wiedergegeben.

Zur gezielten Untersuchung der konformationellen Umwandlung von rPrP sollten im Folgenden umgebungssensitive Fluorophore an unterschiedlichen Positionen des rPrP(90-133) inkorporiert werden. Dazu wurde an den Positionen G127 und L125 durch die unnatürliche Aminosäure Dap substituiert. Jedoch führten diese Sequenzmodifikationen, vermutlich durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen am Harz, zu einem Abbruch der Synthese. Aus diesem Grund wurde zur Durchführung initialer Untersuchungen zunächst eine Modifikation des N-Terminus angestrebt.

Zur N-terminalen Fluoreszenzmarkierung des N-terminalen PrPs wurde das Peptid am Harz mit dem Umgebungssensitiven Fluorophor NBD inkubiert. Dazu wurde zunächst der N-Terminus durch zweimalige Inkubation des Harzes mit reiner TFA für 1 min entschützt. Anschließend wurde der N-Terminus mit 10 % DIEA in DMF neutralisiert, mit DMF gewaschen und NBD-Cl in DMF für 4 h zum Harz gegeben. Nach Abspaltung des Rohpeptids

vom Harz mit HF erfolgte die Aufreinigung mittels C4 RP-HPLC (250 x 22 mm) mit einem Gradienten von 30 % (v/v) Puffer B nach 80 % (v/v) Puffer B in Puffer A in 60 min.

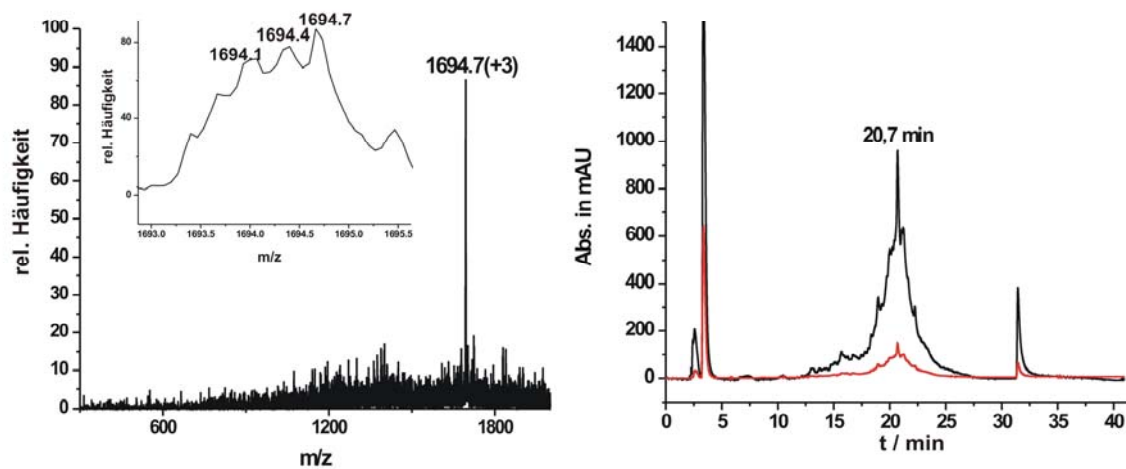


Abb. 65: ESI-MS des aufgereinigten NBD markierten NBD-PrP(90-133)-SR (links) und RP-HPLC-Chromatogramm (rechts)

Die im ESI-MS detektierte Masse von 1694,7 entspricht dem dreifach positiv geladenen N-Terminus des PrP markiert mit NBD. Das entspricht einer Masse von 5081,1 g/mol was mit der berechneten Masse von 5078,1 g/mol in guter Übereinstimmung ist. Analog zum nicht markierten N-Terminus tritt im Massenspektrum als einziger Ladungszustand + 3 auf, wie sich aus dem Isotopenmuster des Signals erkennen lässt. Unter Verwendung einer präparativen C4 RP-HPLC lies sich das Peptid lediglich in der in Abb. 65 B dargestellten Reinheit isolieren, da die Elution über einen weiten Bereich des Gradienten erfolgte. Dies konnte auch unter Variation von sowohl Gradient als auch Puffersystem nicht verbessert werden. Dieses Verhalten lässt sich vermutlich auf die Aggregationsanfälligkeit dieses Fragments zurückführen, was teilweise zu einer Präzipitation des Peptids auf dem Säulenmaterial führt.

3.3.3 Ligationen zur Darstellung von N-terminal modifizierten rPrP(90-232)

Zur Durchführung der NCL wurden 5-6 mM Lösungen des rPrP mit N-terminalen Cystein (NcysPrP(134-232)) und rPrP(90-133)-SR in 6 M GdnHCl, 300 mM NaPi, pH 7,8 angesetzt. Die Ligation wurde durch die Zugabe von 1 % (v/v) Thiophenol induziert. Nach einer Reaktionszeit von 24 h wurde der Fortschritt der Reaktion mittels SDS/PAGE analysiert.

Dazu wurden den Ligation Aliquots entnommen und zur Entfernung des Guanidiniums und des Thiophenols mit TCA gefällt.

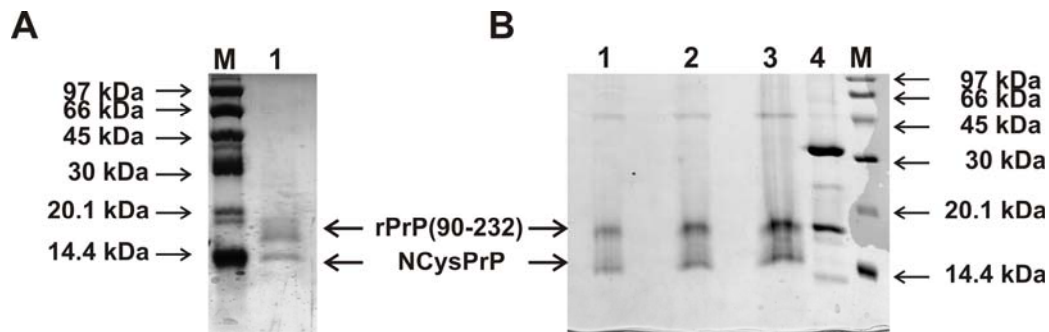


Abb. 66: A) SDS/PAGE des Ligrationsansatzes von PrP(90-133)-SR und NCysPrP(Spur 1) mit M ist der LMW-Marker bezeichnet
 B) SDS/PAGE des Ligrationsansatzes von NBD-PrP(90-133)-SR und NcysPrP(Spur 1, 5 μ l; Spur 2, 10 μ l; Spur 3, 1 μ l. Auf Spur 4 befindet sich eine Fremdprobe) mit M ist der LMW-Marker bezeichnet

In Abb. 66 A ist die Ligation von NCysPrP(134-232) mit dem unmodifizierten N-Terminus mPrP(90-133)-SR dargestellt. Es ist deutlich die Bildung einer Bande mit dem apparenten Molekulargewicht von \sim 16 kDa zu beobachten. Nach einer Reaktionszeit von 24 h ist ein Umsatz der Komponenten von \sim 50 % erreicht. Die gleiche Reaktion mit dem N-terminal NBD markierten mPrP(90-133) ist in Abb. 66 B dargestellt. Auch hier erkennt man die Ausbildung eines Proteins mit \sim 16 kDa. Die Ausbeute dieser Ligation beträgt \sim 60-70 %.

Zur Aufreinigung der Ligrationsansatze wurden diese 1 : 3 mit Ligationspuffer verdünnt und die entstandenen Disulfide des Thiophenols durch Zugabe von 15 % β -Mercaptoethanol (BME) für \sim 20 bis 30 min reduziert, anschließend wurden dem Ansatz für 5 min einige mg TCEP zugesetzt um entstandene BME-Addukte des Proteins wieder zu reduzieren. Eine Aufreinigung der Ligationen über RP-HPLC war auf Grund des ähnlichen Elutionsverhaltens weder unter Verwendung von C4 oder C8 Material und nach Variation der Lösungsmittel und Temperatur möglich. Von der Verwendung C18 modifizierter Materialien wurde auf Grund der Hydrophobizität der Fragmente abgesehen. Ein Ansatz zur Aufreinigung ist der Einsatz von Größenausschlusschromatographie. Die Reinigung wurde unter denaturierenden Bedingungen (6 M GdnHCl, 100 mM NaPi, pH 7,5) durchgeführt, um eine Präzipitation der stark aggregationsanfalligen Proteine zu verhindern. Ferner wurde dem Puffer 1 mM TCEP zugesetzt, um die Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken zu verhindern. Die Probe wurde mittels Ultrafiltration auf 1:100 des Volumens der verwendeten Gelfiltrationssäule (BioSep-SEC-S2000, Phenomenex) aufkonzentriert. Während der Chromatographie wurden

0,5 ml Fraktionen (Flussrate 0,5 ml/min) gesammelt und mittels Westernblotting unter Verwendung des A7 Antikörpers wie zuvor beschrieben analysiert.

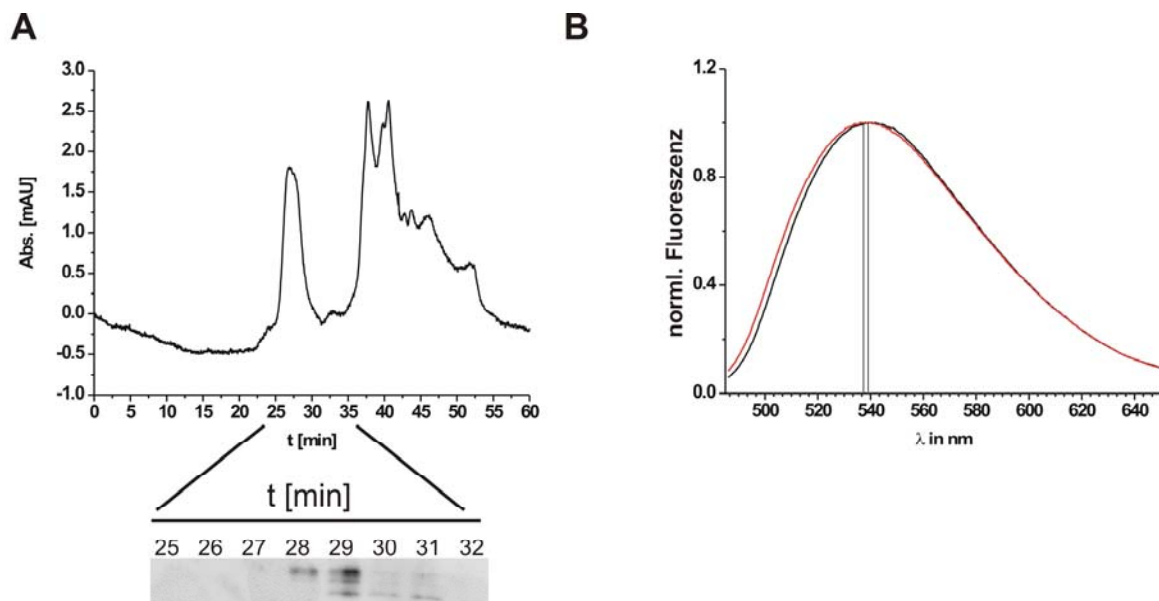


Abb. 67: A) SEC Chromatogramm der PrP-Ligation mit detaillierter Westernblotting Analyse unter Verwendung des A7 Antikörpers des Peaks bei 29 min.
 B) Fluoreszenzemissionsspektrum des α -helikalen NBD-PrP(90-232) in 20 mM NaOAc, pH 5,5 (rote Linie) mit einer Anregungswellenlänge von 460 nm. Die schwarze Linie stellt das Spektrum der mit 3 M Harnstoff, 1 M Gdn-HCl, 150 mM NaCl und 20 mM NaPi inkubierten NBD-PrP(90-232) Probe dar.

Das resultierende Chromatogramm mit der dazugehörigen Westernblotting Analyse der Aufreinigung ist in Abb. 67 A dargestellt. Die detaillierte Analyse des Peaks bei 29 min zeigt, dass die Trennung des ligierten mPrP(90-232) vom NCysPrP(134-232) lediglich bedingt möglich ist. Zwar konnte aus dem Beginn des Peaks bei 28 min reines semisynthetisches Prion Protein isoliert werden, jedoch befand sich der Großteil des Proteins als Gemisch mit dem nicht umgesetzten C-terminalen Fragments bei 29 min. In den Peaks von 35 bis 50 min befanden sich zum einen das N-terminale Peptid sowie BME. Die erhaltene reine Fraktion des mit NBD N-terminal fluoreszenzmarkierten Prion Proteins wurde, wie bereits beschrieben, in seine zelluläre α -helikale Form gefaltet und ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen. Das korrespondierende Emissionsspektrum ist in Abb. 67 B (rote Linie) dargestellt. Dabei wurde NBD mit einer Wellenlänge von 465 nm angeregt und die Emission in einem Bereich von 480 bis 650 nm detektiert. Das Maximum des aufgenommenen Spektrums lag bei 536 nm. Zur Konversion des Proteins in seine amyloide β -Faltblatt reiche Struktur wurde der Ansatz im Folgenden gegen 3 M Harnstoff, 1 M GdnHCl, 150 mM NaCl und 20 mM NaPi bei einem pH von 6,8 dialysiert. Ist der N-Terminus maßgeblich in den Umfaltungsprozess involviert, sollte

sich auf Grund der Änderung in der Polarität der Umgebung eine Verschiebung des Emissionsspektrums ergeben. In Abb. 67 b ist das entsprechende Fluoreszenzspektrum durch die schwarze Linie dargestellt, das ermittelte Maximum der Emission liegt bei 538 nm. Im Vergleich zu dem Spektrum des nativen mPrP ergibt sich daraus eine bathochrome Verschiebung von 2 nm. Unter Verwendung von NBD sind Verschiebungen von bis zu 10 nm durch eine Änderung der Umgebungspolarität des Fluorophors zu erwarten ¹⁰¹. Die strukturellen Veränderungen in der Nähe des N-Terminus lassen sich demnach nicht fluoreszenzspektroskopisch auflösen.

3.4 Inhibitoren der Fibrillogenese

Die Entwicklung neuartiger Therapeutika zur Bekämpfung proteinkonformationeller Erkrankungen wird auf Grund der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung in zunehmendem Maße entscheidend. Gut dokumentiert ist dieser Zusammenhang im Fall von Alzheimer. So sind im Alter von 60-69 lediglich 2 Betroffene pro 1000 Personen zu verzeichnen, wohingegen im Alter von 80-89 die Zahl auf 110 pro 1000 ansteigt¹⁰⁸. Ein spezifisches Charakteristikum dieser Krankheiten ist die Ausbildung fibrillärer Strukturen durch wirtseigene Proteine oder Proteinfragmente. Ein Ziel einer möglichen Medikation könnte die Verhinderung dieser Fibrillogenese durch direkte Interaktion mit den beteiligten Proteinen sein. Im Folgenden werden zwei Substanzen aus dem Extrakt des grünen Tees auf ihre Wirksamkeit in Bezug auf die Wechselwirkung am Modellsystem des murinen Prion Protein *in vitro* untersucht.

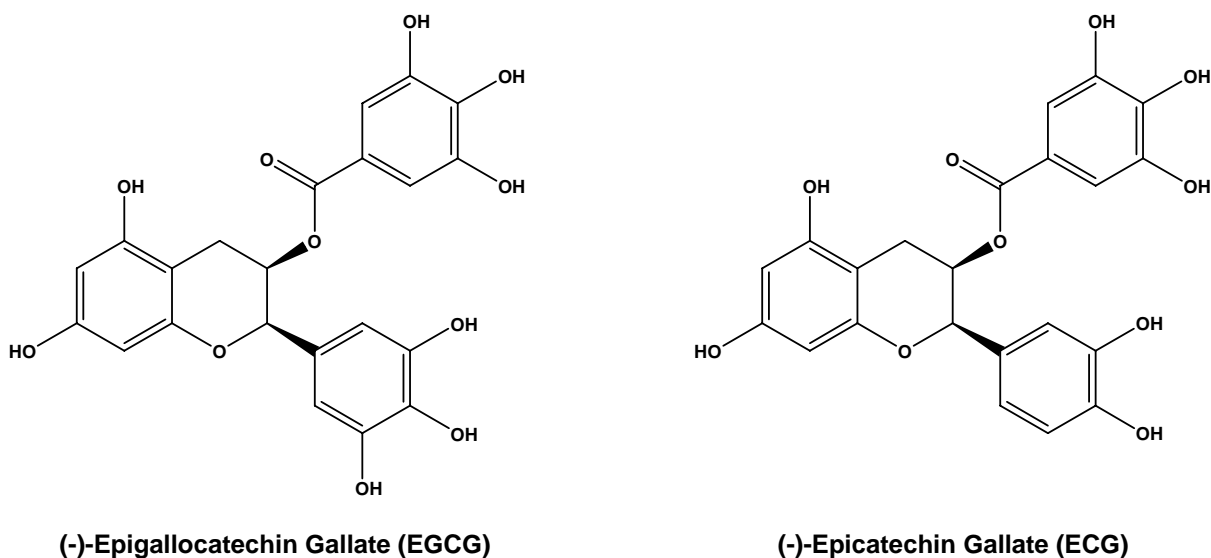


Abb. 68: Strukturformeln der beiden aus Teeextrakten gewonnenen Substanzen

Die beiden untersuchten Substanzen unterscheiden sich hierbei lediglich um eine Hydroxylfunktion und weisen keinerlei Toxizität in lebenden Organismen auf. Dies stellt einen bedeutenden Vorteil bei der Anwendung als neue Pharmazeutika dar. Dabei wurden sowohl EGCG als auch ECG erstmals in einer umfassenden Studie von Masuda et al.¹⁰⁹ als potente Inhibitoren der Fibrillogenese des A β -Peptids beschrieben.

3.4.1 Untersuchung der Bindung von EGCG/ECG an mPrP

In Zellexperimenten, welche in der Arbeitsgruppe von J. Tatzelt (LMU, München) durchgeführt wurden, wurde unter Verwendung von EGCG bereits eine Reduktion von endogenen mPrP detektiert. Eine mögliche Ursache dieser Beobachtung wäre eine direkte Interaktion der Substanz mit PrP. Zur Aufklärung dieser Wechselwirkung wurden im Folgenden zunächst Bindungsstudien unter Verwendung von isothermer Titrationskalorimetrie durchgeführt. Dazu wurde das rekombinante rPrP verwendet, welches wie unter 3.1 beschrieben dargestellt wurde. Der dabei gebildete MesNa Thioester beeinflusst nicht die Wechselwirkung mit EGCG/ECG. Um die Ergebnisse mit den erhaltenen Daten aus den Zellexperimenten vergleichen zu können, müssen die Titrations bei physiologischen pH durchgeführt werden. Unter Berücksichtigung dieser Bedingungen wurde ein im Vergleich zu 3.1 modifiziertes Rückfaltungsprotokoll verwendet, welches im Folgenden beschrieben wird. Zur Rückfaltung wurde das in einem Puffer aus 6 M GdnHCl, 50 mM TrisHCl, pH 8 denaturierte Protein mit einer Konzentration von 2 mg/ml bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml in einen Puffer aus 0,6 M L-Arginine, 50 mM TrisHCl, 0,5 mM GSSG und 5 mM GSH bei pH 8,6 verdünnt und für 12 h bei 4°C leicht gerührt. Zur Entfernung des L-Arginins und des Glutathions wurde die Proteinlösung gegen 50 mM Tris-HCl bei pH 7,5 dialysiert. Zur Entfernung von entstandenem Präzipitat wurde die Lösung durch einen 0,2 µm Filter filtriert. Die Konzentration des erhaltenen löslichen rPrP wurde mittels Ultrafiltration zur Durchführung der Titration auf 27 µM eingestellt. Zuvor wurde jedoch die Struktur des Proteins mittels CD-Spektroskopie untersucht.

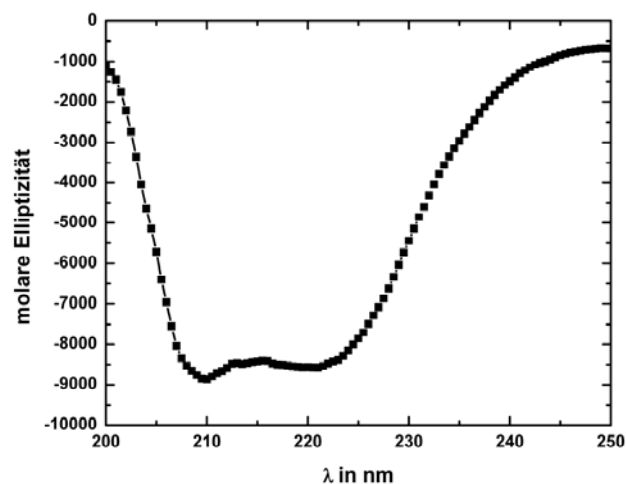


Abb. 69: CD-Spektrum des rekombinanten rPrP(90-232) in 50 mM Tris-HCl bei pH 7,5

Wie in Abb xx zu erkennen ist, wurde auch unter diesen Rückfaltungsbedingungen eine überwiegend α -helikale Struktur mit einem Helixanteil von 43 % ausgebildet. Somit konnte unter den beschriebenen Bedingungen rPrP auch bei einem physiologischen pH von 7,5 in seine native Form gefalten werden.

Die anschließende Bestimmung der Affinität der beiden Substanzen EGCG und EGC erfolgte durch ITC unter Verwendung eines VP-ITC Gerätes der Firma MicroCal. Dazu wurde die Zelle mit 1,8 ml der 27 μ M rPrP Lösung befüllt und mit einer 0,5 mM Lösung der beiden Substanzen in 8 μ l Schritten titriert. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Injektionen betrug 1400 sec. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Software Packet Origin-ITC. Als Kontrollexperimente wurde zum einen Puffer zu der rPrP Lösung gegeben und zum anderen die Substanzen zum Puffer titriert.

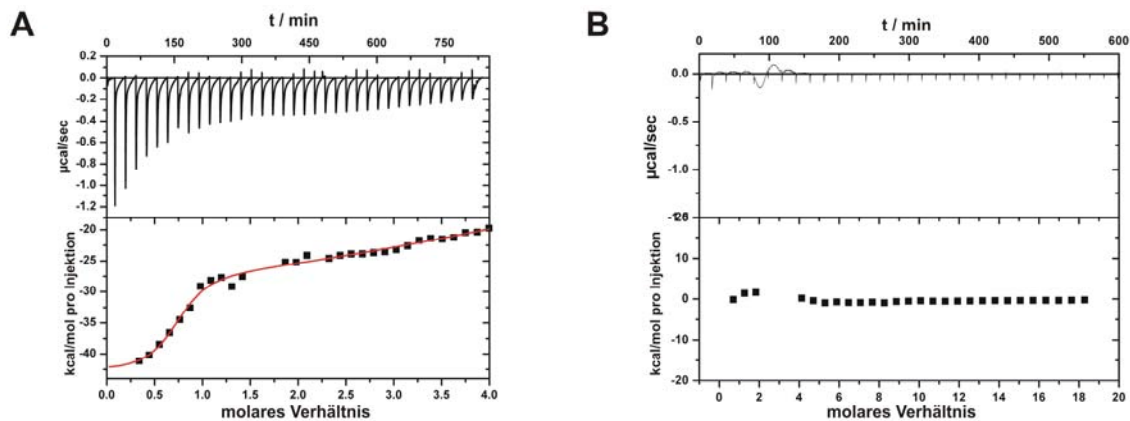


Abb. 70: A) ITC Messungen mit rPrP und EGCG bei 37°C. Die Konzentration des Inhibitors in der Spritze betrug 0,5 mM. EGCG wurde in Schritten von 8 μ l zu einer 27 μ M Lösung von rPrP titriert. Die Zeit zwischen den Injektionen betrug 1400 sec.

B) ITC Messung von rPrP mit EGC bei 37°C unter analogen Bedingungen wie für EGCG

Wie in Abb. 70 A zu erkennen ist, weist EGCG eine starke Bindung an rPrP auf wohingegen nach Zugabe von EGC kein Effekt zu beobachten ist. Die Titrationskurve für EGCG zeigt ein biphasisches Verhalten, welches sich unter Annahme eines Modells mit zwei Bindungsereignissen beschreiben lässt. Die Bindungsstöchiometrie des initialen Bindungsschrittes ist 1 : 1 bezogen auf das Verhältnis von rPrP zu EGCG und weist eine Dissoziationskonstante von 130 nM und eine Bindungsenthalpie von $\Delta H = -43$ kJ auf. Aus dem zweiten Bindungsereignis kann man entnehmen, dass es sich um mehrere Bindungsstellen handelt, an die EGCG mit wesentlich geringerer Affinität bindet. Dabei ist der Betrag der frei werdenden Energiemenge 1/3 dessen, was für den ersten Bindungsschritt

zu messen ist. Im Gegensatz dazu war keinerlei Komplexbildung bei der Titration mit ECG zu detektieren (Abb. 70 B). Dabei wurden die Messungen bei den Temperaturen 15°C, 25°C und 37°C durchgeführt um Effekte der Wärmekapazität c_p der Bindung auszuschließen. Da ECG keine signifikante Bindung aufwies, wurden die folgenden Untersuchungen an EGCG durchgeführt und ECG als nicht aktive Kontrolle verwendet.

3.4.2 Untersuchung der strukturellen Änderung von rPrP durch EGCG Bindung

Das lange Zeitintervall von 1400 sec, welches zwischen den Injektionen benötigt wurde bis die Mess- und Referenzzelle wieder im thermodynamischen Gleichgewicht waren, ist typisch für Bindungsprozesse, die mit einer konformationellen Änderung des Proteins einhergehen. Aus diesem Grund wurde das murine rPrP mit 5 äq EGCG für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mittels CD-Spektroskopie hinsichtlich einer Veränderung seiner Sekundärstruktur untersucht.

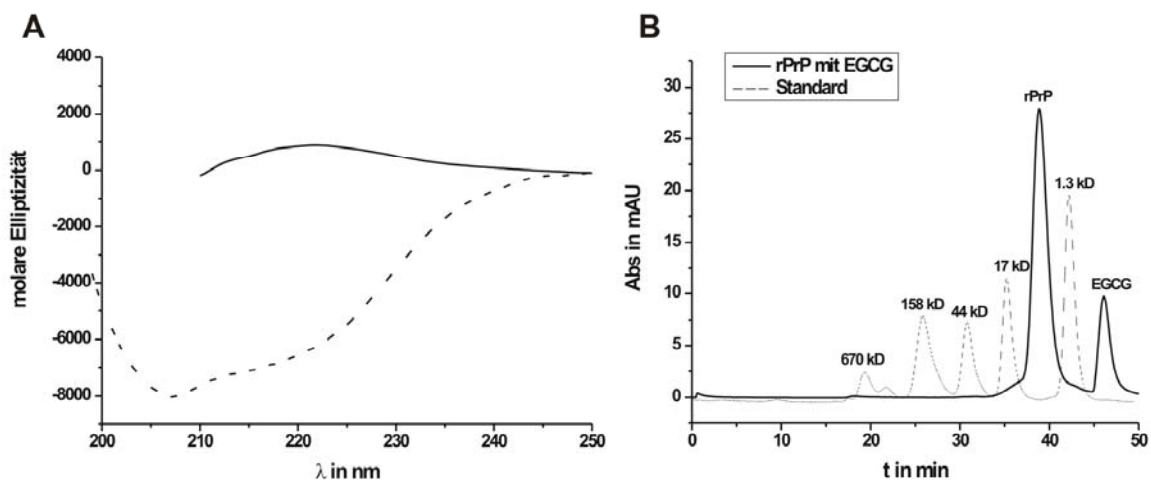


Abb. 71: A) CD-Spektrum von rPrP in der Abwesenheit (gestrichelte Linie) und in der Gegenwart von 5 äq von EGCG (schwarze Linie) nach einer Inkubationszeit von 2 h in 20 mM Tris-HCl bei pH 7,5; B) Analytische Größenausschlusschromatographie von rPrP nach 2 stündiger Inkubation mit 5 äq EGCG (schwarze Linie). Die gestrichelte Linie zeigt das Retentionsverhalten von Standardprotein mit bekanntem Molekulargewicht.

Das in Abb. 71 A dargestellte CD-Spektrum zeigt, dass die Inkubation des Proteins mit EGCG zu einem vollständigen Verlust der Sekundärstruktur des Proteins führt. Als Kontrolle wurde das Protein analog für 2 h bei RT ohne EGCG inkubiert, um auszuschließen, dass die gewählten Pufferbedingungen Einfluss auf die Faltung haben. Eine Analyse der erhaltenen

Proteinprobe durch Größenausschlusschromatographie (Sephadex S200, Amersham) ergab, dass zu diesem Zeitpunkt das entfallene rPrP überwiegend Monomer vorlag. Zur genaueren Analyse der Zeitabhängigkeit dieses Entfaltungsprozesses wurden zeitaufgelöste CD-Spektren aufgenommen.

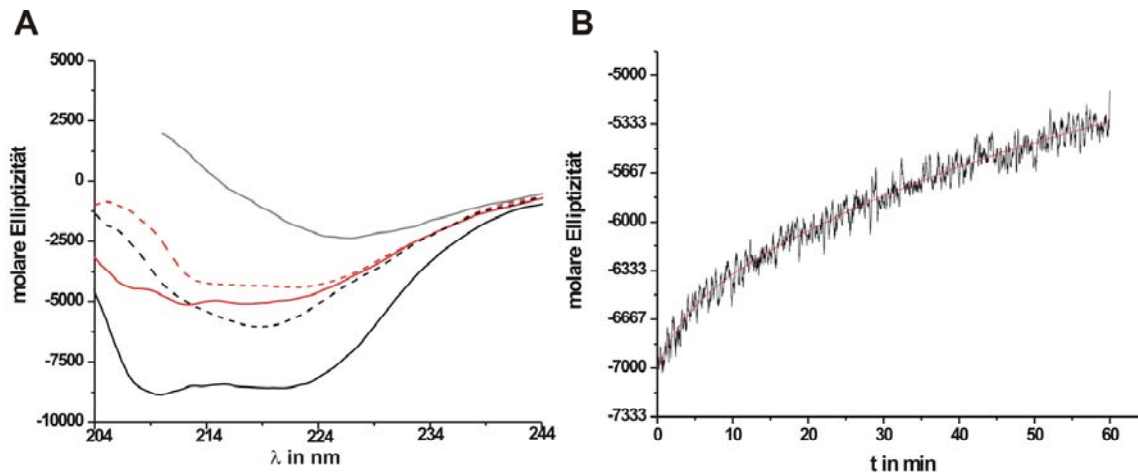


Abb. 72: A) CD-Spektren nach Inkubation von rPrP mit EGCG nach 0 min (schwarze Linie), 5 min (gestrichelte schwarze Linie), 10 min (rote Linie), 15 min (gestrichelte rote Linie) und 60 min (graue Linie)
B) Auftragung der molaren Elliptizität bei 222 nm gegen die Zeit nach Zugabe von 5 μ g EGCG in 20 mM Tris-HCl bei pH 7,5

Dazu wurden zum einen CD-Spektren in einem Wellenlängenbereich von 204 bis 245 nm in Zeitabständen von 5 min aufgenommen (Abb. 72 A). Zum anderen wurde die zeitliche Änderung der molaren Elliptizität bei der für α -helikale Strukturen charakteristischen Wellenlänge von 222 nm detektiert (Abb. 72 B). Durch die Zugabe von EGCG wird eine konformationelle Änderung des rPrP induziert, welche zunächst in einer schnellen Umwandlung eine Erhöhung des β -Faltblatt Anteils bewirkt. Charakteristisch für diese Sekundärstruktur ist die Ausbildung eines Minimums bei \sim 218 nm im Gegensatz zu 222 nm bei α -helikalen Strukturen. In den abgebildeten Spektren ist eine ebensolche Verschiebung der detektierten Elliptizität zu beobachten. Dieses Intermediat entfaltet sich dann langsam und führt zu dem bereits beschriebenen zunächst Monomeren Zufallsknäuel. Die genaue Kinetik dieser induzierten Umfaltung bzw. Entfaltungsreaktion ist in Abb. 72 B dargestellt. Auch hier erkennt man deutlich, dass der Prozess in eine schnelle strukturelle Veränderung und eine langsame zweigeteilt ist. Dabei wurde die Zeitabhängigkeit der molaren Elliptizität bei 222 nm aufgenommen. Man erkennt, dass die Änderung des Signals innerhalb der ersten 10 min am ausgeprägtesten ist. Dies ist in Einklang mit der zuvor beschriebenen Beobachtung, dass die

Zugabe von EGCG eine schnelle Erhöhung des β -Faltblatt Anteils induziert. Die folgende langsame Veränderung des Signals entspricht demnach der vollständigen Entfaltung des Proteins. Die transiente Änderung des Signals lässt sich unter der Annahme es handele sich um einen irreversiblen Prozess durch eine zweifache Exponentialfunktion beschreiben:

$$y = A1e^{(-x/t1)} + A2e^{(-x/t2)} + y0$$

3.4.3 Einfluss der Inhibitoren auf die *in vitro* Aggregation von rPrP

Die durch EGCG induzierte konformationelle Änderung des α -helikalen rPrP in ein Zufallsknäuel ist ein Indiz für eine spezifische Interaktion. Entscheidend für die Effektivität eines Inhibitors ist jedoch nicht nur die Bindung an die zelluläre Form des Proteins und dessen, im Fall von EGCG, beobachtete Entfaltung sondern auch die Verhinderung der Ausbildung fibrillärer Strukturen. Zu diesem Zweck wurden im Folgenden der Konversionsreaktion der Prion Proteine *in vitro* die Substanzen EGCG und EGC zugesetzt. Um die Bildung amyloider Aggregate *in vitro* zu beschleunigen, wurde das Protein mit einer Konzentration von 50 μ M in einen chaotrophaltigen Puffer transferiert. Dieser bestand aus 3 M Harnstoff, 1 M GdnHCl, 150 mM NaCl und 20 mM NaPi bei einem pH von 6,8. Zur Untersuchung des Einflusses von EGCG und EGC wurden diese zu 5 Mol-Äquivalenten zugesetzt. Das rPrP wurde unter diesen Bedingungen bei 37 °C für 3 Tage unter kontinuierlichen leichten Schütteln (600 rpm) inkubiert. Die Formation von Fibrillen wurde über die Ausbildung Proteinase K resistenter Partikel überprüft. Dazu wurden die entnommenen Proben für 10 min bei 15 000 rpm zentrifugiert und der erhaltene Überstand und das Pellet getrennt voneinander proteolytisch umgesetzt und mittels SDS/PAGE und Westernblotting unter Verwendung der A7 Antikörpers analysiert.

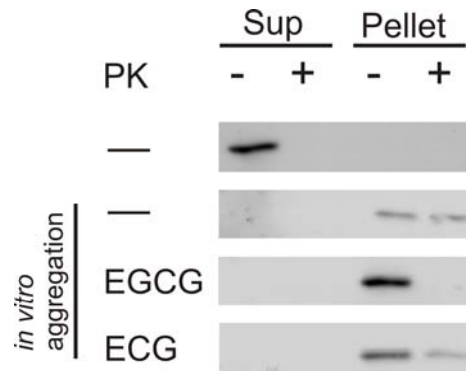


Abb. 73: Westernblotting Analyse mit dem A7 Antikörper der Formation von PK resistenten Materials. In der ersten Zeile ist als positiv Kontrolle für sensitives Material α -helikales Prion Protein aufgetragen. Die Proben wurden jeweils in den Überstand (Sup) ohne (-) und mit (+) PK sowie das Pellet unterschieden. In der zweiten Zeile ist die Konversionsreaktion von rPrP ohne Zusätze aufgetragen. In der dritten Zeile befindet sich aggregiertes Material mit 5 μ g EGCG und in der vierten der analoge Ansatz mit 5 μ g EGC.

Das Protein wurde zur Durchführung des Proteinase K Verdaus in einem 50 fachen Überschuss in Bezug auf die Massenkonzentration der Protease eingesetzt und in 50 mM Tris-HCl bei pH 8 für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 mM PMSF vor der SDS/PAGE Analyse abgestoppt. Als positiv Kontrolle für nicht aggregiertes Material diente lösliches α -helikales rPrP, welches sich ausschließlich im Überstand befand und sich vollständig umsetzen ließ (Abb. 73, Zeile 1). Als Kontrolle für eine nicht beeinflusste Fibrillogene wurde die Konversion ebenfalls ohne Zusätze durchgeführt. Wie in Zeile 2 der Abb. 73 zu erkennen ist, präzipitierte unter diesen Bedingungen das Protein quantitativ und die erhaltenen Aggregate wiesen einen hohen Anteil an Proteinase K resistentem Material auf. Die Zugabe von EGCG konnte zwar die Aggregation des rPrPs nicht verhindern, jedoch wurden die entstandenen Aggregate durch Proteolyse vollständig umgesetzt (Abb. 73, Zeile 3). Die Analyse der Proteinproben mit EGC ergab ebenfalls, dass das gebildete Präzipitat zu einem hohen Anteil PK resistentes Material enthielt, jedoch konnte im Vergleich zur *in vitro* Aggregation ohne Zugabe von EGCG/ECG eine Verringerung des Anteils beobachtet werden. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass sich die bei der Konversion des Prion Proteins *in vitro* entstandenen Aggregate bezüglich ihrer Morphologie unterscheiden. Ohne Zusätze wird unter den gewählten Bedingungen eine β -Faltblatt reiche Struktur gebildet, welche dann in amyloide Strukturen assembliert. Die Zugabe von EGCG jedoch bewirkt eine Entfaltung des Proteins, welche dann zu amorphen Präzipitaten führt, die zugänglich für Proteolyse sind.

Zur Unterstützung dieser Theorie wurden die erhaltenen Niederschläge mittels AFM bezüglich ihrer Morphologie untersucht. Dies geschah in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Winter an der Universität Dortmund. Dazu wurden die Proben 1 : 100 gegen 10 mM NaOAc, pH 5,5 dialysiert und anschließend analysiert.

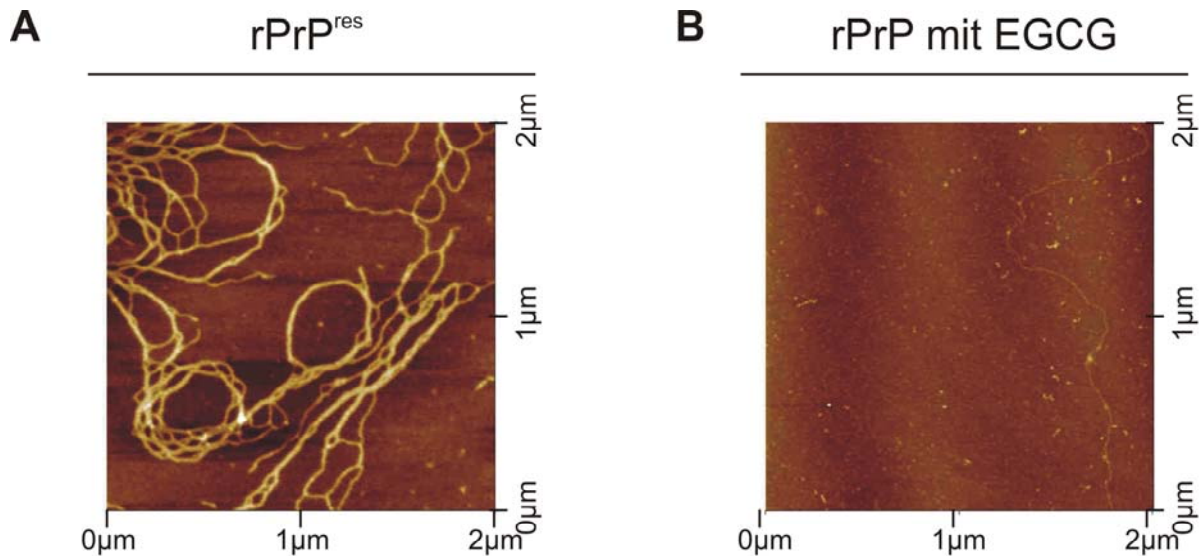


Abb. 74: AFM-Aufnahmen von rPrP^{res} ohne (links) und nach Inkubation mit 5 μ g EGCG während der Konversionsreaktion.

Bei der unbehandelten Probe war deutlich die Ausbildung von Fibrillen mit einer Höhe von 1,5 – 2,5 nm zu beobachten (Abb. 74 A). Die AFM Aufnahme des mit EGCG inkubierten Materials wiesen jedoch keine Fibrillen (Abb. 74 B) auf. Vielmehr war eine Vielzahl kleiner Aggregate zu erkennen, welche sich über die gesamte Fläche verteilen und nicht zu höheren Strukturen assemblieren. Damit bestätigen die AFM Aufnahmen die Vermutung, dass EGCG zwar die Aggregation nicht verhindert, das entstandene Präzipitat jedoch amorph ist und keine fibrillenartigen Überstrukturen bildet.

3.4.4 Einfluss der N-terminalen Sequenz auf die Bindung von EGCG

Für den Aggregationsprozess der Prion Proteine geht man, wie bereits in 3.3 beschrieben, zum jetzigen Zeitpunkt im Allgemeinen davon aus, dass die Aminosäurereste von 90-133 eine entscheidende Rolle spielen. So wurde von Ball et al.¹¹⁰ bereits bei der Charakterisierung eines synthetischen Prions welches aus nur 106 Resten bestand, die Notwendigkeit der Region von 89-140 beschrieben.

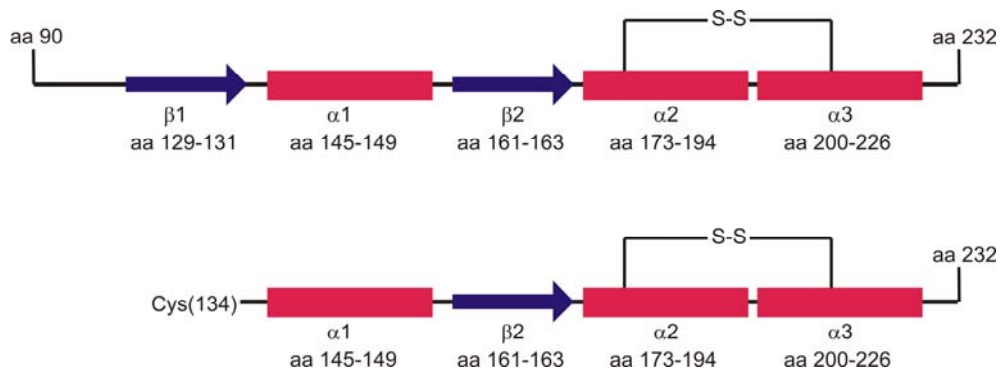


Abb. 75: Schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente des verwendeten rPrPs

Des Weiteren konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, dass für die Konversion des murinen Prion Proteins von $mPrP^C$ zu $mPrP^{Sc}$ in N2a-Zellen die palindromische hydrophobe Sequenz 112-AGAAAAGA-119 erforderlich ist¹¹¹. In Analogie zu diesen Ergebnissen soll nun untersucht werden, ob eine Deletion von $\Delta 90-133$ (siehe Abb. 75) ebenfalls einen Einfluss auf die Bindung von EGCG zu dem erhaltenen rPrP Fragment aufweist. Zu diesem Zweck wurde, das bereits für die Semisyntese von N-terminal modifizierten rPrP verwendete, verkürzte Konstrukt hinsichtlich seiner Bindung an EGCG untersucht.

3.4.4.1 Untersuchung der strukturellen Änderung von rPrP(134-232) durch Zugabe von EGCG

Zur Rückfaltung der N-terminale verkürzten murinen Prion Variante rPrP(134-232) wurde das Protein zunächst für 1,5 h in 6 M GdnHCl, 50 mM TrisHCl bei pH 8 mit dem Redoxsystem 5 mM GSH und 0,5 mM GSSG inkubiert. Anschließend erfolgte die Entfernung des Chaotrops und der Reduktionsmittel durch Gelfiltration über Sephadex G25 Material (Amersham) in Puffer mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5. Durch das entstandene N-terminale Cystein besteht die Möglichkeit der schnellen Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken, welche die mögliche Interaktion mit EGCG stören könnten. Zu diesem Zweck wurde bei der in Abb. 76 A dargestellten SDS/PAGE auf den Zusatz eines Reduktionsmittels im SDS-Probenpuffer verzichtet, dadurch können evtl. entstandene Dimere detektiert werden. Ferner wurde das erhaltene Protein bezüglich seiner Sekundärstruktur CD-spektroskopisch untersucht.

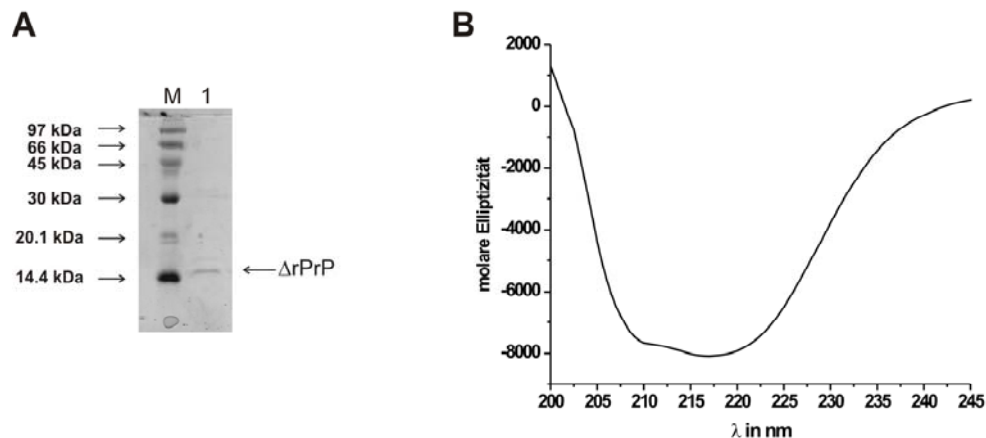


Abb. 76: A) SDS/PAGE des gefalteten PrP(134-232) in Spur 1 ohne Zusatz von Reduktionsmitteln mit M ist der LMW-Marker von Biorad bezeichnet.
B) CD-Spektrum des gefalteten rPrP(134-232) in 50 mM Tris-HCl

In der dargestellten SDS/PAGE (Abb. 76 A) tritt lediglich eine Proteinbande mit dem apparenten Molekulargewicht von ~ 14 kDa auf. Daraus kann geschlossen werden, dass unter den gewählten Bedingungen das Protein überwiegend Monomer vorliegt. Die Sekundärstruktur des Proteinfragmentes unterscheidet sich von der des rPrP(90-232) hinsichtlich des Anteils α -helikaler Elemente. Die charakteristischen Minima bei 208 und 222 nm sind weniger ausgeprägt, was darauf schließen lässt, dass die Gesamtstruktur des Proteins durch die N-terminale Deletion destabilisiert ist. Der Anteil an helikalen Strukturelementen konnte unter Verwendung der Jasco Software zu ca. 25 % bestimmt werden.

Im Folgenden wurde, entsprechend zu den vorhergegangenen Versuchen, diese verkürzte Variante des Prion Protein mit EGCG inkubiert und der Einfluss der Substanz auf die Sekundärstruktur des Proteins CD-spektroskopisch untersucht. Dazu wurde das Protein wie bereits beschrieben gefaltet und auf eine Konzentration von 0,2 mg/ml mittels Ultrafiltration aufkonzentriert. Als Kontrolle wurde rPrP(134-232) ohne Zugabe von EGCG unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Es wurden jeweils Proben nach 2 h und nach 24 h untersucht.

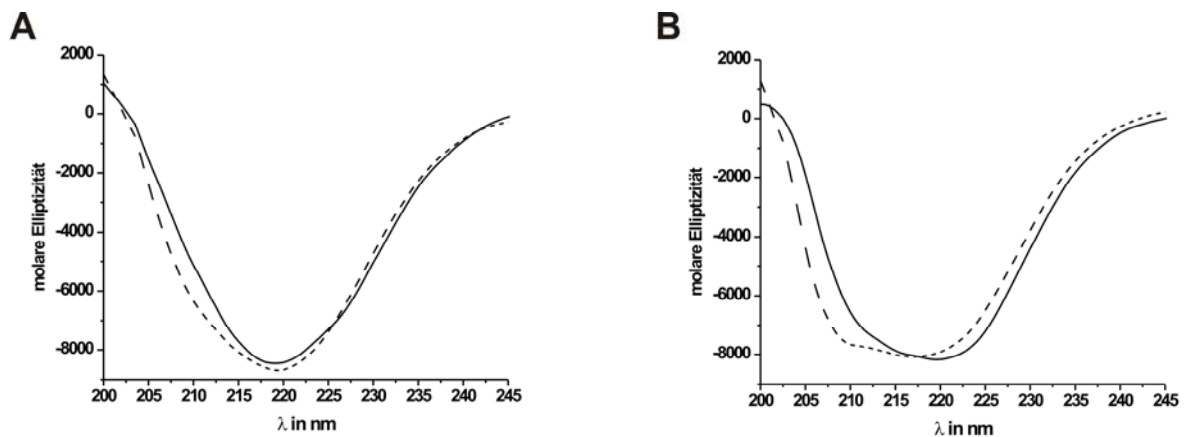


Abb. 77: A) CD-Spektren des mit 5 äq EGCG inkubierten rPrP(134-232). Dabei betrug die Inkubationszeit 2 h (gestrichelte Linie) und 24 h (schwarze Linie). B) CD-Spektren des rPrP(134-232). Dabei betrug die Lagerzeit bei RT 2 h (gestrichelte Linie) und 24 h (schwarze Linie).

Das CD-Spektrum des mit EGCG inkubierten verkürzten Prion Proteins weist eine Verschiebung des Minimums zu einer Wellenlänge von 220 nm und somit zu einer Erhöhung des Anteils von β -Faltblatt (Abb. 77 A, gestrichelte Linie). Im Gegensatz zu rPrP(90-232) wird das Proteinfragment jedoch durch EGCG nicht vollständig denaturiert, sondern verbleibt selbst nach einer Inkubationszeit von 24 h in der beschriebenen β -faltblattreichen Struktur (Abb. 77 A, durchgezogene Linie). Im Vergleich mit der unbehandelten Probe des verkürzten rPrP(134-232) (Abb. 77 B) ist zu erkennen, dass das Protein auch ohne Zugabe von EGCG seine Konformation zu einem höheren Anteils an β -Faltblatt verschiebt. Ferner wurde die zeitliche Abhängigkeit der molaren Elliptizität bei einer Wellenlänge von 222 nm detektiert. Dazu wurden die gleichen Bedingungen wie bei rPrP(90-232) gewählt, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten:

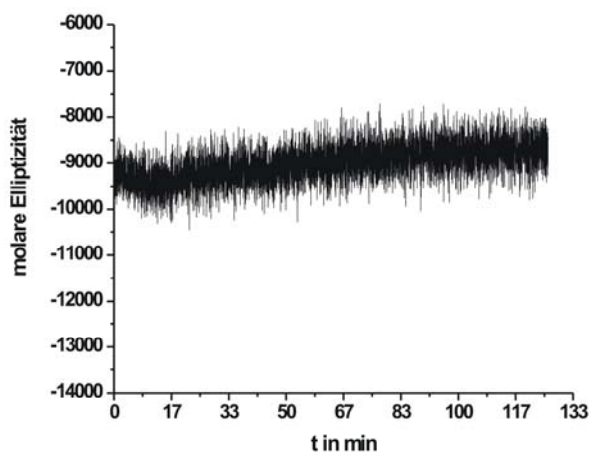


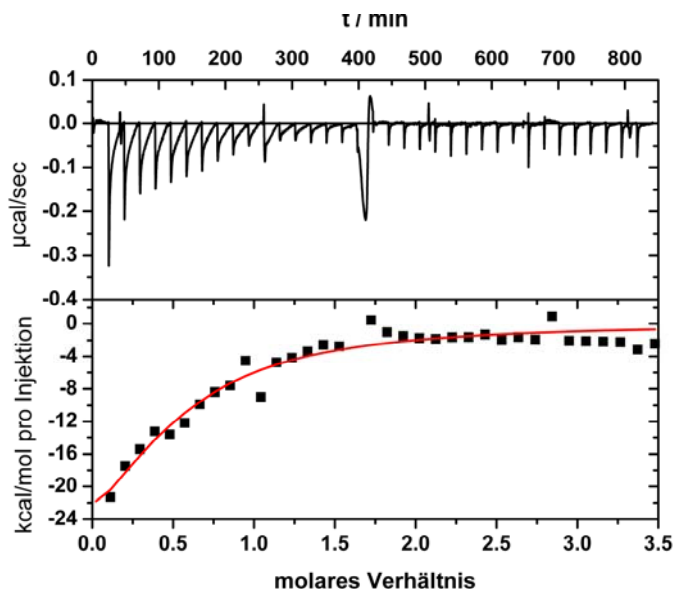
Abb. 78: A) Auftragung der molaren Elliptizität bei 222 nm gegen die Zeit nach Zugabe von 5 äq EGCG zu einer 31 μ M Lösung von rPrP(134-232)

Im Gegensatz zu rPrP(90-232) bleibt der Wert der molaren Elliptizität nach Zugabe von 5 äq EGCG zum N-terminal verkürzten rPrP(134-232) über den beobachteten Zeitraum von 2 h konstant. Aus den erhaltenen CD-spektroskopischen Untersuchungen, lässt sich folgern, dass EGCG spezifisch mit dem nativ gefalteten rPrP(90-232) wechselwirkt und durch die Deletion des N-Terminus um 44 Aminosäuren diese Interaktion nicht mehr möglich ist.

3.4.4.3 Bindung von EGCG an rPrP(134-232)

Die Notwendigkeit der Aminosäuren 90-133 für die Induktion einer konformationellen Änderung des Prion Proteins wurde bereits durch die CD-spektroskopischen Untersuchungen nachgewiesen. In Folgenden soll nun der Einfluss dieser Deletion auf die Affinität von EGCG zu dem Prion Protein Fragment durch isotherme Titrationskalorimetrie untersucht werden. Dazu wird das Protein wie bereits beschrieben zurückgehalten und mittels Ultrafiltration auf 31 μM aufkonzentriert und analog zu den Versuchen mit rPrP(90-232) mit einer 0,5 mM Lösung von EGCG in 8 μl Schritten titriert. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Injektionen betrug 1400 sec. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Software Packet Origin-ITC.

A



B

N	0,5
K ($\text{M}^{-1} \times 10^5$)	7,4
ΔH (kJ mol^{-1})	-42,2
ΔS ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$)	-114,0
ΔG (J mol^{-1})	-7,9
K_D (μM)	13,6

Abb. 79: A) ITC Messungen mit rPrP(134-232) und EGCG bei 37°C. Die Konzentration des Inhibitors in der Spritze betrug 0,5 mM. EGCG wurde in Schritten von 8 μl zu einer 31 μM Lösung von rPrP titriert. Die Zeit zwischen den Injektionen betrug 1400 sec. B) Aus der Messung erhaltene Parameter

Unter Verwendung eines Modells mit einem Bindungsereignis lassen sich aus der erhaltenen Titration die in Abb. 79 dargestellten thermodynamischen Größen entnehmen. Bei einer Temperatur von 37°C lag die ermittelte Dissoziationskonstante bei 13,6 µM. Im Vergleich zu 130 nM für rPrP(90-232) war die Affinität von EGCG zu dem Prion Protein mit N-terminaler Deletion um den Faktor 100 geringer.

Somit stimmen die Ergebnisse der ITC Messungen mit den CD-spektroskopischen Daten dahingegen überein, dass für eine effektive Bindung von EGCG *in vitro* der strukturierte Bereich des Prion Proteins, welcher über die Aminosäuren 90-232 verfügt, erforderlich ist. Zur Bestimmung der EGCG bindenden Aminosäuren sind weitere Studien unter Verwendung von NMR Spektroskopie in Planung.

4. Diskussion

4.1 Semisynthese von C-terminal lipidierten Proteinen

Die Herstellung von Proteinen mit posttranslationalen Modifikationen ist oft für den Erhalt ihrer Funktionalität erforderlich. Die Expression von Proteinen aus Säugetieren in eukaryotischen Systemen gewährleistet deren vollständige Prozessierung und führt zu aktiven Proteinen. Jedoch sind die mit diesen Systemen erhaltenen Ausbeuten der oftmals zu gering für eine vollständige biophysikalische Charakterisierung der Proteine. Im Gegensatz dazu liefert die Verwendung prokaryotischer Systeme in der Regel ausreichende Proteinmengen, weist jedoch den Nachteil auf, dass die keine posttranslationalen Modifikationen der Proteine erfolgt. Da die Funktion der Proteine jedoch häufig von ihren posttranslationalen Modifikationen abhängt ist auch diese Art der rekombinanten Proteinexpression nur eingeschränkt anwendbar.

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung von Proteinen stellt die chemische Proteinsynthese dar. Dieser Ansatz weist den großen Vorteil auf, dass neben natürlich auftretenden Modifikationen wie Phosphorylierung oder Lipidierung, auch die Inkorporation von Reportermolekülen, wie Fluoreszenz- oder ESR Sonden sowie einer Vielzahl anderer nicht natürlicher Modifikationen möglich ist.

Durch die Kombination der chemischen Proteinsynthese mit der rekombinanten Proteinexpression unter Verwendung von Inteinen ist nun der Zugang zu posttranslational modifizierten Proteinen beliebiger Größe in guten Ausbeuten gewährleistet⁸¹. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei auf der Inteinchemie basierende Methoden zur C-terminalen Lipidierung von Proteinen etabliert. Dabei fand zum einen die Expressed Protein Ligation Verwendung und zum anderen der Prozess des Protein *trans*-Spleißens. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Etablierung einer Synthese von lipidierten murinen Prion Protein Varianten mittels Protein *trans*-Spleißens, zu deren Charakterisierung. Zusätzlich konnte an Hand dieser Methode eine generelle Strategie zur Immobilisierung von Proteinen auf Nanopartikeln an Hand des Modellsystems eGFP entwickelt werden.

4.1.1 Charakterisierung von lipidierten murinen Prion Protein Varianten

Zahlreiche Untersuchungen des Einflusses der posttranslationalen Modifikation des Prion Proteins bei der Entstehung der TSEs wurden bereits durchgeführt. Neben der Rolle der N-Glykosylierung stellt vor allen Dingen die Bedeutung der Membranverankerung eine zentrale Fragestellung bei der Umwandlung von PrP^C in seine pathogene PrP^{Sc} Form dar. Untersuchungen an transgenen Mäusen, welche das Prion Protein in einer ankerfreien Form (Δ GPI-PrP) exprimieren, haben gezeigt, dass die Ausbildung der klinischen Symptome einer TSE Erkrankung bei diesen Tieren ausblieb³⁰. Wurde jedoch Δ GPI-PrP mit dem Wildtyp co-exprimiert, führte dies zu einer erheblichen Beschleunigung des Krankheitsverlaufs. Von Cox et al. angestellte Vermutungen gehen von einer erhöhten Expressionsrate des GPI-ankerfreien PrP (Δ GPI-PrP) im Vergleich zum Wildtyp (wtPrP) aus. Das daraus gebildete PrP-res kann nach Cox ebenfalls die wtPrP Konversion induzieren⁶². Somit ist es zur Ausbildung einer TSE erforderlich, dass zumindest ein Teil des PrPs eine Membranständigkeit aufweisen muss. Das Fehlen des Membranankers in den in *E.coli* exprimierten Prion Proteine erfordert die Einführung artifizierlicher Ankersysteme zur Aufklärung des Einflusses dieser Lipidierung. Die in der Literatur bereits beschriebenen Möglichkeiten zur Einbringung derartiger Modifikationen beruhen auf der Bildung von Disulfidbrücken. Bei der von Eberl et al. beschriebenen Methode findet eine Prion Variante Verwendung, welche über eine C-terminale Verlängerung der Sequenz um einen Linker bestehend aus 5 Glycinresten und einen Cysteinrest verfügt. An dieses wird im Folgenden das bereits in Liposomen inkorporierte Lipid PDP-DHPE [(N-((2-pyridyldithio)-propinyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)] mit einer cysteinreaktiven Gruppe unter Ausbildung eines Thioesters gekoppelt⁷⁰. Bei der zweiten Lipidierungsstrategie von Hicks et al. wird das C-terminale Serin in ein Cystein mutiert, welches dann mit 3-(Hexadecane-1-sulfonyl)-2-(hexadecane-1-sulfonylmethyl) propionic acid 2-[2-(2-[2-(2-methanesulfonylsulfanylethoxy)ethoxy]ethoxy}ethoxy)ethoxy] Ethyl Ester umgesetzt wurde⁶⁸. Ein ähnlicher Ansatz wurde ebenfalls von Breydo et al. beschrieben bei dem unter Verwendung von Maleimidchemie eine Myristoylverankerung des Prion Proteins durch die Reaktion mit einem an Position 230 eingeführten Cysteinrest erreicht wurde, diese beiden Strategien gewährleisten die Lipidierung über Ausbildung einer Disulfidbrücke⁶⁹. Der offensichtliche Nachteil der beschriebenen Methoden besteht darin, dass eine korrekte Ausbildung der Disulfidbrücke des Prion Proteins zwischen den Cysteinresten C179 und C214 gewährleistet sein muss, da die Markierung aller Cysteine statistisch erfolgen würde.

Zur Umgehung der Problematik einer möglichen mehrfachen Markierung der Proteine wurde eine neue allgemeine Methode zur Einführung von Lipidmodifikationen in das Prion Protein unter Verwendung der EPL etabliert. Diese Reaktion toleriert interne Cysteine der Proteine. Dennoch erfordert sie zur Ausbildung einer reaktiveren Thioesterspezies den Zusatz eines Thiolüberschusses zur Beschleunigung der Ligation. Diese Bedingungen führen zur Reduktion der Disulfidbrücke des Proteins, so dass sie nicht zur Darstellung lipidierter PrP^C Varianten geeignet ist. Ferner kann die lange Lagerung des Proteins in harnstoffhaltigen Puffern, welche der Solubilisierung des Proteins dienen, zur unerwünschten Carbamoylierung führen, welche einen Einfluss auf die Aggregationseigenschaften des Proteins haben kann ¹¹². Eine Möglichkeit der Semisyntese unter chaotrop-freien Bedingungen bietet der Prozess des Protein *trans*-Spleißens, bei dem Inteine in zwei oder mehr Teile getrennt werden, welche nach Kombination wieder ein funktionelles Spleißelement bilden. Dieser Prozess eignet sich somit, neben der *in vitro* Anwendung, ebenfalls zu Semisyntese von lipiderten Proteinen *in vivo*. Sowohl die klassische EPL, als auch das Protein *trans*-Spleißen liefert im Rahmen dieser Arbeit Ausbeuten der lipiderten Prion Protein Varianten von ~10 % bezogen auf die Menge an heterolog in *E.coli* exprimierten Ausgangsprotein.

Zur Effizienzsteigerung des Protein *trans*-Spleißens war der Zusatz geringer Mengen reduzierender Agenzien wie DTT, TCEP oder MesNa in Konzentrationen von 5 bis 10 mM erforderlich. Unter diesen, lediglich leicht reduzierenden Bedingungen, bleibt die intramolekulare Disulfidbrücke, welche von den beiden Helices B und C abgeschirmt wird, vermutlich intakt, da keine Änderung der Struktur mittels CD-Spektroskopie beobachtet werden konnte. Die zum Teil oxidativen Bedingungen während der Aufreinigung können zur Bildung intermolekularer Disulfidbrücken zwischen den Proteinen führen. Da es für den Mechanismus des Protein *trans*-Spleißens jedoch notwendig ist, dass die beteiligten Cysteine von Extein und Intein in ihrer reduzierten Form vorliegen, ist es anzunehmen, dass die Zugabe eines Reduktionsmittels das Intein in seiner aktiven Form stabilisiert ¹¹³. Diese Beobachtung deckt sich mit denen von Giriat et al. ⁸⁶, bei denen die Semisyntese unter Verwendung des Splitinteins DnaE *in vitro* ebenfalls den Zusatz von DTT erforderte. Für *in vivo* Anwendungen können die reduzierenden Bedingungen im Cytoplasma eine Reduktion des Extein Cysteins bewirken.

Nach Optimierung der Bedingungen des *trans*-Spleißens zur Darstellung der lipiderten rPrP^{palm} Varianten konnte deren Darstellung unter chaotropfreien Bedingungen und Verwendung nicht ionischer Detergenzien durchgeführt werden. Die Detergenzien solubilisieren das in wässrigen Puffern ansonsten kaum lösliche lipiderte C-terminale

Inteinsegment und gewährleisten somit die Löslichkeit der funktionellen Domäne. Eine weitere Zunahme der Effizienz des Prozesses um ca. 50 % konnte durch die Verwendung von DOPC Liposomen erreicht werden. Dabei findet die *Trans*-Spleißen Reaktion an der Außenseite der Vesikel mit dem zuvor inkorporierten DnaE^C-Palm Segment statt. Vermutlich wird durch diese Membranlokalisation der ansonsten aggregationsanfällige Komplex der beiden Segmente in Lösung stabilisiert.

Die Tendenz der $\alpha \rightarrow \beta$ Umwandlung und Aggregation des lipidierten Proteins wurde zuerst in *in vitro* Aggregationsassays untersucht. Dabei wurde zum einen die Bildung von Proteinase K resistentem rPrP-res untersucht und zum anderen die Kinetik der Fibrillogenese mit Hilfe der Thioflavin T (ThT) Fluoreszenz beobachtet. Die aus den beiden Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass sich die Aggregation von rPrP^{Palm} um einen Faktor von 5 bis 6 in Gegenwart von Lipiden verlangsamt. Führt man die Reaktion von rPrP^{Palm} in Abwesenheit von SUVs durch, zeigt das Protein ein zum nicht modifizierten PrP analoges Aggregationsverhalten. Die Inkorporation in Membranen hat demnach eine Stabilisierung des rPrP^{Palm} zur Folge. Auf die Fibrillogenese des nicht modifizierten Prion Proteins hatte der Zusatz von Liposomen keinerlei Einfluss.

Die erhaltenen Aggregate wurden des Weiteren mittels AFM analysiert. Dabei zeigte sich, dass im Fall des lipidierten rPrP die ausgebildeten fibrillären Strukturen sich deutlich von denen des unmodifizierten Proteins unterscheiden. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Fibrillen des rPrP hatten eine Höhe von 1,5 bis 2,5 nm, im Gegensatz dazu wiesen die rPrP^{Palm} Fibrillen lediglich eine Höhe von 1 bis 1,5 nm, ferner sind in der Aufnahme auch eine Vielzahl von kleinen Partikeln mit einer Höhe von 0,5 nm zu erkennen. Nach neueren Erkenntnissen ist nicht auszuschließen, dass gerade die kleinen Aggregate eine höhere Infektiosität aufweisen⁴³. Was einen direkten Einfluss der Membranverankerung auf die Bildung dieser hochinfektösen Partikel *in vivo* unterstützen würde.

Zusammenfassend lässt sich schließen, dass die Membranverankerung das lipidierte Protein in seiner löslichen Form stabilisiert. Als Folge dessen ist das Protein selbst nach Zugabe von Chaotropen weniger anfällig für die Aggregation. Von Baron et al. durchgeführte Studien mit aus Fibroblasten isolierten, vollständig posttranslational modifizierten Prionen weisen jedoch auf einen protektiven Effekt der Membranlokalisation hin³¹. Dabei wurde in einem zellfreien Konversionsassay natives, GPI-verankertes PrP^C an Sphingolipid und Cholesterol-reiche Liposomen (SCRL) gebunden und durch die Zugabe von PrP^{Sc} aus dem Homogenisat von Hamster Nervengewebe die Umfaltung induziert. Dabei war keinerlei Ausbildung von Proteinase K resistentem Material zu beobachten. Erst nach Entfernung des GPI Ankers vom

Protein durch die Zugabe von PI-PLC (Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C) wurde eine Zunahme von PrP-res detektiert. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den durchgeführten Konversionsreaktionen mit rPrP^{Palm}, bei der sich die Bildung PK resistenter Aggregate durch die Insertion des lipidierten Proteins in DOPC Liposomen ebenfalls erheblich verlangsamte und somit ebenfalls ein protektiver Effekt der Membranverankerung zu erkennen war. Es ist zu vermuten, dass die verminderte Diffusionsgeschwindigkeit des Proteins in den DOPC Vesikeln die Konversionsgeschwindigkeit, durch eine geringere Wahrscheinlichkeit der Wechselwirkung zweier PrP Moleküle, herabsetzt. Im Widerspruch dazu stehen die von Eberl et al. Durchgeführten Studien. Bei dem von ihm verwendeten PrP-SS-PDHPE-Konstrukt war kein Effekt auf das Aggregationsverhalten auf Grund der Membranverankerung zu beobachten. Im Gegensatz zu dem hier untersuchten System wurde von Eberl et al. jedoch das Prion Protein mit der unstrukturierten N-terminalen Domäne (AS 23-232) verwendet. Da ein Einfluss dieses Segments unter Umständen auch eine Änderung des Aggregationsverhaltens bewirkt, ist ein direkter Vergleich der beiden unterschiedlichen Konstrukte nur bedingt möglich ¹¹⁴.

Die Grundlage der bisher diskutierten Untersuchungen der PrP Konversion beruhten auf *in vitro* Studien. Neben dem Einfluss der Membranbindung des Prion Proteins auf den Verlauf TSE Erkrankungen, wird ebenfalls die Lipidkomposition und Ladung der jeweiligen Membran als Einflussfaktor diskutiert. Dabei geht man davon aus, dass PrP *in vivo* in geordnete, Sphingomyelin und Cholesterol-reiche Bereiche der Membran segregiert. Zu diesem Schluss kam man auf Grund von Extraktionsexperimenten von FRT (Fischer rat thyroid) Zellen, bei denen PrP in DRMs (**D**etergent **R**esistent **M**embranes), welche reich an Sphingomyelin und Cholesterol sind, detektiert werden ¹¹⁵. Es wird vermutet, dass die Ladung der dort enthaltenen Lipide eine Konversion des Proteins in eine β -Faltblatt reiche Struktur begünstigt. Untersuchungen mit nicht verankertem PrP haben gezeigt, dass das Protein mit negativ geladenen Lipiden interagiert und dadurch ferner eine strukturelle Veränderung des Prion Protein zu beobachten ist.

In jüngsten Untersuchungen ist eine Begünstigung der PrP^{Sc} Bildung durch Zugabe negativ geladener Substanzen bei der bereits in der Einleitung beschriebenen PMCA detektiert worden ⁵⁸. In der von Sanghera et al. ¹¹⁶ veröffentlichten Studie wurde die Bindung des nicht posttranslational modifizierten syrischen Hamster Prion Proteins SHaPrP(90-231) sowohl zu negativ geladenen, zwitterionischen und raftähnlichen Membranen untersucht. Dabei zeigt sich, dass PrP an negativ geladene und raft-Membranen jedoch nicht an zwitterionische bindet. Die Affinität zu negativ geladenen Membranen beruht auf elektrostatischen und

hydrophoben Protein-Lipid Interaktionen. Durch diese Wechselwirkung erhöht sich der β -Faltblatt Anteil des Proteins, welches die Integrität der Lipid-Doppelschicht zerstört. Im Gegensatz dazu beruht die Insertion des Proteins in raft-Membranen lediglich auf hydrophoben Wechselwirkungen und stabilisiert PrP in seiner α -helikalen Form. Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse stimmen mit diesen Beobachtungen überein. Es war keinerlei Bindung des nicht lipidierten Prion Proteins an die zwitterionischen DOPC Liposomen zu erkennen, wohingegen rPrP^{Palm} in dem durchgeführten Sucrose-Gradienten ausschließlich mit den SUVs colokalisierte. Ferner konnte diese Membranverankerung durch die zwischen Protein und Anker eingeführt Proteaseschnittstelle wieder vollständig gelöst werden. Daraus, sowie aus den mittels CD-Spektroskopie erhaltenen strukturellen Daten, kann gefolgert werden, dass durch die Insertion in die zwitterionischen DOPC Liposomen keine strukturelle Änderung im Protein induziert wird, sondern dieses in seiner nativen Form stabilisiert wird. Weiteren Aufschluss über die 3D-Struktur des rPrP^{Palm}s in der membrangebundenen Form können mittels NMR und ATR erlangt werden. Ferner konnte keine Destabilisierung der SUVs durch das Protein detektiert werden. Nach Auftrennung des SUV Proteingemisches in einem Sucrose-Gradienten wurde eine homogene SUV Population in Gegenwart des lipidierten Proteins mittels DLS, zur Bestimmung des hydrodynamischen Radius der Liposomen, detektiert. Das beobachtete Migrationsverhalten des nicht lipidierten PrPs ist identisch mit den von Wang et al.¹¹⁷ erhaltenen Ergebnissen unter Verwendung von POPC.

Nach der spezifischen Inkorporation des rPrP^{Palm} in artifizielle Model Membranen und Analyse der Aggregationseigenschaften *in vitro*, wurde im Folgenden die Bindung des Proteins an die Membran von murinen Neuroblastom Zellen *in vivo* getestet. Untersuchungen rekombinanter Prion Proteine haben gezeigt, dass eine Erhöhung der Ionenstärke eine Destabilisierung des Proteins durch eine Störung der intramolekularen Salzbrücken des Proteins bewirkt. Unter physiologischen Bedingungen wird demnach eine Konversion von PrP^C nach PrP^{Sc} begünstigt. Der Einsatz von Detergenzien oder Vesikeln ermöglichte die Darstellung von löslichen lipidierten Prion Proteinen auch unter physiologischen Bedingungen mit einer NaCl Konzentration von 150 mM und einem pH von 7,5. Durch die Inkorporation in Liposomen oder auch in Detergenzmizellen wird das Protein nach den vorliegenden Ergebnissen auch unter physiologischen Bedingungen in seiner nativen Form stabilisiert, was einen Transfer des α -helikalen Proteins auf Membranen in Zellkultur basierten Untersuchungen ermöglicht.

Dieser Transfer von rPrP^{Palm} aus seiner künstlichen Liposomenumgebung auf die Außenseite der Membran lebender Zellen erwies sich zunächst als problematisch. Die Verwendung solubilisierender Detergenzien in geringen Konzentrationen, wie DDM, OG oder auch NP-40 führte nach einer maximalen Überlebensdauer von 4 h zur Lyse der Zellen. Damit können unter Verwendung von Detergenzien keine weiteren Studien, wie die induzierte Konversion des PrP^{Palm} auf der Oberfläche der Zellen, stattfinden. Als nächstes wurde der Transfer mit bereits in Liposomen rekonstituiertem rPrP^{Palm} untersucht. Dabei wurde keinerlei Transfer des Proteins auf die Zellen detektiert. Es ist zu vermuten, dass die artifiziellen DOPC-Membranen auf Grund von elektrostatischer Abstoßung nicht zur Fusion mit der Zellmembran tendieren und somit kein Transfer stattfand. Ferner ist die Verankerung des zweifach lipidierten Proteins mit der Membran so stabil dass die Proteine nicht aus ihrer Lipidumgebung austreten.

Unter Verwendung des kationischen Protein-Transfektionsreagenzes Pro-Ject (Pierce), konnte schließlich rPrP^{Palm} in ausreichenden Mengen auf die Oberfläche der N2a-Zellen übertragen werden. Der Transfer des Proteins wird dabei durch die elektrostatische Anziehung der verwendeten kationischen Liposomen mit der überwiegend negativ geladenen Zellmembran erreicht. Eine Präzipitation des rPrP^{Palm} auf der Oberfläche der Zellen konnte durch indirekte Immunofluoreszenz ausgeschlossen werden, da eine analoge Lokalisation des lipidierten Proteins mit vollständig posttranslational modifiziertem PrP^C auf der Zellmembran beobachtet wurde. Diese, auch von Hicks et al. ⁶⁸ verwendete, Methode erlaubt jedoch keine Unterscheidung zwischen aggregiertem Material und in die Membran inseriertem rPrP^{Palm}. Aus diesem Grund wurden im Weiteren Membranextraktionsexperimente durchgeführt. Die Zellen wurden dazu mit Triton-X100 und DOC lysiert. Dieses Detergenzgemisch erlaubt es zwischen Aggregaten und membraninsertiertem Material zu unterscheiden ¹¹⁸. Durch die Westernblotting Analyse der erhaltenen Membranextrakte konnte gezeigt werden, dass rPrP^{Palm} in einer löslichen Form an der Zellmembran der N2a Zellen lokalisiert ist. Um weitere Informationen über die Lokalisation der lipidierten Prionen in der Membran zu erhalten, wurden mit den erhaltenen Extrakten Flotationsuntersuchungen vorgenommen. Die Analyse des dazu eingesetzten Sucrose-Stufen-Gradientens ermöglicht die Unterscheidung zwischen geordneten Microdomänen der Membran und unstrukturierten Bereichen. Die Auswertung ergab, dass sich das Flotationsverhalten von rPrP^{Palm} von dem des nativen, vollständig posttranslational modifizierten PrP^C unterscheidet. Wo PrP^C in dem Gradienten bis zur Deckschicht aufschwimmt, verbleibt rPrP^{Palm} in der Mitte des Gradientens. Dieses Verhalten lässt vermuten, dass die beiden Proteine in unterschiedliche Bereiche der

Zellmembran segregieren, was unter Umständen auf die Unterschiede in der Verankerung zurückzuführen ist. PrP^C inseriert mit seinem nativen GPI Anker in die Außenseite der Plasmamembran, wohingegen die Bindung von rPrP^{Palm} durch zwei Palmitoylreste gewährleistet ist. Obwohl diese beiden Arten der Membranverankerung von Proteinen die gleiche Präferenz zu geordneten Membranbereichen ausweisen⁹⁴, befindet sich an dem artifiziiellen System ferner der PEG Solubilisierungstag. Diese Modifikation verringert unter Umständen die Tendenz des Proteins in die strukturierten Mikrodomänen der Membran zu segregieren. Um in weiteren Studien die gleiche Lokalisation des Proteins zu gewährleisten, ist eine Einführung anderer Ankersysteme notwendig. Dazu wurde zum einen bereits ein Peptid synthetisiert, bei dem die Entfernung des Solubilisierungstag durch Inkubation mit der TEV-Protease möglich ist.

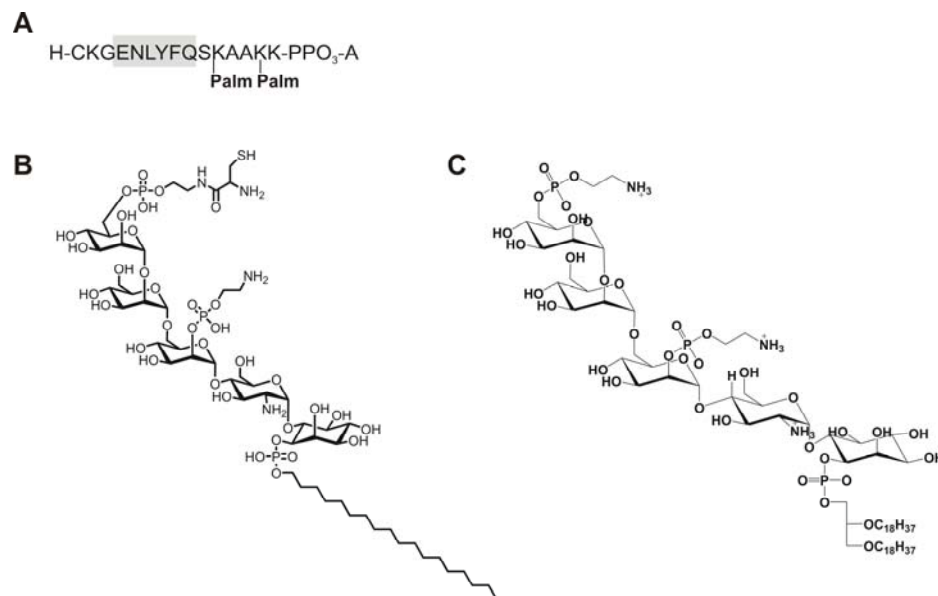


Abb. 80: A) Sequenz des verwendeten palmitoylierten Peptids zur C-terminalen Modifikation, in grau unterlegt ist die Erkennungssequenz des TEV-Protease; B) Synthetischer GPI-Anker; C) natürlicher GPI-Anker

Ferner ist im weiteren Verlauf dieses Projektes die Verankerung des Prion Proteins mit einem synthetisch dargestellten, natürlichen GPI Anker anstelle eines artifiziiellen lipidierten Peptides (Abb. 80 A) angestrebt. Dies wäre ein bedeutender Vorteil bei der Untersuchung des Einflusses dieser posttranslationalen Modifikation. In Planung ist die Darstellung lipidverankerten Prion Protein mit der in Abb. 80 B gezeigten einfach lipidierten synthetischen GPI-Anker Variante. Im Vergleich zum natürlichen (Abb. 80 C) ist das Ethanolamin der ersten Mannoseeinheit mit einem Cystein modifiziert, was eine Kopplung an das PrP mittels EPL ermöglicht.

4.1.2 Immobilisierung von eGFP auf lipidierten Nanopartikeln

An Hand der zuvor etablierten Methode zur Lipidierung der Prion Proteins, wurde eine generelle anwendbare Strategie zur Immobilisierung von Proteinen auf Oberflächen entwickelt. Durch diese Methode soll eine biophysikalische Charakterisierung sowie Aufreinigung von membranverankerten Proteinen erleichtert werden. Zu diesem Zweck wurde in der vorliegenden Arbeit an Hand eines Modellsystems das grünfluoreszierende Protein eGFP durch den semisynthetischen Prozess des Protein *trans*-Spleißens kovalent palmitoyliert und auf lipidierten SiO_x-Nanopartikeln immobilisiert¹⁰⁶.

Analog zu den Ergebnissen für das murinen Prion Proteins war auch hier der Zusatz geringer Mengen von reduzierenden Agenzien zur Generierung eines aktiven Protein-Spleiß Elements notwendig. Die Affinität des rekombinanten eGFP-DnaE^N und des synthetischen DnaE^C-Palm zueinander mittels isothermer Titrationskalorimetrie bestimmt. Dabei wies das Verhältnis von eGFP-DnaE^N zu DnaE^C-4 eine Stöchiometrie von 1 : 1 mit einem Dissoziationskonstante K_D von 3,5 μ M auf. Die hier bestimmte Konstante weicht um einen Faktor von 84 von den in der Literatur beschriebenen K_D -Werten von 42 nM ab^{84,119}. Die Beobachtung lässt sich damit erklären, dass das verwendete C-terminale Fragment des DnaE Splitinteins im Vergleich zu den Daten von Martin et al. eine Deletion der drei flankierenden Aminosäuren CFN, welche aus dem ursprünglichen Exteins stammen, aufwies. Zwar war in vorhergehenden Untersuchungen kein Einfluss auf die Kinetik der Reaktion zu beobachten¹⁰¹, jedoch könnten die Aminosäuren einen stabilisierenden Einfluss auf die Konformation von DnaE^C haben und dessen Affinität zur N-terminalen Domäne erhöhen. Es ist nicht auszuschließen, dass nach der synthetischen Darstellung des C-terminalen Segmentes keine vollständige Generierung der Aktivität erzielt werden konnte. Zwar ist dieses nach RP-HPLC chromatographischer Aufreinigung in wässrigen Puffern löslich, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die eingenommene Konformation nicht der nativen entspricht. Ein Verlust der Aktivität wird unter Umständen durch die Deletion der flankierenden Aminosäuren noch begünstigt.

Die Darstellung und Charakterisierung von eGFP^{Palm} erfolgte analog zu den Experimenten des lipidierten Prion Proteins. In den durchgeführten Untersuchungen des Einflusses verschiedener Detergenzien auf das Protein *trans*-Spleißens zeigte sich, dass die C-terminale Lipidierung von eGFP auch in Abwesenheit solubilisierender Agenzien nicht zur Präzipitation des Proteins führt. Durch den Zusatz von nicht ionischen Detergenzien (OG, DDM) konnten die erzielten *trans*-Spleißens Ausbeuten nicht weiter gesteigert werden, wohingegen die denaturierende Wirkung von CTAB und DPC eine Reaktion vollständig inhibitiert. Die

Löslichkeit des eGFP wird durch die Einführung der beiden Palmitoylreste nicht beeinträchtigt. Die Auswertung des Sucrose-Gradientens zeigte jedoch ebenfalls eine Co-Lokalisation des palmitoylierten eGFP mit den DOPC SUVs, wohingegen eGFP-DnaE^N nicht in den Gradienten migriert. Somit ist eine stabile Assoziation des lipidierten eGFP trotz seiner hohen Löslichkeit auch in Lipid freier Umgebung mit den artifiziellen Membranen sichergestellt.

Zur Immobilisierung dieser lipidierten eGFP Variante wurden im Folgenden SiO_x-Nanopartikel verwendet. Die Bildung einer Lipid-Doppelschicht auf diesen Partikeln wurde durch die Inkubation mit DOPC Vesikeln gewährleistet. Um eine quantitative Verankerung der Proteine sicherzustellen, wurden die Partikel im Überschuss eingesetzt. Eine unspezifische Interaktion des Proteins mit den Nanopartikeln konnte ausgeschlossen werden. In Analogie zu den lipidierten Prion Proteinen befindet sich auch im Fall der eGFP^{Palm} die Erkennungssequenz der TEV-Protease zwischen Protein und Lipidanker.

Nach Inkubation der mit eGFP^{Palm} beladenen Partikel mit der Protease lies sich das immobilisierte Protein zu 50% wieder von dem Anker lösen. Der unvollständige Proteaseverdau ist vermutlich auf die räumliche Nähe der Erkennungssequenz zu den Nanopartikeln zurückzuführen. Dies bewirkt vermutlich eine verminderte Zugänglichkeit der TEV-Protease. Ferner ließ sich das lipidierte eGFP auf die Membran lebender Zellen durch die Inkubation der Zellen mit in DOPC SUVs rekonstituierten eGFP^{Palm} erzielen. Im Gegensatz dazu wurden die Zellen durch Zugabe von eGFP-DnaE^N nicht unspezifisch markiert. Die bei rPrP^{Palm} beobachtete Abhängigkeit von der Lipidkomposition auf die Transfektionseffizienz wurde hier nicht detektiert. Wohingegen für das murine Prion Protein bekannt ist, dass die Lipidumgebung großen Einfluss auf die Stabilität und Interaktion des Proteins mit den Membranen hat^{29,117,120,121}, ist für die lipidierte eGFP Variante kein Einfluss dieser Art zu erkennen. Vor dem Hintergrund, dass eGFP ein lösliches Protein ist und somit eine Membranverankerung artifiziell ist, war eine spezifische Interaktion mit den verwendeten Lipiden nicht zu erwarten.

Ziel dieser Art der Immobilisierung auf Nanopartikeln die Etablierung einer variablen Methode zur selektiven Verankerung lipidierter Proteine auf Oberflächen. Zu diesem Zweck wurde im Folgenden zunächst das palmitoylierte C-terminale Segment des verwendeten DnaE Splitinteins auf den lipidierten Partikeln immobilisiert. Nach Zugabe eines Protein-DnaE^N Fusionsproteins kommt es zum *trans*-Spleißen, was zu einer kovalenten Verknüpfung des Proteins mit den Lipidankern und somit zur Immobilisierung dieses auf den Partikeln führt¹²². Die Analyse des zeitlichen Verlaufs von *trans*-Spleißen und Immobilisierung zeigt, dass

nach 3 h keine weitere Zunahme des Produkts auf den Partikeln zu detektieren ist, da vermutlich nicht 100% der Inteininfusionsproteine in ihrer aktiven Form vorlagen und somit kein quantitativer Umsatz erreicht werden konnte. Die Untersuchung der erhaltenen Nanopartikel mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie zeigte eine deutliche eGFP spezifische Fluoreszenz. Daraus kann man schließen, dass die Verwendung von Split-Inteinen eine schonende Methode darstellt Proteine auf Oberflächen funktionell zu immobilisieren. Bisherige Ansätze zur Immobilisierung von Proteinen auf hydrophoben Oberflächen setzten eine Modifikation der Proteine oder die Existenz einer transmembranen Domäne voraus^{123,124}. Im Vergleich zu diesen Methoden muss bei der hier beschriebenen das zu immobilisierende Protein in Fusion mit dem Intein-Segment exprimiert werden.

4.1.3 N-terminale Fluoreszenzmarkierung des murinen Prion Proteins

Die Verwendung semisynthetischer Strategien zur Inkorporation von Modifikationen in Proteine ist nicht auf den C-Terminus des Proteins beschränkt. Die Darstellung N-terminaler Peptide mit C-terminalen Thioestern mittels Festphasensynthese ist sowohl unter Verwendung der Fmoc- als auch der Boc-Chemie etabliert¹²⁵. Die Generierung rekombinanter Proteine mit N-terminalen Cysteinen kann zum einen Intein vermittelt erreicht werden¹²⁶. Zum anderen ermöglichen Proteasen, welche spezifisch nach einer Erkennungssequenz schneiden, die spezifische Generierung von N-terminalen Cysteinen. Beispiele für derartige Proteasen sind Thrombin, Faktor Xa und die TEV-Protease^{125,127}. Auf diese Art lassen sich N-terminal Reportermoleküle in Proteine beliebiger Größe einführen¹²⁵. Durch die Einführung umgebungssensitiver Fluorophore in den N-Terminus des Prion Proteins kann dessen $\alpha \rightarrow \beta$ Konversion fluoreszenzspektroskopisch untersucht werden. Die strukturierte C-terminale Domäne des Prion Protein, welcher nach Nomenklatur für das murine PrP die Aminosäuren 90 bis 232 umfasst, besteht aus drei α -Helices von denen B und C durch eine Disulfidbrücke stabilisiert sind und einem kurzen zwei strängigem β -Faltblatt. Aufgrund von hochauflösenden EM Abbildungen, NMR Untersuchungen und molekulardynamischen Simulationen wird davon ausgegangen, dass der N-terminale Bereich um die erste Helix und das β -Faltblatt die größten strukturellen Veränderungen bei der Konversion in PrP^{Sc} durchläuft^{37-40,128}. Während der Konversion sollte sich bei korrekter Inkorporationsstelle des Fluoreszenzmarkers die Umgebungspolarität in diesem Bereich ändern. Diese Änderung kann zum einen eine Verschiebung des Emissionsspektrums und der Fluoreszenzintensität zur

Folge haben. Zum anderen nimmt, durch die induzierte Aggregation des Proteins, die Größe der Partikel zu, was eine Verfolgung des Prozesses mittels Anisotropie ermöglicht. Die Semisynthese des Prion Proteins konnte unter denaturierenden Bedingungen mit Ausbeuten von bis zu 70% durchgeführt werden. Auf Grund ähnlicher Elutionseigenschaften ließen sich weder das N-terminale Peptid noch der C-terminale NCysPrP(134-232) mittels RP-HPLC selbst unter Variation von Säulenmaterial sowie Pufferbedingungen und Temperatur nicht vom Produkt trennen. Aus diesem Grund erfolgte die Aufreinigung über die bei Größenunterschieden von 5 kDa recht ineffiziente Methode der Größenausschlusschromatographie. Dabei konnten zwar gute Reinheiten von > 90 % erreicht werden, jedoch betrug die Verluste durch den geringen Unterschied im Molekulargewicht bis zu 70 %. Die Darstellung größerer Mengen des semisynthetischen Prion Proteins ist somit durch den letzten Aufreinigungsschritt limitiert und benötigt weitere Optimierung. Ein Ansatz ist die Einführung eines N-terminalen Affinitätstags und einer Proteaseschnittstelle in PrP(90-133). Im Folgenden wurde nun versucht Fluorophore mittels SPPS an unterschiedliche Positionen der N-terminalen PrP Segments einzuführen. Diese Synthesen konnten jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht erfolgreich durchgeführt werden. Eine Erklärung dafür liefert die ausgeprägte Hydrophobizität des Prion Peptids ¹²⁹⁻¹³¹. In diesem N-terminalen Fragment befindet sich der sogenannte hydrophobe Kern, welcher in *in vitro* Aggregationsassays eine ausgeprägte Tendenz zur Fibrillogenese aufweist. Eine Einführung nicht natürlicher Aminosäuren in dieses aggregationsanfällige Segment des Prion Proteins erhöht unter Umständen dessen Hydrophobizität und führt bereits während der Festphasenpeptidsynthese zur Ausbildung von Sekundärstrukturen am Harz. Diese lassen sich auch durch die Inkubation mit TFA zur N-terminalen Entschützung nach der Boc-Synthese und der damit verbundenen Protonierung des N-Terminus nicht mehr auflösen. Dadurch waren vermutlich die jeweiligen N-terminalen Aminosäuren nur noch eingeschränkt zugänglich, was zum Abbruch die Synthese an diesen Stellen führte. Die Verfolgung der Boc-Strategie ist in der Regel bei der Darstellung aggregationsanfälliger Peptide der Fmoc-Strategie überlegen. Jedoch wurden auch unter Verwendung der Fmoc-Strategie inzwischen rückgratmodifizierende unnatürliche Bausteine, wie z.B. Pseudoproline, entwickelt, welche eine Synthese von Sequenzen, welche zur Ausbildung von Sekundärstrukturelementen tendieren, ermöglichen können. Um initiale Versuche zur Aggregation einer fluoreszenzmarkierten semisynthetischen PrP-Variante durchführen zu können, wurde der N-Terminus des PrP Segmentes von AS 90-133 mit dem umgebungssensitiven Fluorophor NBD erfolgreich markiert und mit dem C-terminalen Segment mit analogen Ausbeuten von bis zu 70% ligiert. Durch die bereits beschriebenen

Isolationsprobleme konnten nach Durchführung eines etablierten Faltungsprotokolls²⁵ auf Grund einer zu geringen Proteinmenge keine CD-Spektren zur Bestimmung der Sekundärstruktur durchgeführt werden. Da jedoch mehrfach gezeigt wurde, dass unter den von Riek et al. beschriebenen Bedingungen eine α -helikale Konformation eingenommen wird, wurden erste Fluoreszenzspektren dieses Proteins aufgenommen. Dabei zeigt sich, dass die NBD Emission der α -helikalen Form ein Maximum bei 536 nm liegt. Vergleicht man das erhaltene Spektrum mit einem hydrophilen Referenzpeptid (H-CGK(NBD)GHHHHHH-OH)¹⁰¹, erkennt man bereits hier eine deutlich bathochrome Verschiebung des Spektrums. Durch Zugabe von Chaotrop, wodurch die Konversion des Prion Proteins in eine β -Faltblatt reiche Struktur induziert wird, war keine signifikante Änderung des Emissionsspektrums zu detektieren. Dies deutet darauf hin, dass die Markierung von AS 90 nicht zur Untersuchungen der Konversion durch Beobachtung des Emissionsmaximums geeignet ist, da die Änderung der Polarität der Fluorophorumgebung während der Konversion nicht fluoreszenzspektroskopisch verfolgt werden kann. Dennoch sollte dieses Konstrukt zu Anisotropieuntersuchungen geeignet sein. Hierbei wäre die Wahl des Fluorophors unabhängig von seiner Umgebungssensitivität.

4.2 Inhibitoren der Fibrillogenese

Die Identifikation von Inhibitoren der Fibrillogenese ist von zentralem Interesse bei der Entwicklung von Therapeutika zur Behandlung von proteinkonformationellen Erkrankungen. Dabei erwiesen sich Derivate der Gallussäure, nämlich (-)-Epigallocatechin Gallat (EGCG) und (-)-Epicatechin Gallat (ECG) aus dem Extrakt von grünem Tee in einer Studie von Masuda et al.¹⁰⁹ als potente Inhibitoren der Fibrillogenese von A β , α -Synuclein und dem Tau Protein identifiziert. Die daraus erhaltenen IC₅₀ Werte lagen im unteren mikromolaren Bereich. Dabei war die Wechselwirkung mit dem A β -Peptid im Vergleich zu den anderen Proteinen ausgeprägter. Des Weiteren lag der IC₅₀-Wert von EGCG bei 2 μ M wohingegen ECG eine schwächere inhibitorische Wirkung aufwies (7 μ M). Die offenbar spezifische Interaktion dieser beiden Substanzen mit den drei untersuchten fibrillierenden Proteinen macht diese, auch in Bezug auf eine Wechselwirkung mit anderen in Amyloidosen involvierten Proteinen, interessant. Ferner sind weder EGCG noch ECG, auch in hohen Konzentrationen von 200 μ M, toxisch, was gerade bei der Erforschung potentieller Therapeutika ein entscheidender Vorteil ist.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diese zwei Substanzen auf ihre Wechselwirkung mit dem rekombinanten murinen Prion Protein untersucht. Zur Charakterisierung der Interaktion von EGCG und ECG mit dem rekombinanten PrP *in vitro* wurde dieses zunächst in seine überwiegend α -helikale Form gefaltet. Der Ansatz zu diesen Untersuchungen beruht auf Ergebnissen der Arbeitsgruppe Tatzelt (LMU, München), welche in zellbasierten Assays, unter Verwendung von murinen Neuroblastomzellen, nach Zugabe von EGCG eine Reduktion der detektierten Menge an PrP^C aufwies. Untersuchungen von knock-out Mäusen haben gezeigt, dass eine Deletion von PrP keine Auffälligkeiten im Phänotyp bewirkt¹³². Somit sollte eine Reduktion des PrP Niveaus keinen negativen Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Zellen und damit des Systems haben. Die Auswirkungen der Reduktion von PrP^C unter Stress sind bis jetzt jedoch noch nicht geklärt.

Zur Durchführung von Bindungsstudien des nativen rPrP unter physiologischen Bedingungen musste zunächst ein Rückfaltungsprotokoll etabliert werden, welches eine α -helikale Struktur des Proteins auch unter leicht basischen Bedingungen von pH 7,5 gewährleistet. Die Faltung der rekombinanten Prion Proteine unterschiedlicher mammalischer Spezies erfolgt normalerweise in sauren Pufferbedingungen bei pH 5,5²³⁻²⁵, durch die schnelle Entfernung der solubilisierenden Chaotrope mittels Verdünnen und anschließender Dialyse oder Gelfiltration. Eine Abwandlung dieser Protokolle unter Verwendung von pH 7,5 führte jedoch zu erheblichen Proteinverlusten von bis zu 90 % während des Dialyseschrittes. Dies konnte durch den Zusatz von Faltungshelfern wie L-Arginin in dem ersten Verdünnungsschritt vermieden werden⁶⁸. Dabei lässt sich vermuten, dass die Guanidin-Gruppe der Arginins eine solubilisierende Wirkung auf das Protein hat und damit eine Präzipitation verhindert. Die so erhaltene lösliche und α -helikale rPrP Form war über 48 h bei Raumtemperatur stabil, was ausreichend für die Durchführung aller Tests war.

Die Analyse der Bindung von EGCG und ECG mittels isothermer Titrationskalorimetrie ergab eine hochaffine Bindung von EGCG. Das biphasische Verhalten der aufgezeichneten Titrationskurve, weist im ersten Schritt eine Stöchiometrie von $\sim 1 : 1$ und einen K_D von $\sim 0,1 \mu\text{M}$ auf. Die Bestimmung der genauen Anzahl der Stöchiometrie des zweiten Schrittes kann auf Grund der niedrigen Affinität dieser Bindungsstufe mittels ITC nicht genau bestimmt werden. Im Gegensatz dazu ist keine Bindung von ECG an die zelluläre rPrP Form zu beobachten. Die lange Äquilibrierungszeit des Systems nach erfolgter Injektion von EGCG deutet darauf hin, dass EGCG zusätzlich zum Bindungsereignis noch eine konformationelle Änderung des Proteins induziert. Dieser, im Vergleich zur Bindung eines Liganden in die Bindungstasche eines Proteins, langsamer exothermer Prozess kann die lange

Äquilibrierungszeit des Systems erklären. Zur Bestätigung dieser Annahme wurden strukturelle Untersuchungen des EGCG/rPrP-Komplexes mittels Circular Dichroismus durchgeführt. Aus diesen Experimenten kann man entnehmen, dass die Zugabe von EGCG eine vollständige Entfaltung des Proteins bewirkt. Das ungefaltete Protein ist nach zwei stündiger Inkubationszeit immer noch löslich und liegt monomer vor. Dieses Ergebnis ist mit den Zellkulturdaten konsistent, da eine Entfaltung des Proteins nach Internalisierung eine Erhöhung der Proteasezugänglichkeit zur Folge hat und somit durch proteolytischen Abbau der Anteil von PrP^C in der Zelle verringert werden würde. Eine zeitaufgelöste Analyse dieses Entfaltungsprozesses lieferte Hinweise dafür, dass nach Bindung von EGCG das Protein zunächst ein β -faltblattreiches Intermediat durchläuft, welches im Folgenden in ein Zufallsknäuel übergeht. Ein ähnliches Verhalten wurde auch bei der Untersuchung von EGCG mit dem A β -Peptid beobachtet¹⁰⁹. Um zu überprüfen ob dieser Entfaltungsprozess, analog zur Denaturierung mit z.B. Harnstoff, reversibel ist, wurde der Überschuss an EGCG mittels Gelfiltration entfernt. Das erhaltene CD-Spektrum des Proteins zeigt, dass keine spontane Rückfaltung in eine α -helikale Form erfolgte. Eine genaue Strukturaufklärung dieses Intermediats mittels NMR war auf Grund der Instabilität dieses bei den für NMR benötigten Konzentrationen von 100 μ M noch nicht möglich. Diese hohen Konzentrationen führten zur Präzipitation des PrP Zufallsknäuels.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Inhibitoren wurden bei Induktion der Fibrillogenese der jeweiligen Proteine zugesetzt, um ihre Auswirkung auf die Fibrillogenese zu untersuchen. Da diese bisherigen Studien lediglich die Wechselwirkung mit α -helikalem PrP beinhalteten, wurden nun Untersuchungen durchgeführt, bei denen EGCG und ECG bei Induktion der *in vitro* Aggregation zugesetzt wurde. Dabei wurde, vermutlich bedingt durch die hohen verwendeten Konzentrationen (50 μ M), in allen Fällen eine Präzipitation des Proteins durch die Induktion der Fibrillogenese mit geringen Chaotropkonzentrationen beobachtet. Die Analyse der Aggregate durch Proteolyse mit Proteinase K ergab jedoch, dass die nach Zugabe von EGCG gebildeten Aggregate immer noch eine hohe Sensitivität gegenüber PK aufwiesen. Das entstandene Präzipitat nach ECG Inkubation wies dagegen lediglich einen geringeren Anteil an PK resistentem Material im Vergleich zu nicht behandeltem Material auf. Eine AFM Analyse der erhaltenen Aggregate zeigte, dass es nach Inkubation mit EGCG nicht zur Fibrillenbildung kam, vielmehr wurde eine Vielzahl kleiner amorpher Aggregate detektiert. Diese Ergebnisse sind ebenfalls konsistent mit den Zellkulturdaten. Neben den Untersuchungen mit N2a Zellen wurden die analogen Versuche auch mit ScN2a, einer Zelllinie, welche PrP^{Sc} exprimiert, durchgeführt (mündl. Mitteilung J.Tatzelt). Auch hier ist

eine konzentrationsabhängige Reduktion des PrP^{Sc}-Levels nach Zugabe von EGCG zu beobachten. Die Zugabe von EGCG zu *in vitro*, mit rekombinanten PrP gebildeten Fibrillen hatte jedoch keinen Effekt auf die Menge des bereits gebildeten PrP^{res}. Es ist also nicht möglich bereits gebildete Aggregate durch die Zugabe von EGCG wieder aufzulösen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Bindungsstellen des EGCG sich im Inneren der Fibrillen befinden und somit von einer Wechselwirkung mit EGCG abgeschirmt werden oder die Bindungsstelle nach der Umwandlung verloren geht.

Obwohl der genaue Prozess des Fibrillogenese bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollständig verstanden ist, geht man im allgemeinen davon aus, dass die Formation fibrillärer Strukturen ausgehend von der zellulären Form des Protein über ein Intermediat entweder zu amyloiden Ablagerungen oder andersartigen Präzipitaten führt¹³³. Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse wurde ein Model (Abb. 81) der Interaktion von EGCG mit PrP^C aufgestellt. Dabei geht man davon aus, dass EGCG sowohl mit der nativen Struktur des rPrP als auch mit dem partiell ungefalteten β -faltblattreichen Intermediat, mit dem PrP^C im Gleichgewicht vorliegt, wechselwirkt und zur vollständigen Denaturierung dieses führt. Indizien für eine derartige Interaktion stellt das biphasische Verhalten in der ITC dar. Während der ersten stark exothermen Phase der Bindung von EGCG an rPrP wird vermutlich die konformationelle Änderung in das β -faltblattreiche Intermediat induziert, an dieses binden dann weitere EGCG Moleküle und lösen die verbliebenen Sekundärstrukturelemente auf. Dies wäre im Einklang mit der Beobachtung, dass die Zugabe von EGCG während der *in vitro* Aggregationsexperimente ebenfalls die Ausbildung von Fibrillen verhindert. Durch den Einsatz geringer Mengen an Chaotropen wird ein partiell ungefaltetes Intermediat gebildet, welches dann in eine β -Faltblatt reiche Struktur übergeht. Diese Zwischenstufe ist wahrscheinlich der des mit EGCG gebildeten Intermediates ähnlich, so dass die Substanz binden kann, was zur Bildung amorpher Aggregate führt.

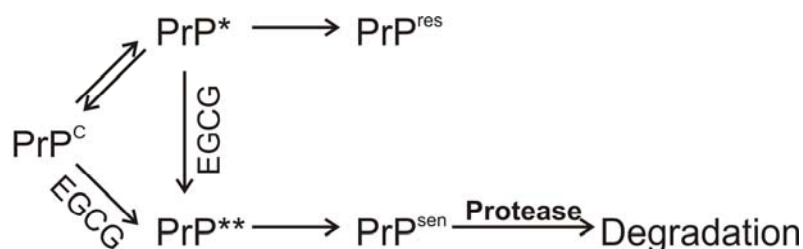


Abb. 81: Schema zur Wechselwirkung von EGCG mit dem murinen Prion Protein *in vivo*; Dabei steht PrP^C für die zelluläre Form, PrP^{*} für partiell ungefaltetes PrP, PrP^{**} vollständig denaturiertes PrP, PrP^{res} gegen PK resistentes Protein, PrP^{sen} sensitiv gegen Proteolyse.

In weiteren Studien sollte die erste Bindungsstelle von EGCG aufgeklärt werden. Da dies wie bereits erwähnt mittels NMR in Lösung, auf Grund der Tendenz zur Aggregation des EGCG/PrP Komplexes bei 100 μM , nicht möglich war, wurde zunächst überprüft ob die Bindungsstelle innerhalb des Proteins eingegrenzt werden kann.

Während im Allgemeinen davon ausgegangen wird, dass bei der Konversion die Helices B und C nicht involviert sind, scheint die N-terminale Region des PrP(90-232) flexibler zu sein und die größten strukturellen Veränderung in den entstandenen Fibrillen aufzuweisen. Innerhalb dieser Region befindet sich ein hochkonservierter Bereich, welcher als toxisches Peptid bezeichnet wird und die Aminosäuren 105-125 des murine Prion Proteins beinhaltet^{130,131}. Dieses Peptid enthält die palindromische Sequenz 112-AGAAAAGA-119, welche auch als hydrophober Kern bezeichnet wird und innerhalb des toxischen Peptids das fibrillogene Motiv darstellt. Dieses Motiv wurde bereits 1992 von Gasset et al.¹²⁹ durch die Untersuchung synthetischer Prion Protein Fragmente identifiziert. In später durchgeführten Untersuchungen von Norstrom et al.¹¹¹ konnte gezeigt werden, dass durch eine Komplexbildung von PrP^C mit PrP^{Sc} die Umfaltung und damit die Propagierung von PrP^{Sc} induziert wird. Durch die Deletion der Aminosäuren 112-119 war diese Interaktion nicht mehr möglich.

Zur Bestimmung der Relevanz dieser N-terminalen Domäne für die Bindung von EGCG and rPrP wurde die bereits zur N-terminalen Fluoreszenzmarkierung verwendete Deletionsmutante des murinen Prion Protein verwendet, welche über die Aminosäuren 134 bis 232 verfügte, in der eben dieses toxische Peptid nicht mehr enthalten ist. Die Faltung dieser Mutante in eine α -helikale Form konnte durch Inkubation mit einem Redoxsystem auf Gluthationbasis, unter denaturierenden Bedingungen und anschließende schnelle Entfernung der Chaotrope, mittels Gelfiltration erzielt werden. Die Induktion einer konformationellen Änderung nach Zugabe von EGCG wurde CD-spektroskopisch untersucht. Im Gegensatz zu den Daten des rPrP(90-232) lässt sich im Fall der Deletionsmutante lediglich eine Verschiebung zu einer β -Faltblatt reichen Struktur beobachten und keine vollständige Denaturierung selbst nach 24 stündiger Inkubation mit 5 μg EGCG. Die detektierte Zunahme des Anteils an β -Faltblatt war jedoch auch bei einer nicht behandelten Kontrollprobe zu beobachten. Die eingeschränkte Stabilität des erhaltenen Proteinfragmentes ist vermutlich auf die Deletion der ersten β -Faltblatts zurückzuführen, wodurch die Stabilität des zweiten β -Faltblatts durch die fehlenden Wechselwirkungen nicht mehr gewährleistet ist. Die Zugabe von EGCG bewirkt lediglich eine Beschleunigung dieser Umfaltung. Im Folgenden wurde untersucht, ob das Fehlen der Aminosäuren 90-133 nicht nur bewirkt, dass die Addition von EGCG keine strukturelle Destabilisierung des Proteins bewirkt, sondern ferner, ob das

Molekül noch eine signifikante Affinität zum verbleibenden Proteinfragment aufweist. Dies wurde mittels isothermer Titrationskalorimetrie bestimmt. Es zeigte sich, dass der gemessene K_D unter ansonsten analogen Bedingungen um den Faktor 100 geringer ist und sich im mittleren mikromolaren Bereich befindet. Durch die Deletion der Aminosäuren 90-133 kann sich die, für die Bindung von EGCG an PrP, erforderliche Struktur des Proteins also nicht mehr ausbilden. In Analogie zu den von Kuwata et al.¹³⁴ erhaltenen Ergebnissen, lässt sich auch hier vermuten, dass es sich um eine Bindungstasche handelt, welche mehrere Sekundärstrukturelemente des Proteins umfasst. Zur Erläuterung der Bindung verschiedener Substanzen an PrP sind in folgender Abbildung sowohl rPrP(90-232) (Abb. 82 A) als auch die Deletionsmutante rPrP(134-232) (Abb. 82 B) dargestellt.

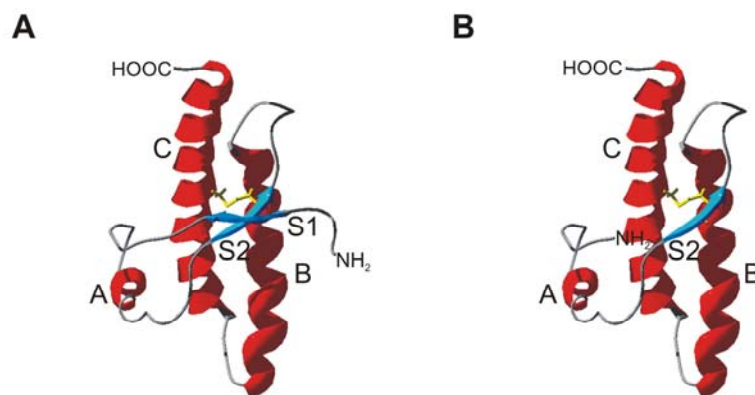


Abb. 82: A) Ribbon Darstellung der PrP(90-231) Struktur. Die drei Helices sind in rot dargestellt. Helices B und C sind über eine Disulfidbrücke (gelb) über die AS C179 und C 214 verknüpft. Die Stränge S1 und S2 des β -Faltblattes sind als blaue Pfeile dargestellt. Die Loops und die unstrukturierte N-terminale Domäne sind grau dargestellt²⁶. B) Ribbon Darstellung der PrP(134-231) Struktur.

Das im Rahmen der Studie von Kuwata et al. beschriebene Molekül bindet an Reste sowohl der beiden C-terminalen Helices, als auch auf Grund der räumlichen Nähe an S2, was im Fall des beschriebenen Moleküls zur Stabilisierung der Helices B und C führt. Ähnliche Hypothesen zur Bindung von Pyridindicarbonitrilen an eine Kavität des rPrP wurden von Reddy et al.¹³⁵ aufgestellt. Unter Annahme eines analogen Verhaltens von EGCG würde die Deletion von S1 ebenfalls eine Destabilisierung von S2 zur Folge haben, was zu einer räumlichen Umorientierung von HA und/oder S1 in Bezug zur den durch die Disulfidbrücke relativ gut stabilisierten C-terminalen Helices B und C führen würde. Unter Berücksichtigung der gesammelten Ergebnisse und den Beobachtungen von Kuwata et al. lässt sich die Bindung von EGCG unter Annahme des Induced-Fit-Models erklären. Dabei geht man davon aus, dass die Bindung der Inhibitoren an das Protein durch eine konformationelle Änderung die

Affinität der Komponenten zu einander erhöht. Ähnliches wurde bereits sowohl von Reddy als auch von Kuwata et al. postuliert, die beide davon ausgehen, dass sich PrP^C im Gleichgewicht mit anderen PrP Strukturen befindet und man je nach Wahl des Inhibitors die einzelnen Strukturen stabilisieren kann.

Die Interaktion der bereits für rPrP charakterisierten Inhibitoren *in vitro* beruht sowohl auf hydrophoben, als auch auf ionischen Wechselwirkungen. Dabei umfassen die potentiellen Inhibitoren ein breites Spektrum an Substanzklassen von Porphyrinen^{136,136,137} über Acridine und Phenothiazine¹³⁸⁻¹⁴⁰, sowie Heparansulfate¹⁴¹, Aminoglycane und Polyamine^{142,142,143} und das gut charakterisierte Kongo Rot und seine Derivate^{144,144-146}. Des Weiteren wird auch die Bindung an RNA als entscheidender Faktor bei der Entstehung von TSEs diskutiert⁴⁵⁻⁴⁸. An Hand dieser Untersuchungen wurden ebenfalls Nukleinsäuremimetika entwickelt, welche inhibitorische Wirkungen aufweisen¹⁴⁷. Als Gemeinsamkeit weisen alle diese Substanzen aromatische Systeme auf und tragen zum Großteil negative Ladungen oder zumindest polare Gruppen, diese können entweder wie im Fall des Kongo Rot durch Sulfonsäurereste oder auch als Carboxyfunktionen oder andere acide Gruppen auftreten. Dabei lassen sich die inhibitorischen Eigenschaften sowohl durch die Art der eingeführten Ladungen an den aromatischen Systemen wie auch deren Substitutionsmuster modulieren¹³⁵. Auf Grund dieser Beobachtungen von Reddy et al. lässt sich auch der detektierte Unterschied zwischen EGCG und EGC erklären. Um in diesem Fall differenzieren zu können, ob die Gesamtheit der aciden phenolischen OH-Funktionen oder die Position im Benzylring einen Einfluss hat, wäre die Synthese und anschließende Untersuchung der entsprechenden in Abb. 83 dargestellten Derivate erforderlich.

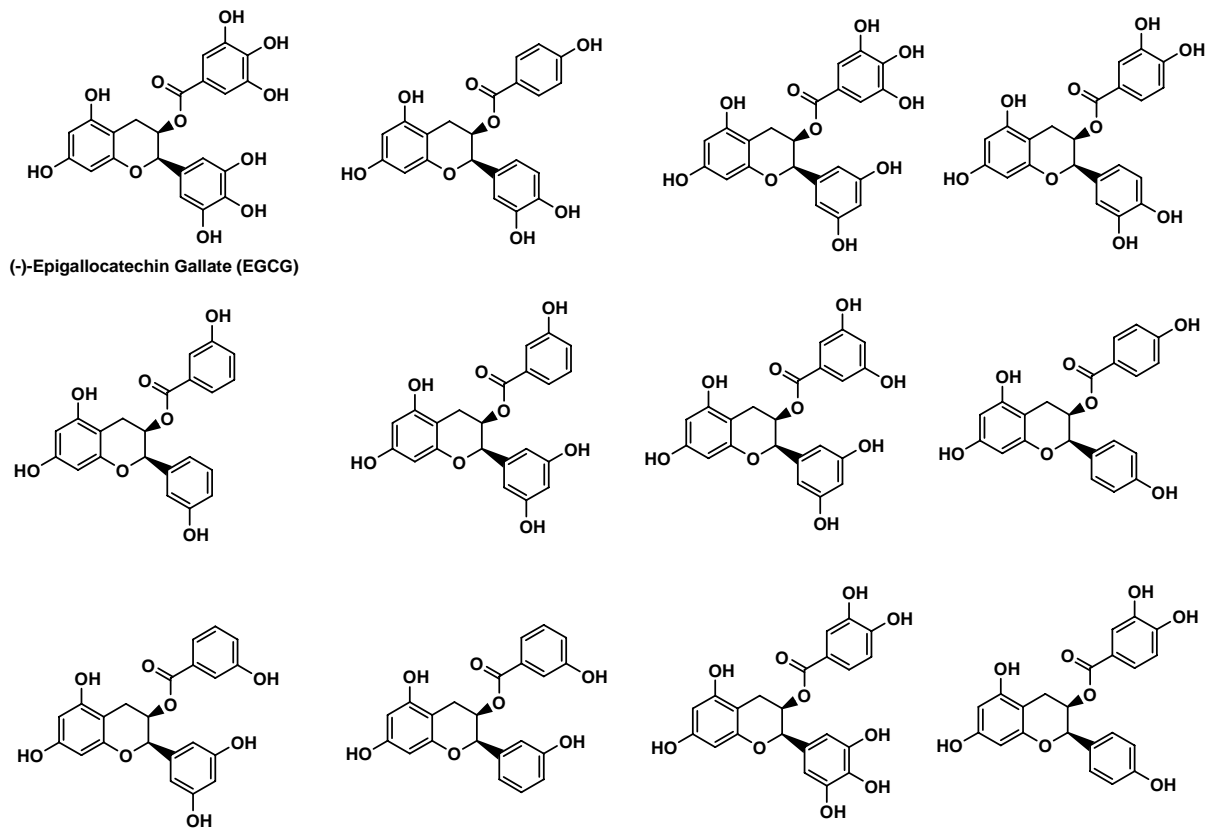


Abb. 83: Struktur von EGCG und dessen Derivaten

Vergleicht man die Strukturen der Literatur bekannten Inhibitoren und EGCG, so lässt sich unter Umständen die Struktur mit den minimal Anforderungen, welche zur Inhibition der Fibrillogene des Prion Proteins führen postulieren:

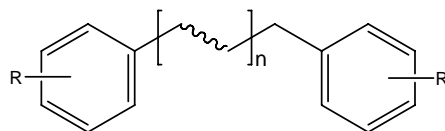


Abb. 84: Allgemeine Struktur eines potentiellen Inhibitors der PrP Fibrillogene. Dabei sind mit R negativ geladene oder negativ polarisierte Gruppen dargestellt

Dabei ergibt sich aus dem Abstand der aromatischen Systeme die Wahl der polaren Funktionalitäten. Unter Verwendung molekular dynamischer Simulationen ist es möglich eine entsprechende Kavität des Prion Proteins zu definieren.

5. Zusammenfassung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Einführung C-terminaler Lipidmodifikationen, welche als artifizielle Mimetika der natürlichen GPI Verankerung des Proteins dienen sollen. Dabei wurde das murine Prion Protein semisynthetisch, unter Verwendung von nativer chemischer Ligation, Expressed Protein Ligation und dem Prozess des Protein *trans*-Spleißens dargestellt. Durch die anschließenden biophysikalischen und zellbiologischen Untersuchungen wurde der Einfluss dieser Modifikation auf die sekundär Struktur unter nativen Bedingungen sowie das Aggregationsverhalten bestimmt. Dabei hatte die C-terminale Palmitoylierung keinen Einfluss auf die Struktur des α -helikalen Proteins in Gegenwart kleiner unilamellarer Vesikel. Unter Verwendung zweier gut etablierter Methoden, nämlich dem Proteinase K Verdau und der ThT Fluoreszenz, konnte nachgewiesen werden, dass die Lipidverankerung des Prion Proteins in eine Lipid-Doppelschicht eine Verzögerung des Aggregationsprozesses zur Folge hat. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass das Einführen von zwei Palmitoylresten eine stabile und spezifische Verankerung des Proteins in einer Lipid-Doppelschicht zur Folge hat.

Bei anschließend zellbiologischen Experimenten konnte rPrP^{Palm} stabil auf die Plasmamembran von murinen Neuroblastomzellen übertragen werden. Die anschließende Immunofluoreszenz Analyse ergab dabei ein ähnliches Lokalisationsmuster, wie es auch PrP^C zeigt. Die dabei etablierte Methode des Protein *trans*-Spleißens auf Membranen wurde im Folgenden zur Entwicklung einer generellen Strategie zur Immobilisierung lipidierter Proteine auf Oberflächen verwendet. Dabei gelang es an Hand des Modellsystems eGFP eine kovalente Lipidierung and gleichzeitige Immobilisierung des Proteins auf der Oberfläche von SiO_x-Nanopartikel zu erzielen.

Ferner wurde im Rahmen dieser Arbeit eine semisynthetische Methode zur Darstellung N-terminal modifizierter Prion Proteine etabliert. Dabei wurde die N-terminale Aminosäure des Prion Protein Segments (90-133) mit einem Fluoreszenzmarker modifiziert und anschließend mit dem C-terminalen Segment (134-232) ligiert. Die Einführung dieses Reportermoleküls ermöglicht die Verfolgung des Aggregationsprozesses mittels Fluoreszenzanisotropie Messungen.

Ein weiterer Teil der Arbeit befasste sich mit der Interaktion der Substanzen EGCG und EGC in Hinblick auf ihre inhibitorische Wirkung bei der Konversion des murinen Prion Proteins in

amyloide Strukturen untersucht. Dabei erwies sich EGCG als potenter Inhibitor dessen Bindungskonstante an das native rPrP im unterhalb des mikromolaren Bereichs liegt. Unter Anwendung CD-spektroskopischer Methoden konnte nachgewiesen werden, dass die Zugabe von EGCG eine Destabilisierung der dreidimensionalen Struktur des Proteins zur Folge hat. Durch diese induzierte Entfaltung des Proteins in ein Zufallsknäuel wird ebenfalls die Fibrillogenese in *in vitro* Aggregationsassays inhibiert. Die gebildeten Präzipitate fielen dabei in Form von amorphen Aggregaten an, welche sensitiv gegenüber PK waren. Im Vergleich dazu zeigt EGC weder eine mittels ITC detektierbare Affinität zu PrP noch erwies sich diese Substanz als Inhibitor der *in vitro* induzierten Fibrillogenese. Die detektierten Unterschiede lassen sich auf einen um eine OH-Gruppe niedrigeren Substitutionsgrad eines Benzylrings zurückführen.

6. Literaturverzeichnis

1. Anfinsen,C.B. Principles That Govern Folding of Protein Chains. *Science* **181**, 223-230 (1973).
2. Chan,H.S. & Dill,K.A. Protein folding in the landscape perspective: Chevron plots and non-Arrhenius kinetics. *Proteins-Structure Function and Genetics* **30**, 2-33 (1998).
3. Dormont,D. Prion diseases: pathogenesis and public health concerns. *Febs Letters* **529**, 17-21 (2002).
4. Stefani,M. & Dobson,C.M. Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of Molecular Medicine-Imm* **81**, 678-699 (2003).
5. Gibbons,R.A. & Hunter,G.D. A Consideration of Nature of Scrapie Agent - A Membrane Hypothesis. *Biochem. J.* **105**, 7 (1967).
6. Gajdusek,D.C. & Zigas,V. Degenerative Disease of the Central Nervous System in New-Guinea - the Endemic Occurrence of Kuru in the Native Population. *New England Journal of Medicine* **257**, 974-978 (1957).
7. Hadlow,W.J. Scrapie and Kuru. *Lancet* **2**, 289-290 (1959).
8. Klatzo,I., Gajdusek,D.C. & Zigas,V. Pathology of Kuru. *Laboratory Investigation* **8**, 799 (1959).
9. Liberski,P.P. & Jaskolski,M. Prion diseases: a dual view of the prion hypothesis as seen from a distance. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)* **62**, 197-224 (2002).
10. Dalsgaard,N.J. Prion diseases. An overview. *Apmis* **110**, 3-13 (2002).
11. Sigurdsson,B., Palsson,P.A. & Grimsson,H. Visna, A Demyelinating Transmissible Disease of Sheep. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* **16**, 389-403 (1957).
12. Pattison,I.H. Scrapie in Welsh Mountain Breed of Sheep and Its Experimental Transmission to Goats. *Veterinary Record* **77**, 1388-& (1965).
13. Pattison,I.H. & Jones,K.M. Possible Nature of Transmissible Agent of Scrapie. *Veterinary Record* **80**, 2-& (1967).
14. Griffith,J.S. Self-Replication and Scrapie. *Nature* **215**, 1043 (1967).
15. Gibbons,R.A. & Hunter,G.D. Nature of Scrapie Agent. *Nature* **215**, 1041-& (1967).
16. Hunter,G.D., KIMBERLI,R.H. & Gibbons,R.A. Scrapie - A Modified Membrane Hypothesis. *Journal of Theoretical Biology* **20**, 355 (1968).
17. Hunter,G.D. Scrapie - Prototype Slow Infection. *Journal of Infectious Diseases* **125**, 427 (1972).
18. Field,E.J., Farmer,F., Caspary,E.A. & Joyce,G. Susceptibility of Scrapie Agent to Ionizing Radiation. *Nature* **222**, 90 (1969).
19. Prusiner,S.B. Prions. *PNAS* **95**, 13363-13383 (1998).
20. McKinley,M.P., Bolton,D.C. & Prusiner,S.B. A Protease-Resistant Protein Is A Structural Component of the Scrapie Prion. *Cell* **35**, 57-62 (1983).
21. Prusiner,S.B. *et al.* Properties of A 30,000 Mw Protein-Component of the Scrapie Prion. *Federation Proceedings* **42**, 849 (1983).

22. Bolton,D.C., McKinley,M.P. & Prusiner,S.B. Biochemical Characteristics of A Protein Purifying with the Scrapie Prion. *Federation Proceedings* **42**, 2140 (1983).
23. Gossert,A.D., Bonjour,S., Lysek,D.A., Fiorito,F. & Wuthrich,K. Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 646-650 (2005).
24. Lysek,D.A. *et al.* Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep. *PNAS* 0408937102 (2005).
25. Riek,R. *et al.* NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature* **382**, 180-182 (1996).
26. Liu,H. *et al.* Solution structure of Syrian hamster prion protein rPrP(90-231). *Biochemistry* **38**, 5362-5377 (1999).
27. Stahl,N., Borchelt,D.R., Hsiao,K. & Prusiner,S.B. Scrapie Prion Protein Contains A Phosphatidylinositol Glycolipid. *Cell* **51**, 229-240 (1987).
28. Stahl,N. *et al.* Glycosylinositol Phospholipid Anchors of the Scrapie and Cellular Prion Proteins Contain Sialic-Acid. *Biochemistry* **31**, 5043-5053 (1992).
29. Critchley,P., Kazlauskaitė,J., Eason,R. & Pinheiro,T.J.T. Binding of prion proteins to lipid membranes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **313**, 559-567 (2004).
30. Chesebro,B. *et al.* Anchorless Prion Protein Results in Infectious Amyloid Disease Without Clinical Scrapie. *Science* **308**, 1435-1439 (2005).
31. Baron,G.S. & Caughey,B. Effect of glycosylphosphatidylinositol anchor-dependent and -independent prion protein association with model raft membranes on conversion to the protease-resistant isoform. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 14883-14892 (2003).
32. Campana,V. *et al.* Characterization of the properties and trafficking of an anchorless form of the prion protein. *Journal of Biological Chemistry* M701468200 (2007).
33. Tatzelt,A. & Winklhofer,K.F. Folding and misfolding of the prion protein in the secretory pathway. *Amyloid-Journal of Protein Folding Disorders* **11**, 162-172 (2004).
34. Chiti,F. & Dobson,C.M. PROTEIN MISFOLDING, FUNCTIONAL AMYLOID, AND HUMAN DISEASE. *Annual Review of Biochemistry* **75**, 333-366 (2006).
35. Anderson,M. *et al.* Polymorphism and Ultrastructural Organization of Prion Protein Amyloid Fibrils: An Insight from High Resolution Atomic Force Microscopy. *Journal of Molecular Biology* **358**, 580-596 (2006).
36. Eghiaian,F. *et al.* Diversity in prion protein oligomerization pathways results from domain expansion as revealed by hydrogen/deuterium exchange and disulfide linkage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 7414-7419 (2007).
37. Govaerts,C., Wille,H., Prusiner,S.B. & Cohen,F.E. Evidence for assembly of prions with left-handed {beta}-helices into trimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 8342-8347 (2004).
38. Wille,H. *et al.* Structural studies of the scrapie prion protein by electron crystallography. *PNAS* **99**, 3563-3568 (2002).
39. DeMarco,M.L. & Daggett,V. From conversion to aggregation: Protofibril formation of the prion protein. *PNAS* **101**, 2293-2298 (2004).
40. DeMarco,M.L. & Daggett,V. Molecular Mechanism for Low pH Triggered Misfolding of the Human Prion Protein. *Biochemistry* (2007).

41. Chesebro,B. Introduction to the transmissible spongiform encephalopathies or prion diseases. *Br Med Bull* **66**, 1-20 (2003).
42. Weissmann,C. The state of the prion. *Nature Reviews Microbiology* **2**, 861-871 (2004).
43. Silveira,J.R. *et al.* The most infectious prion protein particles. *Nature* **437**, 257-261 (2005).
44. Caughey,B. & Lansbury,P.T. PROTOFIBRILS, PORES, FIBRILS, AND NEURODEGENERATION: Separating the Responsible Protein Aggregates from The Innocent Bystanders*. *Annual Review of Neuroscience* **26**, 267-298 (2003).
45. Cordeiro,Y. *et al.* DNA Converts Cellular Prion Protein into the beta -Sheet Conformation and Inhibits Prion Peptide Aggregation. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 49400-49409 (2001).
46. Nandi,P.K., Leclerc,E., Nicole,J.-C. & Takahashi,M. DNA-induced Partial Unfolding of Prion Protein Leads to its Polymerisation to Amyloid. *Journal of Molecular Biology* **322**, 153-161 (2002).
47. Adler,V. *et al.* Small, Highly Structured RNAs Participate in the Conversion of Human Recombinant PrP^{Sc} to PrP^{Res} in Vitro. *Journal of Molecular Biology* **332**, 47-57 (2003).
48. Deleault,N.R., Lucassen,R.W. & Supattapone,S. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature* **425**, 717-720 (2003).
49. Haigh,C.L., Edwards,K. & Brown,D.R. Copper binding is the governing determinant of prion protein turnover. *Molecular and Cellular Neuroscience* **30**, 186-196 (2005).
50. Kenward,A.G., Bartolotti,L.J. & Burns,C.S. Copper and Zinc Promote Interactions between Membrane-Anchored Peptides of the Metal Binding Domain of the Prion Protein. *Biochemistry* (2007).
51. Kim,N.H. *et al.* Effect of transition metals (Mn, Cu, Fe) and deoxycholic acid (DA) on the conversion of PrP^C to PrP^{Sc}. *FASEB J.* 04-2117fje (2005).
52. Watt,N.T. *et al.* Reactive oxygen species-mediated beta -cleavage of the prion protein in the cellular response to oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* M507327200 (2005).
53. Legname,G. *et al.* Synthetic mammalian prions. *Science* **305**, 673-676 (2004).
54. Supattapone,S. Prion protein conversion in vitro. *Journal of Molecular Medicine-Imm* **82**, 348-356 (2004).
55. Bieschke,J. *et al.* Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 12207-12211 (2004).
56. Murayama,Y. *et al.* Efficient in vitro amplification of a mouse-adapted scrapie prion protein. *Neuroscience Letters* **413**, 270-273 (2007).
57. Saa,P., Castilla,J. & Soto,C. Ultra-efficient Replication of Infectious Prions by Automated Protein Misfolding Cyclic Amplification. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 35245-35252 (2006).
58. Deleault,N.R., Harris,B.T., Rees,J.R. & Supattapone,S. From the Cover: Formation of native prions from minimal components in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 9741-9746 (2007).
59. Joaquín Castilla, Paula Saá & Claudio Soto. Detection of prions in blood. *Nature* (5 A.D.).
60. Murayama,Y. *et al.* Protein misfolding cyclic amplification as a rapid test for assessment of prion inactivation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **348**, 758-762 (2006).
61. Soto,C. *et al.* Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding. *Febs Letters* **579**, 638-642 (2005).

62. Cox,D.L., Sing,R.R.P. & Yang,S. Prion Disease: Exponential Growth Requires Membrane Binding. *Biophys. J.* **90**, L77-L79 (2006).
63. Brandner,S. *et al.* Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* **379**, 339-343 (1996).
64. Mallucci,G. *et al.* Depleting Neuronal PrP in Prion Infection Prevents Disease and Reverses Spongiosis. *Science* **302**, 871-874 (2003).
65. Weissmann,C. Molecular-Biology of Prion Diseases. *Aids Research and Human Retroviruses* **11**, S71-S72 (1995).
66. Aguzzi,A. & Heppner,F.L. Pathogenesis of prion diseases: a progress report. *Cell Death and Differentiation* **7**, 889-902 (2000).
67. Priola,S.A. & Vorberg,I. Identification of possible animal origins of prion disease in human beings. *Lancet* **363**, 2013-2014 (2004).
68. Hicks,M.R. *et al.* Synthesis and structural characterization of a mimetic membrane-anchored prion protein. *FEBS Journal* **273**, 1285-1299 (2006).
69. Breydo,L. *et al.* Nonpolar Substitution at the C-Terminus of the Prion Protein, a Mimic of the Glycosylphosphatidylinositol Anchor, Partially Impairs Amyloid Fibril Formation. *Biochemistry* (2006).
70. Eberl,H., Tittmann,P. & Glockshuber,R. Characterization of recombinant, membrane-attached full-length prion protein. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 25058-25065 (2004).
71. Durek,T. *et al.* Synthesis of fluorescently labeled mono- and diprenylated Rab7 GTPase. *J Am. Chem. Soc.* **126**, 16368-16378 (2004).
72. Brunsveld,L. *et al.* Synthesis of functionalized Rab GTPases by a combination of solution- or solid-phase lipopeptide synthesis with expressed protein ligation. *Chemistry-A European Journal* **11**, 2756-2772 (2005).
73. Schmittberger,T. & Waldmann,H. Synthesis of the palmitoylated and prenylated C-terminal lipopeptides of the human R- and N-ras proteins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **7**, 749-762 (1999).
74. Merrifield,R.B. SOLID-PHASE PEPTIDE SYNTHESSES. *Endeavour* **24**, 3-7 (1965).
75. Dawson,P.E., Muir,T.W., Clark-Lewis,I. & Kent,S.B. Synthesis of proteins by native chemical ligation. *Science* **266**, 776-779 (1994).
76. Wieland,T., Bokelmann,E., Bauer,L., Lang,H.U. & Lau,H. Bildung von S-haltigen Peptiden durch intramolekulare Wanderung von Aminoacylresten. *Liebigs Ann.Chem.* 583, 129-149. 1953.
77. Bang,D., Pentelute,B.L. & Kent,S.B.H. Kinetically controlled ligation for the convergent chemical synthesis of proteins. *Angewandte Chemie-International Edition* **45**, 3985-3988 (2006).
78. Becker,C.F.W. *et al.* Total chemical synthesis of a functional interacting protein pair: The protooncogene H-Ras and the Ras-binding domain of its effector c-Raf1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 5075-5080 (2003).
79. Kochendoerfer,G.G. & Kent,S.B. Chemical protein synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 665-671 (1999).
80. Noren,C.J., Wang,J.M. & Perler,F.B. Dissecting the chemistry of protein splicing and its applications. *Angewandte Chemie-International Edition* **39**, 450-466 (2000).
81. Muir,T.W., Sondhi,D. & Cole,P.A. Expressed protein ligation: A general method for protein engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 6705-6710 (1998).

82. Romanelli,A., Shekhtman,A., Cowburn,D. & Muir,T.W. Semisynthesis of a segmental isotopically labeled protein splicing precursor: NMR evidence for an unusual peptide bond at the N-extein-intein junction. *PNAS* **101**, 6397-6402 (2004).
83. Wu,H., Hu,Z. & Liu,X.Q. Protein trans-splicing by a split intein encoded in a split DnaE gene of *Synechocystis* sp. PCC6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 9226-9231 (1998).
84. Martin,D.D., Xu,M.Q. & Evans,T.C., Jr. Characterization of a naturally occurring trans-splicing intein from *Synechocystis* sp. PCC6803. *Biochemistry* **40**, 1393-1402 (2001).
85. Brenzel,S., Kurpiers,T. & Mootz,H.D. Engineering Artificially Split Inteins for Applications in Protein Chemistry: Biochemical Characterization of the Split *Ssp* DnaB Intein and Comparison to the Split *Sce* VMA Intein. *Biochemistry* **45**, 1571-1578 (2006).
86. Giriat,I. & Muir,T.W. Protein semi-synthesis in living cells. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7180-7181 (2003).
87. Mootz,H.D., Blum,E.S., Tyszkiewicz,A.B. & Muir,T.W. Conditional protein splicing: A new tool to control protein structure and function in vitro and in vivo. *Journal of the American Chemical Society* **125**, 10561-10569 (2003).
88. Sanger,F., Nicklen,S. & Coulson,A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **74**, 5463-5467 (1977).
89. Bradford,M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).
90. Bocharova,O.V., Breydo,L., Parfenov,A.S., Salnikov,V.V. & Baskakov,I.V. In vitro Conversion of Full-length Mammalian Prion Protein Produces Amyloid Form with Physical Properties of PrPSc. *Journal of Molecular Biology* **346**, 645-659 (2005).
91. Schnölzer,M., Alewood,P., Jones,A., Alewood,D. & Kent,S.B. In situ neutralization in Boc-chemistry solid phase peptide synthesis. Rapid, high yield assembly of difficult sequences. *Int. J. Pept. Protein Res.* **40**, 180-193 (1992).
92. Hackeng,T.M., Griffin,J.H. & Dawson,P.E. Protein synthesis by native chemical ligation: expanded scope by using straightforward methodology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 10068-10073 (1999).
93. Winklhofer,K.F., Heller,U., Reintjes,A. & Tatzelt,J. Inhibition of Complex Glycosylation Increases the Formation of PrPsc. *Traffic* **4**, 313-322 (2003).
94. Lucero,H.A. & Robbins,P.W. Lipid rafts-protein association and the regulation of protein activity. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **426**, 208-224 (2004).
95. Terpetschnig,E., Szmackinski,H., Ozinskas,A. & Lakowicz,J.R. Synthesis of Squaraine-N-Hydroxysuccinimide Esters and Their Biological Application as Long-Wavelength Fluorescent Labels. *Analytical Biochemistry* **217**, 197-204 (1994).
96. Sydor,J.R., Mariano,M., Sideris,S. & Nock,S. Establishment of intein-mediated protein ligation under denaturing conditions: C-terminal labeling of a single-chain antibody for biochip screening. *Bioconjugate Chem.* **13**, 707-712 (2002).
97. Valiyaveetil,F.I., MacKinnon,R. & Muir,T.W. Semisynthesis and folding of the potassium channel KcsA. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 9113-9120 (2002).
98. Lu,B.Y., Atanasov,I., Zhou,Z.H. & Chang,J.Y. Reversible aggregation of mouse prion protein derivatives with PrPSC-like structural properties. *Journal of Protein Chemistry* **22**, 115-126 (2003).
99. Evans,T.C., Jr. *et al.* Protein trans-splicing and cyclization by a naturally split intein from the dnaE gene of *Synechocystis* species PCC6803. *J. Biol. Chem.* **275**, 9091-9094 (2000).

100. Hojo, H. *et al.* Development of A Linker with An Enhanced Stability for the Preparation of Peptide Thioesters and Its Application to the Synthesis of A Stable-Isotope-Labeled Hu-Type Dna-Binding Protein. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **66**, 2700-2706 (1993).
101. Olschewski, D. Semisynthese des C-terminal modifizierten Maus Prion Proteins mPrP(90-231). 2004.
102. Nandi, P.K., Leclerc, E. & Marc, D. Unusual property of prion protein unfolding in neutral salt solution. *Biochemistry* **41**, 11017-11024 (2002).
103. Lu, B.Y., Beck, P.J. & Chang, J.Y. Oxidative folding of murine prion mPrP(23-231). *Eur J Biochem* **268**, 3767-3773 (2001).
104. LEVINE-III, H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* **2**, 404-410 (1993).
105. Ollesch, J. Entwicklung und Anwendung zeitaufgelöster Fourier-Transform-Infrarot-spektroskopischer Sekundärstrukturanalyse an ausgewählten Proteinen. 2006.
106. Shaner, N.C., Steinbach, P.A. & Tsien, R.Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Meth* **2**, 905-909 (2005).
107. Watanabe, Y. *et al.* Identification of pH-sensitive regions in the mouse prion by the cysteine-scanning spin-labeling ESR technique. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **350**, 549-556 (2006).
108. Feldman, H.H. & Jacova, C. Primary prevention and delay of onset of AD/dementia. *Can. J Neurol Sci.* **34 Suppl 1**, S84-S89 (2007).
109. Masuda, M. *et al.* Small Molecule Inhibitors of α -Synuclein Filament Assembly. *Biochemistry* **45**, 6085-6094 (2006).
110. Ball, H.L., King, D.S., Cohen, F.E., Prusiner, S.B. & Baldwin, M.A. Engineering the prion protein using chemical synthesis. *J Pept. Res.* **58**, 357-374 (2001).
111. Norstrom, E.M. & Mastrianni, J.A. The AGAAAAGA palindrome in PrP is required to generate a productive PrPSc-PrPC complex that leads to prion propagation. *Journal of Biological Chemistry* M413441200 (2005).
112. Lu, B.Y., Atanasov, I., Zhou, Z.H. & Chang, J.Y. Reversible aggregation of mouse prion protein derivatives with PrPSc-like structural properties. *J. Protein Chem.* **22**, 115-126 (2003).
113. Muralidharan, V. & Muir, T.W. Protein ligation: an enabling technology for the biophysical analysis of proteins. *Nat Meth* **3**, 429-438 (2006).
114. Lawson, V.A., Priola, S.A., Meade-White, C., Lawson, M. & Chesebro, B. Flexible N-terminal region of prion protein influences conformation of protease-resistant prion protein isoforms associated with cross-species scrapie infection in vivo and in vitro. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 13689-13695 (2004).
115. Sarnataro, D. *et al.* PrPC association with lipid rafts in the early secretory pathway stabilizes its cellular conformation. *Mol. Biol. Cell* **15**, 4031-4042 (2004).
116. Sanghera, N. & Pinheiro, T.J.T. Binding of prion protein to lipid membranes and implications for prion conversion. *Journal of Molecular Biology* **315**, 1241-1256 (2002).
117. Wang, F. *et al.* Lipid Interaction Converts Prion Protein to a PrPSc-like Proteinase K-Resistant Conformation under Physiological Conditions. *Biochemistry* **46**, 7045-7053 (2007).
118. Parkin, E.T., Turner, A.J. & Hooper, N.M. Isolation and characterization of two distinct low-density, Triton-insoluble, complexes from porcine lung membranes. *Biochem J* **319 (Pt 3)**, 887-896 (1996).

119. Shi, J.X. & Muir, T.W. Development of a tandem protein trans-splicing system based on native and engineered split inteins. *Journal of the American Chemical Society* **127**, 6198-6206 (2005).
120. Morillas, M., Swietnicki, W., Gambetti, P. & Surewicz, W.K. Membrane Environment Alters the Conformational Structure of the Recombinant Human Prion Protein. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 36859-36865 (1999).
121. Winklhofer, K.F. & Tatzelt, J. Cationic lipopolyamines induce degradation of PrP^{Sc} in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Biological Chemistry* **381**, 463-469 (2000).
122. Kwon, Y., Coleman, M.A. & Camarero, J.A. Selective immobilization of proteins onto solid supports through split-intein-mediated protein trans-splicing. *Angewandte Chemie-International Edition* **45**, 1726-1729 (2006).
123. Hoff, A. *et al.* Lipoconjugates for the noncovalent generation of microarrays in biochemical and cellular assays. *Chembiochem* **3**, 1183-1191 (2002).
124. Ramsden, J.J., Bachmanova, G.I. & Archakov, A.I. Immobilization of proteins to lipid bilayers. *Biosensors and Bioelectronics* **11**, 523-528 (1996).
125. Marsac, Y., Cramer, J., Olschewski, D., Alexandrov, K. & Becker, C.F.W. Site-Specific Attachment of Polyethylene Glycol-like Oligomers to Proteins and Peptides. *Bioconjugate Chem.* **17**, 1492-1498 (2006).
126. Hackenberger, C.P.R., Chen, M.M. & Imperiali, B. Expression of N-terminal Cys-protein fragments using an intein refolding strategy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **14**, 5043-5048 (2006).
127. Corsaro, A. *et al.* Expression in E-coli and purification of recombinant fragments of wild type and mutant human prion protein. *Neurochemistry International* **41**, 55-63 (2002).
128. Hun Lim, K. *et al.* Solid-state NMR structural studies of the fibril form of a mutant mouse prion peptide PrP⁸⁹⁻¹⁴³(P101L). *Solid State Nuclear Magnetic Resonance* **29**, 183-190 (2006).
129. Gasset, M. *et al.* Predicted {alpha}-Helical Regions of the Prion Protein when Synthesized as Peptides Form Amyloid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**, 10940-10944 (1992).
130. Forloni, G. *et al.* Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **362**, 543-546 (1993).
131. Brown, D.R., Herms, J. & Kretschmar, H.A. Mouse Cortical-Cells Lacking Cellular Prp Survive in Culture with A Neurotoxic Prp Fragment. *Neuroreport* **5**, 2057-2060 (1994).
132. Weissmann, C. & Flechsig, E. PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br Med Bull* **66**, 43 (2003).
133. Gerber, R., Tahiri-Alaoui, A., Hore, P.J. & James, W. Oligomerization of the Human Prion Protein Proceeds via a Molten Globule Intermediate. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 6300-6307 (2007).
134. Kuwata, K. *et al.* Hot spots in prion protein for pathogenic conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 0702671104 (2007).
135. Reddy, T.R.K. *et al.* Library Design, Synthesis, and Screening: Pyridine Dicarbonitriles as Potential Prion Disease Therapeutics. *J. Med. Chem.* **49**, 607-615 (2006).
136. Caughey, W.S., Raymond, L.D., Horiuchi, M. & Caughey, B. Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 12117-12122 (1998).
137. Priola, S.A., Raines, A. & Caughey, W.S. Porphyrin and Phthalocyanine Antiscrapie Compounds. *Science* **287**, 1503-1506 (2000).

138. Korth,C., May,B.C.H., Cohen,F.E. & Prusiner,S.B. Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 9836-9841 (2001).
139. May,B.C.H. *et al.* Potent inhibition of scrapie prion replication in cultured cells by bis-acridines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 3416-3421 (2003).
140. Doh-ura,K., Iwaki,T. & Caughey,B. Lysosomotropic Agents and Cysteine Protease Inhibitors Inhibit Scrapie-Associated Prion Protein Accumulation. *J. Virol.* **74**, 4894-4897 (2000).
141. Adjou,K.T. *et al.* A novel generation of heparan sulfate mimetics for the treatment of prion diseases. *J Gen Virol* **84**, 2595-2603 (2003).
142. Supattapone,S., Nguyen,H.O., Cohen,F.E., Prusiner,S.B. & Scott,M.R. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 14529-14534 (1999).
143. Pérez,M., Wandosell,F., Colaço,C. & Avila,J. Sulphated glycosaminoglycans prevent the neurotoxicity of a human prion protein fragment. *Biochem. J.* **335**, 369-374 (1998).
144. Caspi,S. *et al.* The Anti-prion Activity of Congo Red. PUTATIVE MECHANISM. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 3484-3489 (1998).
145. Milhavel,O., Mange,A., Casanova,D. & Lehmann,S. Effect of Congo Red on Wild-Type and Mutated Prion Proteins in Cultured Cells. *Journal of Neurochemistry* **74**, 222-230 (2000).
146. Sellarajah,S. *et al.* Synthesis of Analogues of Congo Red and Evaluation of Their Anti-Prion Activity. *J. Med. Chem.* **47**, 5515-5534 (2004).
147. Cordeiro,Y., Lima,L.M., Gomes,M.P.B., Foguel,D. & Silva,J.L. Modulation of Prion Protein Oligomerization, Aggregation, and {beta}-sheet Conversion by 4,4'-Dianilino-1,1'-binaphthyl-5,5'-sulfonate (bis-ANS). *Journal of Biological Chemistry* **279**, 5346-5352 (2004).

7. Anhang

Nukleotidsequenzen der verwendeten Gene

pTXB3-His mPrP via NcoI/SapI:

```
1      ATGGGCCAAG GAGGGGGTAC CCATAATCAG TGGAACAAGC
41     CCAGCAAACC AAAAACCAA CATGAAGCAT ATGGCAGGGG
81     CTGCGGCAGC TGGGGCAGTA GTGGGGGGCC TTGGTGGCTA
121    CATGCTGGGG AGCGCCATGA GCAGGCCCAT GATCCATTTT
161    GGCAACGACT GGGAGGACCG CTACTIONCGT GAAAACATGT
201    ACCGCTACCC TAACCAAGTG TACTACAGGC CAGTGGATCA
241    GTACAGCAAC CAGAACAAC TCGTGCACGA CTGCGTCAAT
281    ATCACCATCA AGCAGCACAC GGCACCACC ACCACCAAGG
321    GGGAGAACTT CACCGAGACC GATGTGAAGA TGATGGAGCG
361    CGTGGTGGAG CAGATGTGCG TCACCCAGTA CCAGAAGGAG
401    TCCCAGGCCT ATTACGACGG GAGAAGATCC AGC
```

pTXB3-IN-His mPrP via NcoI/SapI:

```
1      ATGGGCCAAG GAGGGGGTAC CCATAATCAG TGGAACAAGC
41     CCAGCAAACC AAAAACCAA CATGAAGCAT ATGGCAGGGG
81     CTGCGGCAGC TGGGGCAGTA GTGGGGGGCC TTGGTGGCTA
121    CATGCTGGGG AGCGCCATGA GCAGGCCCAT GATCCATTTT
161    GGCAACGACT GGGAGGACCG CTACTIONCGT GAAAACATGT
201    ACCGCTACCC TAACCAAGTG TACTACAGGC CAGTGGATCA
241    GTACAGCAAC CAGAACAAC TCGTGCACGA CTGCGTCAAT
281    ATCACCATCA AGCAGCACAC GGCACCACC ACCACCAAGG
321    GGGAGAACTT CACCGAGACC GATGTGAAGA TGATGGAGCG
361    CGTGGTGGAG CAGATGTGCG TCACCCAGTA CCAGAAGGAG
401    TCCCAGGCCT ATTACGACGG GAGAAGATCC AGC
```

pRSNCys mPrP(134-232) via NcoI und BamHI:

1 ATGGGCCATC ATCATCATCA TCATCATCACG GTGGTGGCTG
41 GTGAAAACCT GTATTTTCAG TGCAGGCCCA TGATCCATGG
81 CAACGACTGG GAGGACCGCT ACTACCGTGA AAACATCGCT
121 ACCCTAACCA AGTGTACTAC AGGCCAGTGG ATCAGTACAG
161 CAACCAGAAC AACTTCGTGC ACGACTGCGT CAATATCACC
201 ATCAAGCAGC ACACGGTCAC CACCACCACC AAGGGGGAGA
241 ACTTCACCGA GACCGATGTG AAGATGATGG AGCGCGTGGT
281 GGAGCAGATG TGCGTCACCC AGTACCAGAA GGAGTCCCAG
321 GCCTATTACG ACGGGAGAAG ATCCAGC

pTXB3-IN-His eGFP via NcoI/SapI:

1 ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTCCACC GGGGTGGTGC
41 CCATCCTGGT CGAGCTGGAC GCGGACGTAA ACGGCCACAA
81 GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG GCGAGGGCGA TGCCACCTAC
121 GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT CATCTGCACC ACCGGCAAGC
161 TGCCCGTGCC CTGGCCCACC CTCGTGACCA CCCTGACCTA
201 CGGCGTGAG TGCTTCAGCC GCTACCCCGA CCACATGAAG
241 CAGCACGACT TCTTCAAGTC CGCCATGCCC GAAGGCTACG
281 TCCAGGAGCG CACCATCTTC TTCAAGGACG ACGGCAACTA
321 CAAGACCCGC GCCGAGGTGA AGTTCGAGGG CGACACCCTG
361 GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG
401 ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA
441 CAGCCACAAC GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC
481 GGCATCAAGG TGAAGTTCAA GATCCGCCAC AACATCGAGG
521 ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC GACCACTACC AGCAGAACAC
561 CCCCATCGGC GACGGCCCCG TGCTGCTGCC CGACAACCAC
601 TACCTGAGCA CCCAGTCCGC CCTGAGCAA GACCCCAACG
641 AGAAGCGCGA TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC
681 CGCCGGGATC ACTCTCGGCA TGGACGAGCT GTACAAGGGC
721 GGCGGCGGGC GCGGCAAGTT TGCGGAATAT TGC

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Engelhard und Dr. Christian F.W. Becker für die hochinteressante Themenstellung und ihre großzügige Betreuung und Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Roland Winter danke ich für die Übernahme des Koreferats seitens der Universität Dortmund sowie Herrn Prof. Dr. Roger Goody für die Aufnahme in seine Abteilung am MPI

Ferner möchte ich auch besonders Prof. Dr. Jörg Tatzelt und Dr. Konstanze Winklhofer sowie Margit Miesbauer und Angelika Rambold für eine ausgezeichnete Kooperation und die Durchführung der Zellkulturversuche danken.

Dr. Ralf Seidel danke ich für die Einführung in „gutes molekularbiologisches Arbeiten“, sowie fruchtbare Diskussionsrunden und seinen unvergleichbaren Humor.

Ich danke weiterhin:

PD Dr. Matthias Geyer für dessen Ratschläge bezüglich NMR Spektroskopie sowie Bernhard Griewel für die Aufnahme der NMR-Spektren.

Julian und Jörn der AG Gerwert (Ruhr-Universität Bochum) für die Durchführung der ATR Versuche.

Vytautas (AG Winter Universität Dortmund) für die Aufnahme der AFM Bilder.

Sascha für die Synthese zahlreicher Peptide.

Martina für die Unterstützung bei der Peptidaufreinigung und ihre Hilfsbereitschaft.

Anke für das Korrektur lesen der Arbeit und die Unterstützung bei der alltäglichen Laborarbeit, sowie Karin, Nina und Marion für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft.

Des Weiteren danke ich auch besonders Swetlana, Miria, Lars, Jörg und Kester für eine wirklich ausgezeichnete und humorvolle Arbeitsatmosphäre sowie den Zusammenhalt der Gruppe und zahlreiche abendliche „Diskussionsrunden“.

Der gesamten Abteilung 3 und den Zentraleinrichtungen für die gute Zusammenarbeit.

Ferner möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich in jeder Situation unterstützt haben.

Mein liebster Dank gilt Rolf für seine Geduld, Unterstützung, Motivation und so vieles mehr.

Lebenslauf

Name: Diana Olschewski
Geburtsort: Bottrop (NRW)
Geburtsdatum: 24. 12. 1980
Nationalität: deutsch

Schulbildung

1987-1991 Pestalozzi Grundschule in Gladbeck
1991-2000 Ratsgymnasium in Gladbeck
Juni 2000 Abitur

Studium

Okt. 2000-Dez. 2004 Studium der Chemie an der Universität Dortmund
Sep. 2002 Erwerb des Vordiploms
Dez. 2004 Erwerb des Diploms
Juni 2004-Dez. 2004 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund:
Semisynthese des C-terminal modifizierten Maus Prion Proteins mPrP(90-231)
Januar 2005 Beginn der Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund in der Abteilung Physikalische Biochemie unter der Anleitung von Dr. Christian Becker und Prof. Dr. Martin Engelhard

